



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

Renata de Moraes Peixoto Araújo

Caracterização fenogenotípica de patógenos da mastite subclínica caprina e potencial antimicrobiano e antibiofilme da quercetina

Patos/PB
2022

Renata de Moraes Peixoto Araújo

Caracterização fenogenotípica de patógenos da mastite subclínica caprina e potencial antimicrobiano e antibiofilme da quercetina

Tese 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. Dr. Eldinê Gomes de Miranda Neto
Orientador

Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa
Coorientador

Patos/PB
2022

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema Integrado Bibliotecas – SISTEMOTECA/UFCG**

A663c

Araújo, Renata de Moraes Peixoto

Caracterização fenogenotípica de patógenos da mastite subclínica caprina e potencial antimicrobiano e antibiofilme da quercetina / Renata de Moraes Peixoto Araújo. – Patos, 2022.

65 f.

Orientador: Eldinê Gomes de Miranda Neto.

Coorientador: Mateus Matiuzzi da Costa.

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

1. Mastite subclínica. 2. *Staphylococcus* spp. 3. MALDI-TOF MS. 4. Quercetina. 5. Atividade antibacteriana. 6. Atividade antibiofilme. I. Miranda Neto, Eldinê Gomes de, *orient.* II. Título.

CDU 636.32



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

RENATA DE MORAES PEIXOTO ARAÚJO

**CARACTERIZAÇÃO FENOGENOTÍPICA DE PATÓGENOS DA MASTITE SUB-CLÍNICA CAPRINA E POTENCIAL
ANTIMICROBIANO E ANTIBIOFILME DA QUERCETINA**

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

Aprovada em: 30/11/2022

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Eldinê Gomes de Miranda Neto (Orientador - PPGCSA/UFCG)

Prof. Dr. Severino Silvano dos Santos Higinio(Examinador Interno - PPGCSA/UFCG)

Prof. Dr. Diego de Quadros Melo (Examinador Externo - IF SERTÃO)

Profa. Dra. Carla Lopes de Mendonça (Examinador Externo - UFRPE)

Prof. Dr. Felício Garino Júnior (Examinador Externo - Animal Vet Lab)



Documento assinado eletronicamente por **SEVERINO SILVANO DOS SANTOS HIGINIO, PROFESSOR(A) DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 30/11/2022, às 17:37, 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 **CARLA LOPES DE MENDONÇA, Usuário Externo**, em 30/11/2022, às 17:37, 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 **DIEGO DE QUADROS MELO, Usuário Externo**, em 30/11/2022, às 17:38, 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 **ELDINE GOMES DE MIRANDA NETO, COORDENADOR(A)**, em 30/11/2022, às 17:39, 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 **Felício Garino junior, Usuário Externo**, em 28/12/2022, às 08:12, 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 **2881822** e o código CRC **9DA22A18**.

DEDICATÓRIA

A todas as mulheres que foram diagnosticadas com câncer de mama.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me permitir concluir o doutorado após momentos desafiadores, como a pandemia do coronavírus e o diagnóstico de câncer de mama. Tudo para a glória de Deus, tudo no tempo de Deus.

Sou grata a minha família, a minha rede de apoio.

A minha mãe, Maria de Lourdes de Moraes. Meus queridos irmãos, Anne Caroline de M. Peixoto e Rodolfo de M. Peixoto. Sou grata ao meu esposo, Cleiton Roberto A. Araújo, meu incentivador. Minhas cunhadas, Luciana Jatobá e Cleiane Rose A. Araújo. E minha querida sogra, Carmelita Alves.

Ao meu pai, Antônio Peixoto.

Sou grata pela benção de ser mãe de Maria Rosa, de ser tia de Davi, João e Alice, os quais trouxeram mais alegria e amor para nossa família.

Sou eternamente grata ao meu orientador, professor Eldinê Gomes, por sua paciência, compreensão, generosidade e suas orações.

Agradeço ao professor Felício Garino, um ser humano alegre e humilde. Inicialmente, o professor Felício foi meu orientador e me incentivou a participar da seleção de doutorado na UFCG, Patos/PB.

Agradeço ao meu coorientador, o professor Mateus Matiuzzi. Ele faz parte de toda a minha trajetória acadêmica. O professor Mateus é o responsável pelo Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal da UNIVASF, no qual pude executar a maioria das metodologias propostas na Tese. Além disso, o professor Mateus contribuiu financeiramente, tornando possível a execução de algumas metodologias do projeto.

Agradeço imensamente ao meu irmão e professor, Rodolfo Peixoto, o qual é docente do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sertão Pernambucano (IF SERTÃO-PE, Campus Zona Rural) e desenvolve muitas pesquisas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos. O professor Rodolfo disponibilizou o Laboratório para algumas análises e contribuiu financeiramente com o projeto.

Agradeço à professora Gisele Veneroni, a qual disponibilizou o Laboratório de Genética Animal da UNIVASF, para as análises moleculares, desta forma, contribuiu significativamente com a execução do projeto.

Agradeço a todos os colegas que me ajudaram de forma direta ou indireta. Em especial, agradeço a Maura Sousa que me ajudou em várias etapas do trabalho.

Agradeço ao pesquisador da EMBRAPA, Daniel Maia, o qual esteve presente nas coletas, juntamente com Bruna Souza.

Sou imensamente grata a Isabelly, pelo imenso apoio na Revisão Sistemática e na Tese (UNIVASF).

Sou imensamente grata a Beatriz Araújo, pelo apoio nas análises moleculares (UNIVASF).

Sou grata pelo apoio de Danillo Sales e Jusciene Moura (UNIVASF).

Sou grata pelos amigos e amigas que conheci na UFCG. Em especial, Amanda Maia, Priscila, Maíra e José Dêvede.

Sou grata pelo apoio das minhas amigas (Ana, Aninha, Amanda, Gilane, Mika, Cris, Sil, Milena, Valéria e Rivânia).

Sou grata por todo apoio e paciência de Adalberto Dantas, Secretário da Pós-Graduação.

Agradeço aos membros do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Saúde Animal - UFCG Patos-PB.

Agradeço a CAPES pela concessão da bolsa.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| INTRODUÇÃO GERAL | 15 |
| REFERÊNCIAS | 17 |
| CAPÍTULO I: Mastite caprina e potenciais estratégias antimicrobianas: Revisão sistemática..... | 19 |
| CAPÍTULO II: Caracterização fenogenotípica da resistência e produção de biofilme de <i>Staphylococcus</i> spp. isolados de casos de mastite subclínica em cabras criadas no semiárido nordestino..... | 40 |
| CAPÍTULO III: Interference of quercetin in the biofilm production in <i>Staphylococcus</i> spp. isolated from cases of goat mastitis..... | 55 |
| CONCLUSÃO GERAL | 65 |

RESUMO

Devido a importância de *Staphylococcus* spp. nos casos de mastite caprina. O objetivo desta pesquisa foi identificar as espécies envolvidas, investigar a resistência antimicrobiana, além de verificar a atividade antibacteriana e antibiofilme da quercetina. Para isso, foram coletadas 264 amostras de leite caprino. Após uma triagem, trinta e um *Staphylococcus* spp. foram submetidos a espectrometria de massa (MALDI-TOF MS), a pesquisa dos genes *nuc*, *blaZ*, *mecA*, *icaA*, *icaD*, *bap* e antibiograma, utilizando antimicrobianos das classes: macrolídeo, quinolona, aminoglicosídeo, tetraciclina, lincosamida e betalactâmico. Para verificar a ação da quercetina sobre os *Staphylococcus* spp, foram utilizados quatro isolados (*S. aureus*, *S. lugdunensis*, *S. epidermidis* e *S. chromogenes*) e uma ATCC 25923. Para determinar a atividade antibacteriana *in vitro* da quercetina, realizou-se a CIM (Concentração Inibitória Mínima) e a CBM (Concentração Bactericida Mínima), utilizando as concentrações de 1000µg/mL a 7,81µg/mL. Para avaliar o efeito antibiofilme da substância, foram utilizadas as concentrações subinibitórias da CIM (500µg/mL, 250µg/mL, 125µg/mL) para análise do biofilme em formação; e metade da CIM (500µg/mL) e 1xCIM (1000µg/mL) para avaliação do biofilme consolidado. A espectrometria de massa identificou quatro isolados pertencentes ao grupo dos SCP (*Staphylococcus* Coagulase Positiva) e os outros 27 como SCN (*Staphylococcus* Coagulase Negativa). O resultado da análise estatística indicou concordância ruim entre as técnicas de MALDI-TOF MS e a pesquisa do gene *nuc*. Com isso, sugere-se o uso simultâneo de outros iniciadores para a identificação de espécies *Staphylococcus* spp. Os isolados demonstraram maior resistência à penicilina e tetraciclina, além disso, um *S. aureus* apresentou resistência à cefoxitina. Na pesquisa do gene *blaZ*, 64,5% dos isolados apresentaram o referido gene. Já as análises *in vitro* puderam demonstrar que todos os isolados formaram biofilme e o gene *bap* estava presente em 22,5% dos isolados. Neste estudo, a quercetina demonstrou ter potencial bacteriostático e antibiofilme. Com base nos resultados, salienta-se a importância dos SCN na etiologia da mastite subclínica em caprinos, uma vez que demonstraram a capacidade de produzir biofilme e de carrear genes de resistência. Além disso, a quercetina pode ser uma opção promissora para o tratamento da mastite caprina.

Palavras-chave: mastite subclínica; *Staphylococcus* spp.; MALDI-TOF MS; quercetina; atividade antibacteriana; atividade antibiofilme.

ABSTRACT

Due to the importance of *Staphylococcus* spp. in cases of caprine mastitis. The aim of this research was to identify the species involved, investigate antimicrobial resistance, and verify the antibacterial and antibiofilm activity of quercetin. For this, 264 samples of goat milk were collected. After screening, thirty-one *Staphylococcus* spp. were submitted to mass spectrometry (MALDI-TOF MS), research of the genes *nuc*, *blaZ*, *mecA*, *icaA*, *icaD*, *bap* and antibiogram, using antimicrobials of the following classes: macrolide, quinolone, aminoglycoside, tetracycline, lincosamide and beta-lactam. To verify the action of quercetin on *Staphylococcus* spp, four isolates (*S. aureus*, *S. lugdunensis*, *S. epidermidis* and *S. chromogenes*) and an ATCC 25923 were used. MIC (Minimum Inhibitory Concentration) and MBC (Minimum Bactericidal Concentration), using concentrations from 1000µg/mL to 7.81µg/mL. To evaluate the antibiofilm effect of the substance, subinhibitory MIC concentrations (500µg/mL, 250µg/mL, 125µg/mL) were used to analyze the biofilm in formation; and half MIC (500µg/mL) and 1xMIC (1000µg/mL) for evaluation of the consolidated biofilm. Mass spectrometry identified four isolates belonging to the SCP group (Coagulase Positive *Staphylococcus*) and the other 27 as SCN (Coagulase Negative *Staphylococcus*). The result of the statistical analysis indicated poor agreement between the MALDI-TOF MS techniques and the *nuc* gene search. With this, it is suggested the simultaneous use of other primers for the identification of *Staphylococcus* spp. The isolates showed greater resistance to penicillin and tetracycline, in addition, one *S. aureus* showed resistance to cefoxitin. In the research of the *blaZ* gene, 64.5% of the isolates presented the referred gene. In vitro analyzes were able to demonstrate that all isolates formed a biofilm and the *bap* gene was present in 22.5% of the isolates. In this study, quercetin demonstrated bacteriostatic and antibiofilm potential. Based on the results, the importance of SCN in the etiology of subclinical mastitis in goats is highlighted, since they demonstrated the ability to produce biofilm and to carry resistance genes. Furthermore, quercetin may be a promising option for the treatment of caprine mastitis.

Keywords: mastitis subclinic; *Staphylococcus* spp.; MALDI-TOF MS; quercetin; antibacterial activity; antibiofilm activity.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

| | | |
|-----------------|---|-----------|
| TABELA 1 | Aspectos gerais sobre as alternativas antimicrobianas encontradas nos artigos selecionados..... | 37 |
|-----------------|---|-----------|

CAPÍTULO III

| | | |
|-----------------|---|-----------|
| TABELA 1 | Quercetin binding energies with <i>S. aureus</i> membrane proteins..... | 61 |
|-----------------|---|-----------|

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- FIGURA 1** Fluxograma da busca, seleção e inclusão dos estudos na revisão sistemática..... **39**

CAPÍTULO II

- FIGURA 1** Georreferenciamento dos locais da coleta de leite caprino, Petrolina-PE e Juazeiro-BA, 2019..... **54**

- FIGURA 2** Identificação das espécies de *Staphylococcus* spp. isolados de mastite caprina..... **54**

CAPÍTULO III

- FIGURA 1** Quercetin interference on biofilm formation..... **59**

- FIGURA 2** Quercetin interference on consolidated biofilm..... **60**

- FIGURA 3** Quercetin binding to the target sites of *S. aureus* membrane proteins. Intermolecular attractions by hydrogen bonds and electrostatic interactions between quercetin and amino acids of the ClfA (A) protein. 3D structure of the binding between quercetin and the ClfA protein target site (B)..... **60**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|------|--|
| CBM | Concentração Bactericida Mínima |
| CCS | Contagem de Células Somáticas |
| CIM | Concentração Inibitória Mínima |
| CLSI | <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i> |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DNA | <i>Deoxyribonucleic acid</i> |
| DO | Densidade óptica |
| IBGE | Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística |
| MH | <i>Mueller Hinton</i> |
| MRSA | <i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i> |
| PCR | <i>Polymerase chain reaction</i> |
| SCN | <i>Staphylococcus coagulase negativa</i> |
| SCP | <i>Staphylococcus coagulase positiva</i> |
| TSB | <i>Tryptic Soy Broth</i> |
| UFC | Unidade formadora de colônia |
| UI | Unidade internacional |
| UV | Ultravioleta |

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|---------------|----------------|
| % | Porcentagem |
| \leq | Menor ou igual |
| \geq | Maior ou igual |
| < | Menor |
| > | Maior |
| + | Positivo |
| - | Negativo |
| μg | Micrograma |
| Mg | Miligrama |
| mL | Mililitro |
| mM | Milimolar |
| mm | Millimetre |
| nm | Nanômetro |
| X | Multiplicação |
| μL | Microlitro |

INTRODUÇÃO GERAL

A caprinocultura brasileira apresenta um expressivo rebanho, uma vez que o Brasil possui cerca de 11,3 milhões de cabeças, deste total, 94,6% encontra-se na região Nordeste do país (IBGE, 2019). Contudo, alguns entraves impedem o crescimento da atividade, como a precariedade do manejo higiênico-sanitário. Dentre os principais problemas sanitários, destaca-se a mastite, geralmente, ocasionada por microrganismos do gênero *Staphylococcus* spp.

A mastite é classificada quanto a sua forma de manifestação e transmissão. Quanto à manifestação, tem-se a forma clínica, em que são observados os sinais clínicos (ex. edema, aumento da temperatura, alterações nas características do leite) e a forma subclínica, é caracterizada por alterações na composição do leite (ex. aumento da CCS) sem aparecimento de sinais clínicos evidentes (RIBEIRO et al., 2003; MAHMMOD, 2013). Quanto a sua forma de transmissão, a mastite contagiosa é ocasionada por patógenos do interior da glândula mamária e superfície dos tetos, a principal forma de transmissão ocorre durante a ordenha (mãos do ordenhador, o mesmo pano utilizado para secar o teto de vários animais e teteiras da ordenhadeira mecânica) (BELOTI, 2015; FERGUSON et al., 2007). Já a mastite ambiental é ocasionada por agentes presentes nas fezes, na água e de forma geral, desencadeia casos clínicos, e sua transmissão geralmente ocorre entre as ordenhas (BELOTI, 2015).

Quanto ao tratamento da mastite, uma medida muito utilizada pelos produtores é o uso indiscriminado de antimicrobianos intramamários. Além disso, existem poucos fármacos especificamente licenciadas para uso em pequenos ruminantes, especialmente em cabras (PEIXOTO et al., 2010). De acordo com Pengov et al. (2009) o tratamento da mastite em ovelhas leiteiras, é normalmente utilizado antibiótico autorizado para a glândula mamária bovina. Desta forma, uma das principais problemáticas no controle da mastite é a resistência do agente etiológico aos antimicrobianos (LIMA et al., 2020).

O uso contínuo de antibióticos na produção leiteira, pode acarretar à seleção e o surgimento de cepas bacterianas resistentes aos antimicrobianos, considerando que as bactérias apresentam diversos mecanismos destinados à proteção contra drogas antibacterianas (YUAN et al., 2017; BLAIR et al., 2015). Como exemplo, a enzima β -lactamase é codificada pelo gene *blaZ* (PEREIRA et al., 2014), a qual confere resistência aos beta-lactâmicos. Além disso, *Staphylococcus* spp. são capazes de produzir uma substância extracelular polissacarídica natural denominada de biofilme (*slime*).

Esta substância permite que as células bacterianas se aglomerem em multicamadas de biofilme, tornando-as menos acessíveis ao sistema de defesa do organismo e aos antibióticos (ANTUNES et al., 2007). A produção deste é controlada pelo *operon ica* (*icaADBC*) e a coexpressão dos genes *icaA* e *icaD* acarreta um aumento significativo na produção e estão relacionados com a expressão fenotípica do polissacarídeo (ARCIOLA et al., 2001). Outro gene envolvido na produção de biofilmes é o *bap* que codifica a proteína (*bap* – *Biofilm Associated Protein*) expressa por este gene, que promove tanto a fixação primária a uma superfície quanto à adesão intercelular (CUCARELLA et al., 2004).

Logo, com a problemática da resistência em *Staphylococcus* spp. faz-se necessário desenvolver pesquisas que objetivem desenvolver potenciais estratégias antimicrobianas. Assim, os produtos naturais encontrados em plantas oriundas da caatinga podem constituir potenciais protocolos terapêuticos (MEMARIANI al., 2019; PEREIRA et al., 2017). No estudo realizado por Sousa et al. (2020), a quantificação dos compostos fenólicos (extrato etanólico bruto das folhas da umburana de cambão e da jurema preta) demonstrou que a quercetina e a miricetina (flavonoides) estavam presentes em quantidades expressivas.

Segundo Silva et al. (2020) os flavonoides despertam o interesse de muitos pesquisadores para o desenvolvimento de estudos relacionados com atividade antibacteriana. Um estudo realizado por Matilla-Cuenca et al., (2020) identificaram que a quercetina e a miricetina inibiram a formação de biofilme em *S. aureus* e outras espécies estafilocócicas. Com isso, o objetivo desse trabalho é realizar a caracterização fenotípica e genotípica de *Staphylococcus* spp. isolados de mastite caprina, além de verificar a atividade antibacteriana e antibiofilme da quercetina.

REFERÊNCIAS

- ANTUNES, A. L. S. *et al.* Detecção da produção de biofilme em *Staphylococcus* spp. por agar congo red. **Revista de Saúde da UCPEL**, Pelotas, v.1, n.1, 2007.
- ARCIOLA, C. R; BALDASSARRI, Lucilla; MONTANARO, Lucio. Presence of *icaA* and *icaD* Genes and Slime Production in a Collection of Staphylococcal Strains from Catheter-Associated Infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 6, p. 2151–2156, 2001.
- BELOTI, Vanerli. **Leite: obtenção, inspeção e qualidade**. Londrina: Ed. Planta, 2015.
- BLAIR, J. M. A. *et al.* Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature reviews microbiology**, v. 13, n. 1, p. 42-51, 2015.
- CUCARELLA, Carme. *et al.* Role of Biofilm-Associated Protein Bap in the Pathogenesis of Bovine *Staphylococcus aureus*. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 4, p. 2177–2185, 2004.
- FERGUSON, J. D. *et al.* Prevalence of Mastitis Pathogens in Ragusa, Sicily, from 2000 to 2006. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 12, p. 5798–5813, 2007.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. IBGE. **Produção da Pecuária Municipal**. Rio de Janeiro, v. 47, p.1-8, 2019.
- LIMA, M. C. *et al.* Profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from goat persistent mastitis before and after treatment with enrofloxacin. **BMC microbiology**, v. 20, p.1-11, 2020.
- MAHMMOD, Yasser. The Future of PCR Technologies in Diagnosis of Bovine Mastitis Pathogens. **Advances in Dairy Research**, v. 2, n. 1, 2013.
- MATILLA-CUENCA, L. *et al.* Antibiofilm activity of flavonoids on staphylococcal biofilms through targeting BAP amyloids. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-12, 2020.
- MEMARIANI, Hamed. *et al.* An overview on anti-biofilm properties of quercetin against bacterial pathogens. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 2019.
- SILVA, A. D. *et al.* Atividade Antimicrobiana de Flavonoides: uma Revisão de Literatura. **Revista Interdisciplinar em Ciências da Saúde e Biológicas**, v. 4, n. 1, p. 51-65, 2020.
- SOUSA, M. M. *et al.* Antimicrobial potential of Jurema preta and umburana, native species of the Caatinga biome, on *Staphylococcus* isolated from small ruminants with mastitis. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 41, n. 5sup11, p. 2231-2244, 2020.
- PEIXOTO, R. M; MOTA, R. A; COSTA, M. M. Mastite em pequenos ruminantes no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, p. 754-762, 2010.
- PENGOV, Andrej; KIRBIS, Andrej. Risks of antibiotic residues in milk following intramammary and intramuscular treatments in dairy sheep. **Analytica chimica acta**, v. 637, n. 1-2, p. 13-17, 2009.

PEREIRA, L.A. *et al.* Real-Time PCR Assay for Detection of *blaZ* Genes in *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates. **Journal Clinical Microbiology**. v.52, n.4, p.1259–1261, 2014.

PEREIRA, J.J.S. *et al.* Commiphora leptophloeos Phytochemical and Antimicrobial Characterization. **Frontiers in Microbiology**, 2017.

RIBEIRO, M. E. R. *et al.* Relação entre mastite clínica, subclínica infecciosa e não infecciosa em unidades de produção leiteiras na Região Sul do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 9, n. 3, p. 287-290, 2003.

SAWANT A.A; GILLESPIE, B.E; OLIVER S.P. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative *Staphylococcus* species isolated from bovine milk. **Veterinary Microbiology**, v.134, p.73-81, 2009.

YUAN, Y.G. *et al.* Effects of silver nanoparticles on multiple drug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* from mastitis-infected goats: An alternative approach for antimicrobial therapy. **International Journal of Molecular Science** v.18, n.3, 2017.

CAPÍTULO I

Mastite caprina e potenciais estratégias antimicrobianas: Revisão sistemática

Trabalho a ser submetido à Revista Ciência Rural

Mastite caprina e potenciais estratégias antimicrobianas: Revisão sistemática

Mastitis goats and potential antimicrobial strategies: Systematic review

Renata de Moraes Peixoto Araújo^{1*}, Isabelly Dálete Ferreira Ribeiro², Clécio Henrique Limeira¹, Rodolfo de Moraes Peixoto³, Mateus Matiuzzi da Costa², Felício Garino Júnior¹, Eldinê Gomes de Miranda Neto¹.

RESUMO

A mastite caprina tem como o principal agente causal *Staphylococcus* spp. Visando reduzir os impactos causados por esses microrganismos, a utilização de antimicrobianos é a principal estratégia no tratamento da mastite. Dessa forma, faz-se cada vez mais necessária a busca por alternativas terapêuticas, visando minimizar o efeito negativo do uso indiscriminado dos compostos convencionais. Com isso, objetivou-se realizar uma revisão sistemática de literatura sobre o potencial de novas estratégias antimicrobianas frente *Staphylococcus* spp. Os seguintes termos de busca foram utilizados: “Goat mastitis”. Foram obtidos 2.740 estudos oriundos das bases de dados: MEDLINE/PubMed (305), Science Direct (1.853), Scopus (528) e Web of Science (54). Posteriormente, foram aplicados critérios de inclusão, exclusão e realizada a triagem e análise dos dados. Foram eleitos 15 artigos para a construção da revisão sistemática. As estratégias antimicrobianas descritas nos estudos foram: extratos de plantas (75% dos estudos), produtos meliponários (20%) seguido das nanopartículas (10%) e óleos essenciais (10%). Esses achados possibilitam um direcionamento para potenciais terapias antimicrobianas, destacando o uso de extrato de plantas, podendo ser o precursor para tratamentos mais promissores da mastite caprina ocasionada por *Staphylococcus* spp.

¹Universidade Federal de Campina Grande, Hospital Veterinário Universitário/UFCG, Av. Universitária, s/n, bairro Santa Cecília, CEP: 58708-110, Patos/PB, Brasil. E-mail: renatavet_peixoto@hotmail.com. Autor para correspondência.

²Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF, Campus Ciências Agrárias, Petrolina/PE, Brasil.

³IF Sertão Petrolina, Campus Zona Rural, Petrolina/PE, Brasil.

Palavras-chave: leite caprino, infecção intramamária, *Staphylococcus*, alternativas terapêuticas.

ABSTRACT

The main causal agent of caprine mastitis is *Staphylococcus* spp. In order to reduce the impacts caused by these microorganisms, the use of antimicrobials is the main strategy in the treatment of mastitis. Thus, it is increasingly necessary to search for therapeutic alternatives, aiming to minimize the negative effect of the indiscriminate use of conventional compounds. With this, the objective was to carry out a systematic review of the literature on the potential of new antimicrobial strategies against *Staphylococcus* spp. The following search terms were used: "Goat mastitis". A total of 2,740 studies were obtained from the following databases: MEDLINE/PubMed (305), Science Direct (1,853), Scopus (528) and Web of Science (54). Subsequently, inclusion and exclusion criteria were applied, and data were screened and analyzed. Fifteen articles were chosen for the construction of the systematic review. The antimicrobial strategies described in the studies were: plant extracts (75% of the studies), meliponary products (20%) followed by nanoparticles (10%) and essential oils (10%). These findings allow a direction for potential antimicrobial therapies, highlighting the use of plant extracts, which may be the precursor to more promising treatments for caprine mastitis caused by *Staphylococcus* spp.

Keywords: goat milk, intramammary infection, *Staphylococcus*, therapeutic alternatives.

INTRODUÇÃO

A mastite é uma doença infecciosa intramamária causada por alguns gêneros bacterianos. Algumas bactérias como *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN), *S. aureus*, *Escherichia coli*, *Serratia* spp., *Micrococcus* spp., *Enterococcus* spp. e *Corynebacterium* spp. são relatadas como microrganismos causadores de mastite caprina (PEREIRA et al., 2016; MAHLANGU et al., 2018).

No entanto, *Staphylococcus* spp., mostra-se como patógeno mais prevalente e responsável por quadros infecciosos, dentre o gênero é possível destacar a importância de *S. aureus* e SCN como agentes capazes de causar a mastite clínica e subclínica (CONTRERAS et al., 2007; HOEKSTRA et al., 2019; KOOP et al., 2012).

Dessa forma, tornou-se necessária à aplicabilidade de meios capazes de reduzir os impactos causados por microrganismos patogênicos relacionados à mastite. Diante disso a utilização de agentes antimicrobianos como a terapia por meio de antibióticos é tida como primeira opção na maioria dos casos, visando principalmente solucionar a morbidade e mortalidade animal (BARLOW, 2011; YUAN et al., 2017).

Além disso, existem poucos fármacos especificamente licenciadas para uso em pequenos ruminantes, especialmente em cabras (PEIXOTO et al., 2010). Deste modo, levando a seleção de microrganismos, o que resulta na resistência bacteriana, além da presença de resíduos de antibióticos no leite (LIMA et al., 2020; GOMES & HENRIQUES, 2016).

Com entraves da resistência antimicrobiana, custos e inviabilidade dos produtos leiteiros, aumentou a busca por métodos alternativos para a eliminação de microrganismos patogênicos causadores de mastite. Essas estratégias relacionam a utilização de nanotecnologias, terapia com bacteriófagos, proteínas de origem animal, bacteriocinas, fitoterapia e compostos vegetais (RADZIKOWSKI et al., 2020). Desta maneira, o objetivo desse estudo foi realizar uma revisão sistemática de literatura sobre o potencial de alternativas antimicrobianas frente *Staphylococcus* spp. causadores de mastite caprina.

MATERIAL E MÉTODOS

Estratégias de pesquisa

A revisão sistemática seguiu recomendações do diagrama de fluxo PRISMA, conforme sugerido por MOHER et al., (2009).

A pesquisa foi realizada por meio de quatro bases de dados: MEDLINE/PubMed, Science Direct, Scopus e Web of Science. Utilizando os termos de busca: (mastitis ou intramammary infection); (goat milk); (goat ou caprine ou small ruminants) e (*Staphylococcus*) e (potential antimicrobial) e (activity antimicrobial). Todas as publicações encontradas foram exportadas em um arquivo “BibTex” para o Zotero®, gestor bibliográfico, no qual foram excluídos os trabalhos duplicados e posteriormente foi realizada a leitura dos títulos e resumos. Foram identificados e selecionados artigos completos e comunicações curtas que consideravam novas estratégias antimicrobianas contra *Staphylococcus* spp. causadores de mastite caprina. Houve restrição quanto ao ano de publicação - 2006 a 2021, contudo, não houve restrição de idioma.

Critérios de inclusão e exclusão

Foram pré-estabelecidos os seguintes critérios de inclusão dos trabalhos: trabalhos completos, comunicações breves, trabalhos com 15 anos de publicação, estudos englobando *Staphylococcus* spp. oriundos de mastite caprina. E critérios de exclusão: capítulo de livros, manuais técnicos, resumos de congressos, relato de caso isolado, revisão bibliográfica, *Staphylococcus* spp. isolados de humanos e outros ruminantes, além de estudos que não abranjam mastite. Títulos e resumos foram analisados com base nos critérios acima estabelecidos.

Triagem e análise de dados

Para assegurar a confiabilidade dos dados, uma planilha foi desenvolvida, contendo informações sobre o título, autores, ano de publicação, país de origem, número de amostras, principais estratégias antimicrobianas e resultados satisfatórios.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 637 trabalhos foram encontrados nas bases de dados: Web of Science (7), PubMed (3), Science Direct (627) e Scopus (0). Após a verificação dos critérios de inclusão e exclusão, o total de 129 trabalhos foram selecionados para nova análise. No entanto, após a leitura dos resumos, foram selecionados apenas quatro artigos que contemplavam a temática de interesse deste estudo, tornando inviável a realização de um estudo de revisão sistemática de qualidade. A utilização de termos diversos pode tornar a pesquisa mais específica ou restrita, porém, esta estratégia não foi a mais efetiva para esta revisão.

Deste modo, um segundo levantamento foi executado nas bases de dados anteriormente citadas, modificando os termos anteriormente utilizados, para “*Goat Mastitis*”.

A partir dessa nova busca, foram obtidos 2.740 estudos, os quais foram considerados elegíveis por meio da aplicação dos critérios inclusivos e exclusivos. Em concordância com a adoção dos critérios, foram selecionados 2.337 trabalhos, no entanto, deste total foi verificado uma abrangência de 540 artigos envolvendo mastite bovina e 385 artigos abordando mastite em outras espécies, além disso, alguns estudos apresentavam outras finalidades (n=860) as quais não eram objeto desse estudo. Foi possível observar mediante a triagem, o aparecimento de estudos que não englobavam mastite (n=311) e os patógenos de interesse (n=226). Por fim, foram obtidos 15 estudos para realizar a revisão sistemática (Fig 1).

Com a aplicação de apenas 1 (um) termo de busca, foi possível obter uma gama de estudos voltados a temática de interesse. PEREIRA & GALVÃO, (2014) sugerem à adoção de estratégias simples como as mais adequadas, assegurando-se da relevância de cada termo inserido e seu impacto na busca. Contudo, estes autores apontam que as restrições aplicadas nos estudos de revisão sistemática podem levar a perda de estudos potencialmente importantes, desta forma às limitações devem ser utilizadas com cautela.

Pôde-se observar que 53,3% dos estudos são desenvolvidos por pesquisas brasileiras. Visto que, no Brasil, a produção de leite de cabra tem importância na geração de emprego e renda (DEGALDO JUNIOR et al., 2020). O Brasil apresenta 0.98% do rebanho caprino mundial, ocupando a 22ª posição (EMBRAPA, 2021). A região Nordeste concentra 94,6% do rebanho nacional de caprinos (IBGE, 2019). Nesta região, a caprinocultura apresenta-se de maneira mais expressiva como atividade de subsistência, desta forma surge a necessidade de mais estudos envolvendo as principais problemáticas desta produção, como a mastite. Justificando, desse modo, uma maior concentração de estudos nacionais voltados ao controle dessa enfermidade utilizando novas alternativas.

Em relação aos patógenos causadores de mastite caprina, é visto que, as bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. são as mais prevalentes nos estudos. ACOSTA et al., (2016), observaram que *Staphylococcus* spp. constituem-se como um dos principais microrganismos causadores de mastites nas diferentes regiões do país.

Dentre as técnicas empregadas 62,5% está relacionada à técnica de microdiluição em caldo, seguida de 18,75% da técnica difusão em disco, enquanto as demais técnicas são representadas por 6,25% do total. BONA et al., (2014) destacam que a técnica de microdiluição em caldo apresenta um maior potencial reprodutível, menos oneroso e demonstra confiabilidade em testes que avaliem principalmente a atividade de extratos. Ademais, o método de microdiluição em caldo é descrito em documentos publicados pelo “Clinical and Laboratory Standards Institute” - CLSI, a exemplo do M07 que descreve métodos de diluição para determinar atividade antimicrobiana (CLSI, 2018). Além de ser uma técnica quantitativa, é considerada de maior precisão quanto à avaliação do efeito antimicrobiano (KLANCNIK et al., 2010).

Foi visto que a técnica de difusão em disco (18,75%) é a segunda técnica utilizada pelos estudos avaliados nesta revisão. Apesar da facilidade de execução e de apresentar-se em

documentos elaborados pelo CLSI, a técnica de difusão em disco em ágar, apresenta limitações quando deseja-se determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM), pois não é possível quantificar o agente antimicrobiano difundido no meio do ágar (BALOUIRI et al., 2016).

Desta forma, Araújo et al., (2011) observaram que o método de difusão em disco não é adequado, uma vez que não permite estimar a quantidade precisa de absorção dos extratos, uma vez que pode ocorrer o extravasamento do extrato no meio de cultura, dificultando a interpretação dos resultados.

Diante das técnicas utilizadas, as alternativas antimicrobianas descritas são: exploração de extratos de plantas (75% dos estudos), produtos meliponários (20%), seguido das nanopartículas (10%) e óleos essenciais (10%). A exploração de extratos de plantas destaca-se como potencial estratégia antimicrobiana nesse estudo de revisão. Dentre as plantas utilizadas, pode-se ressaltar àquelas pertencentes à família Fabacea.

Para OLIVEIRA et al., (2019) a utilização de fitoterápicos tem sido considerado mundialmente notória, principalmente pela busca de substâncias que não apresentem natureza tóxica, mostrem-se mais eficazes contra a pressão de seleção de cepas resistentes. Segundo MORDMUANG et al., (2019), existe uma vasta aplicabilidade das plantas medicinais visando o tratamento de algumas doenças infecciosas, além disso, os extratos vegetais são caracterizados em potencial como novas substâncias antibacterianas.

Nesta revisão, observou-se que o uso de extratos de plantas visando à erradicação de agentes patogênicos da mastite caprina, é mais expressivo em estudos brasileiros, principalmente na região Nordeste, devido à ampla incidência de espécies em potencial nesta região (PAIVA et al., 2015; PEIXOTO et al., 2016; VIEIRA et al., 2018; SOUSA et al., 2020).

Segundo CARELLI et al., (2011) a descoberta de plantas endêmicas com potencial fitoterápico torna-se cada vez mais importante, devido a necessidade de novos fármacos, os quais demonstrem ser de qualidade e economicamente viáveis. Contudo, é de grande relevância, que as pesquisas envolvendo plantas medicinais, realizem testes de toxicidade (NGUTA, 2012). Uma vez que, a presença de alguns compostos naturais pode apresentar toxicidade ao homem e ao meio ambiente (FREITAS et al., 2019). Neste estudo de revisão, apenas SOUSA et al., (2020) avaliaram a toxicidade dos extratos utilizados, dos quais o EEB (Extrato Etanólico Bruto) da jurema preta, apresentou uma DL50 de 118,35 $\mu\text{g mL}^{-1}$, considerado como tóxico e o EEB de umburana de cambão apresentou-se como atóxico (DL50 = 1527,43 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Além desse entrave envolvendo as pesquisas com extratos de plantas, pode-se observar que existe a descontinuidade de estudos e fragmentação de resultados, os quais inviabilizam os avanços na exploração do potencial antimicrobiano da flora brasileira (Peixoto et al., 2016).

Outra alternativa com base na exploração vegetal, é a utilização de óleos essenciais. Esses podem ser extraídos de diversas fontes, a exemplo de vegetais superiores e condimentos (FRATINI et al., 2014; AIEMSAARD et al., 2021). Por fim, LILLEHOJ et al., (2018) destacam a importância dos fitoquímicos nos esforços globais, que objetivam a redução do uso de antibióticos na produção animal.

Além desses, é possível citar a aplicação das nanopartículas (NPs) como terapia antimicrobiana. Esta nanotecnologia está relacionada ao uso de material natural, manufaturado ou sintetizado, capaz matar as bactérias por meio de adesão às suas paredes celulares. Com isso, visualiza-se uma expectativa sobre às NPs por apresentarem uma menor propensão à resistência bacteriana (WANG et al., 2017; DURÁN et al., 2019; ELBEHIRY et al., 2019). Em exemplificação, têm-se as nanopartículas de prata, um dos nanomateriais mais

estudados atualmente, amplamente utilizadas na indústria e comércio, devido às suas propriedades (DURÁN et al., 2019; YUAN et al., 2017).

Apenas dois estudos selecionados relataram atividade antimicrobiana por meio desta tecnologia. Contudo, é fundamental atentar-se para os efeitos tóxicos. Estes efeitos são variáveis, dependendo de fatores como: tipo ou tamanho de NPs, método de síntese ou condições (YAH & SIMATE, 2015; KALIŃSKA et al., 2019).

Apesar do inexpressivo número de estudos voltados à alternativas antimicrobiana para mastite caprina. Vale salientar que a caprinocultura é uma atividade em ascensão, porém, é impactada por problemas de origem econômico, social e sanitária, como a mastite. Dessa forma, é relevante que os pesquisadores continuem buscando novas estratégias de tratamento para esta enfermidade.

CONCLUSÃO

Este estudo de revisão sistemática fornece informações relevantes sobre efetivas alternativas antimicrobianas para o tratamento da mastite. Apesar do número inexpressivo de trabalhos, o uso de extratos de plantas pode ser promissor, assim, é importante a continuidade desses estudos e o diálogo entre os grupos de pesquisa, uma vez que os resultados satisfatórios possibilitam um direcionamento para potenciais terapias antimicrobianas.

AGRADECIMENTOS

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão da bolsa de Pós-graduação.

DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSES

Não temos nenhum conflito de interesse a declarar.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Todos os autores contribuíram igualmente para a concepção e redação do manuscrito. Todos os autores revisaram criticamente o manuscrito e aprovaram a versão final.

REFERÊNCIAS

ACOSTA, A. C. et al. Mastites em ruminantes no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.36, p. 565–573, 2016. Disponível em: < <https://www.scielo.br/j/pvb/a/sTnKKCCMgPWxTmFM3NzDfdq/?lang=pt>>. Acesso: Maio, 05, 2021. doi: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2016000700001>.

AIEMSAARD, J.; JARASSAENG, C., The effect of some essential oils against subclinical mastitis bacteria isolated from dairy goats. **Chiang Mai University Journal of Natural Sciences**, v. 20, p. 1-10, 2021. Disponível em: < https://cmuj.cmu.ac.th/cmuj_journal/journal_de.php?id=692>. Acesso: Maio, 05, 2021. doi: <https://doi.org/10.12982/CMUJNS.2021.009>.

ARAÚJO, Y.L.F.M. Comparação entre duas técnicas utilizadas no teste de sensibilidade antibacteriana do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha. **Scientia Plena**, v. 7, n. 4, p. 1-4, 2011. Disponível em: < <https://www.scientiaplenu.org.br/sp/article/view/376/124>>. Acesso: Maio, 17, 2021.

BALOUIRI, M. et al. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, p. 71–79, 2016. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2095177915300150>> Acesso: Maio, 17, 2021. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>

BARLOW, J. Mastitis therapy and antimicrobial susceptibility: a multispecies review with a focus on antibiotic treatment of mastitis in dairy cattle. **Journal Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 16, p. 383–407, 2011. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21984469/>> Acesso: Maio, 17, 2021. doi: <https://doi.org/10.1007/s10911-011-9235-z>.

BONA, E.A.M.D. et al. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivo do Instituto de Biologia**, v. 81, p. 218–225, 2014. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/aib/a/mwDLMCbVGPRvH4gdFNJMV4F/abstract/?lang=pt>>. Acesso: Maio, 17, 2021. doi: <https://doi.org/10.1590/1808-1657001192012>.

OLIVEIRA, S.C.C. et al. Extratos de plantas brasileiras no controle da bactéria *Staphylococcus aureus* causadora da mastite contagiosa em bovinos leiteiros. **Revista Tecnológica**, v. 27, p. 48–58, 2019. Disponível em: <<https://periodicos.uem.br/ojs/index.php/RevTecnol/article/view/43745/751375148499>>. Acesso: Maio, 17, 2021. doi: <https://doi.org/10.4025/revtecnol.v27i1.43745>.

CARELLI, G. et al. Avaliação preliminar da atividade antimicrobiana do extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. - Hil.) obtido por extração com CO₂ supercrítico. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, p. 110–115, 2011. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rbpm/a/nLZn8pP7tpdWVXRY46DZTXh/?lang=pt>>. Acesso: Maio, 17, 2021. doi: <https://doi.org/10.1590/S1516-05722011000100016>.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**. 2018. 11th ed. CLSI standard M07. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018. Disponível em: <https://clsi.org/media/1928/m07ed11_sample.pdf>. Acesso: Maio, 17, 2021.

CONTRERAS, A. et al. Mastitis in small ruminants. **Small Ruminant Research**, v. 68, p. 145–153, 2007. Disponível em: <<https://pubag.nal.usda.gov/download/10816/PDF>> Acesso: Maio, 17, 2021. doi: <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2006.09.011>.

DURÁN, N. et al. Nanotoxicology of silver nanoparticles: toxicity in animals and humans. **Química Nova**, v. 42, p. 206–213, 2019. Disponível em: <http://old.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-0422019000200206&script=sci_abstract&tlng=en> Acesso: Maio, 17, 2021. doi: <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170318>.

EMBRAPA CAPRINOS E OVINOS. Centro de Inteligência e Mercado de Caprinos e Ovinos. **Produção Mundial**. 2021. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/cim-inteligencia-e-mercado-de-caprinos-e-ovinos/producao-mundial>>. Acesso: Julho, 17, 2021.

ELBEHIRY, A. et al. Antibacterial effects and resistance induction of silver and gold nanoparticles against *Staphylococcus aureus*-induced mastitis and the potential toxicity in rats. **MicrobiologyOpen**, v. 8, p. 1-16, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30079629/>> Acesso: Julho, 17, 2021. doi: <https://doi.org/10.1002/mbo3.698>.

FRATINI, F. et al. Antibacterial activity of essential oils, their blends and mixtures of their main constituents against some strains supporting livestock mastitis. **Fitoterapia**, v. 96, p. 1–7, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24727086/>> Acesso: Julho, 17, 2021. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2014.04.003>.

FREITAS, V.M. et al. Avaliação da atividade tóxica e citotóxica de extratos da planta *Syzygium malaccense* (L.) Merr. & Perry. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v. 6, p. 67-80, 2019. Disponível em: <<file:///C:/Users/CleitonRoberto/Downloads/2253-Texto%20do%20artigo-6290-1-100190731.pdf>> Acesso: Julho, 17, 2021.

GOMES, F.; HENRIQUES, M., Control of Bovine Mastitis: Old and Recent Therapeutic Approaches. **Current Microbiology**, v. 72, p. 377–382, 2016. Disponível em: < <https://link.springer.com/article/10.1007/s00284-015-0958-8>> Acesso: Julho, 17, 2021. doi: <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0958-8>

HOEKSTRA, J. et al. Differences between *Staphylococcus aureus* lineages isolated from ovine and caprine mastitis but not between isolates from clinical or subclinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 102, p. 5430–5437, 2019. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30981476/>> Acesso: Julho, 17, 2021. doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2018-16196>

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Produção Pecuária Municipal**. 2019. Disponível em: < <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html?=&t=destaques>>. Acesso: Julho, 17, 2021.

KALIŃSKA, A. et al. Silver and Copper Nanoparticles - An Alternative in Future Mastitis Treatment and Prevention?. **International Journal Molecular Science**, v. 20, p. 1672, 2019. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6480535/>> Acesso: Julho, 17, 2021. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms20071672>.

KLANCNIK, A. et al. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. **Journal of Microbiological Methods**, v. 81, p. 121–126, 2010. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0167701210000618>> Acesso: Julho, 17, 2021. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.02.004>.

KOOP, G. et al. Differences between coagulase-negative *Staphylococcus* species in persistence and in effect on somatic cell count and milk yield in dairy goats. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 5075–5084, 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030212005218>> Acesso: Julho, 17, 2021. doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5615>.

LILLEHOJ, H. et al. Phytochemicals as antibiotic alternatives to promote growth and enhance host health. **Veterinary Research**, v. 49, p. 1-18, 2018. Disponível em: <<https://veterinaryresearch.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13567-018-0562-6>> Acesso: Julho, 17, 2021. doi: <https://doi.org/10.1186/s13567-018-0562-6>.

LIMA, M.C. et al. Profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from goat persistent mastitis before and after treatment with enrofloxacin. **BMC Microbiol**, v. 20, p. 1-11, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7245832/pdf/12866_2020_Article_1793.pdf> Acesso: Julho, 17, 2021. doi: <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01793-9>

MAHLANGU, P. et al. Prevalence, risk factors, and antibiogram of bacteria isolated from milk of goats with subclinical mastitis in thika east subcounty, Kenya. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 2018, p. 1-8, 2018. Disponível em: <<https://downloads.hindawi.com/archive/2018/3801479.pdf>> Acesso: Julho, 17, 2021. doi: <https://doi.org/10.1155/2018/3801479>.

MOHER, D. et al. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. **Plos Medicine**, v. 6, p. 1-6, 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2707599/pdf/pmed.1000097.pdf>> Acesso: Julho, 17, 2021. doi: <https://doi.org/10.1136/bmj.b2535>.

MORDMUANG, A. et al. Evaluation of a *Rhodomyrtus tomentosa* ethanolic extract for its therapeutic potential on *Staphylococcus aureus* infections using in vitro and in vivo models of mastitis. **Veterinary Research**, v. 50, p. 1-11, 2019. Disponível em: <file:///C:/Users/CleitonRoberto/Downloads/s13567-019-0664-9.pdf> Acesso: Julho, 17, 2021. doi: <https://doi.org/10.1186/s13567-019-0664-9>.

NGUTA, J.M. et al. Evaluation of acute toxicity of crude plant extracts from kenyan biodiversity using brine shrimp, *Artemia salina* L. (Artemiidae). **The Open Conference Proceedings Journal**, v. 3, p. 30–34, 2012. Disponível em: <<https://benthamopen.com/ABSTRACT/TOPROJ-3-2-30>> Acesso: Julho, 17, 2021. doi: <https://doi.org/10.2174/2210289201203010030>.

PAIVA, W.D.S. et al. Atividade antibacteriana da casca do jucá (*Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz), frente a *Staphylococcus* spp. isolados do leite de cabras com mastite. **Archives of Veterinary Science**, v. 20, p. 141-146, 2015. Disponível em: <<https://revistas.ufpr.br/veterinary/article/view/40422/26601>> Acesso: Julho, 17, 2021. doi: <https://doi.org/10.5380/avs.v20i2.40422>.

PEIXOTO, R.M. et al. Mastite em pequenos ruminantes no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, p. 754–762, 2010. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/pvb/a/YbNK3hKRRp9PXRbx7Phvh9C/?format=pdf&lang=pt>> Acesso: Julho, 17, 2021. doi: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2010000900008>.

PEIXOTO, R.M. et al. Antibacterial potential of native plants from the caatinga biome against *Staphylococcus* spp. isolates from small ruminants with mastitis. **Revista Caatinga**, v. 29, p. 758–763, 2016. Disponível em: <

<https://www.scielo.br/j/rcaat/a/6wgvLHNGJK5v9YsSNBVyRtL/?format=pdf&lang=en>

Acesso: Julho, 17, 2021. doi: <https://doi.org/10.1590/1983-21252016v29n328rc>.

PEREIRA, C.S. et al. Mastite por contagem de células somáticas e isolamento bacteriano em cabras negativas para *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 38, p. 99–104, 2016. Disponível em: < file:///C:/Users/CleitonRoberto/Downloads/254-Final%20version%20-%20complete-394-562-10-20171011.pdf> Acesso: Julho, 17, 2021. doi: <https://doi.org/10.2430/0000000000000000>.

PEREIRA, M.G.; GALVÃO, T.F. Etapas de busca e seleção de artigos em revisões sistemáticas da literatura. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 23, p. 369–371, 2014.

Disponível em: <

<https://www.scielo.br/j/ress/a/JsrzXSjNydMpnBtCg4jNcJQ/?format=pdf&lang=pt>>

Acesso: Julho, 17, 2021. doi: <https://doi.org/10.5123/S1679-49742014000200019>

RADZIKOWSKI, D. et al. Alternative solutions to antibiotics in mastitis treatment for dairy cows - A review. **Animal Science Papers and Reports**, v. 38, p. 117–133, 2020. Disponível em: < file:///C:/Users/CleitonRoberto/Downloads/str117-134.pdf> Acesso: Julho, 17, 2021.

SOUSA, M.M. et al. Antimicrobial potential of Jurema preta and umburana, native species of the caatinga biome, on *Staphylococcus* isolated from small ruminants with mastitis. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 41, p. 2231–2244, 2020. Disponível em: <

<https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/vti-764798>> Acesso: Julho, 17, 2021. doi:

<https://doi.org/10.5433/1679-0359.2020v41n5supl1p2231>.

Vieira, D.S. et al. Atividade antimicrobiana in vitro do extrato etanólico bruto da folha da *Hymenaea martiana* Hayne frente às *Staphylococcus* spp. e avaliação de seu potencial como desinfetante em cabras. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, p. 462–469, 2018. Disponível

em: < <https://www.scielo.br/j/pvb/a/GDRVWMmVFvFxxqTVb9CRRkc/abstract/?lang=pt>>

Acesso: Julho, 17, 2021. doi: <https://doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-4547>.

WANG, L. et al. The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 1227–1249, 2017.

Disponível em: < <https://www.dovepress.com/the-antimicrobial-activity-of-nanoparticles-present-situation-and-pros-peer-reviewed-fulltext-article-IJN#>> Acesso: Julho, 17, 2021.

doi: <https://doi.org/10.2147/IJN.S121956>.

YAH, C.S.; SIMATE, G.S. Nanoparticles as potential new generation broad spectrum antimicrobial agents. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 23, p. 1-14, 2015.

Disponível em: <

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4557602/pdf/40199_2015_Article_125.pdf>

Acesso: Julho, 17, 2021. doi: <https://doi.org/10.1186/s40199-015-0125-6>.

YUAN, Y.G. et al. Effects of silver nanoparticles on multiple drug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* from mastitis-infected goats: an alternative approach for antimicrobial therapy. **International Journal Molecular of Sciences**, v. 18, p. 1-22, 2017. Disponível em: <

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5372585/pdf/ijms-18-00569.pdf>>

Acesso: Julho, 17, 2021. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms18030569>.

Tab. 1. Aspectos gerais sobre as alternativas antimicrobianas encontradas nos artigos selecionados.

| Referências | País | Número amostral (n=) | Alternativas antimicrobianas | Origem | Resultados satisfatórios |
|--------------------------------|-----------|----------------------|------------------------------|---|---|
| Souza Paiva, W. et al., 2015 | Brasil | 18 | Extrato da Planta | <i>Libidibia ferrea</i> (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz | Inibição de <i>S. aureus</i> |
| Fratini, F. et al., 2014 | Itália | 6 | Óleos essenciais | <i>Cinnamomum zeylanicum</i> L.; <i>Citrus bergamia</i> Risso.; <i>Eucalyptus globulus</i> Labill.; <i>Foeniculum vulgare</i> Mill.; <i>Origanum majorana</i> L.; <i>Origanum vulgare</i> L.; <i>Rosmarinus officinalis</i> L.; <i>Satureja montana</i> L.; <i>Thymus vulgaris</i> L. ct. carvacrol.; <i>Thymus vulgaris</i> L. ct. thymol. | Atividade antimicrobiana (<i>Satureja montana</i> L, <i>Thymus vulgaris</i> L. ct. thymol.; e <i>Origanum vulgare</i> sinergismo de ST) |
| Widianigrum, D. C et al., 2019 | Indonésia | 1 | Óleos | Óleo de coco virgem | Inibição de <i>S. aureus</i> |
| Silva et al., 2012 | Brasil | 20 | Produto meliponário | Própolis | Atividade antimicrobiana (diluente álcool de cereais) |
| Peixoto, R. D. M et al., 2016 | Brasil | 125 | Extrato da Planta | <i>Encholirium spectabile</i> Mart.; <i>Bromelia laciniosa</i> Mart.; <i>Neoglaziovia variegata</i> Mez.; <i>Amburana cearensis</i> (Fr. Allem.) AC Smith.; <i>Hymenaea martiana</i> Hayne.; <i>Selaginella convoluta</i> . | Atividade antimicrobiana (<i>U. cearensis</i> (88,1 %) e <i>H. martiana</i> (99,4%)) |
| Dal Pozzo D. M. et al., 2011 | Brasil | 33 | Óleos essenciais | <i>Origanum vulgare</i> .; <i>Thymus vulgaris</i> .; <i>Lippia graveolens</i> .; <i>Zingiber officinale</i> .; <i>Salvia officinalis</i> .; <i>Rosmarinus officinalis</i> .; <i>Ocimum basilicum</i> . | Atividade antimicrobiana (<i>Origanum vulgare</i> .; <i>Thymus vulgaris</i> .; <i>Lippia graveolens</i>) |
| Bourabah, A. et al., 2014 | Argélia | 24 | Produto meliponário | Mel argeliano | Atividade antimicrobiana |
| Santos, H.C. et al., 2019 | Brasil | 34 | Produto meliponário | Própolis | Atividade antimicrobiana do extrato etanólico (72,67%), extrato de acetato de etila (56,49%) e extrato hexânico (10,29%) |
| Sousa, M.M. et al., 2020 | Brasil | 26 | Extrato da Planta | <i>Mimosa tenuiflora</i> .; <i>Commiphora leptophloeos</i> | <i>A. M. tenuiflora</i> suprimiu 100% dos isolados bacterianos e o extrato de <i>C. leptophloeos</i> apresentou um percentual de inibição de 69,23% |
| Acosta, A.C. et al., 2020 | Brasil | 26 | Nanopartículas | Nanopartículas de polipirrol (PPy-NPs) | Atividade bactericida das PPy-NPs em água (125µg/mL) |
| Yuan, Y. G, et al 2017 | China | 1 | Nanopartículas | Nanopartículas de prata (sintetizada) | AgNPs sintetizados biologicamente foram eficazes contra as bactérias testadas. |
| Vieira, D. S. V. et al., 2018 | Brasil | 18 | Extrato da Planta | <i>Hymenaea martiana</i> | Atividade antimicrobiana do extrato diluído em álcool etílico absoluto e água destilada |

| | | | | | |
|---|-----------|-----|------------------|---|--|
| Mishra, A. K. et al., 2014 | Índia | 124 | Fagos | Bacteriófagos | atividade litica de três dos isolados de bacteriófagos : <i>Fago S. aureus / CIRG / 1</i> , <i>fago S. aureus / CIRG / 4</i> e <i>fago S. aureus / CIRG / 5</i> contra mais de 80% dos isolados estafilocócicos. |
| Gutiérrez - Chávez, A. J. et al., 2015 | México | 3 | Bacteriocinas | <i>Bacillus thuringiensis subsp. morrisoni (LBIT 269)</i> .; <i>B. thuringiensis subsp. kurstaki (LBIT 287)</i> .; <i>B. thuringiensis subsp. kenyae (LBIT 404)</i> .; <i>B. thuringiensis subsp. entomocidus (LBIT 420)</i> .; <i>B. thuringiensis subsp. tolworthi (LBIT 524)</i> | Atividade antimicrobiana pelas bacteriocinas de <i>B. thuringiensis</i> (60%) |
| Aiensaard, J. et al., 2021 | Tailândia | 40 | Óleos essenciais | <i>Cymbopogon citratus</i> .; <i>Citrus hystrix</i> .; <i>Ocimum basilicum</i> | O óleo essencial de capim-limão tem potencial para ser desenvolvido como um agente antibacteriano |

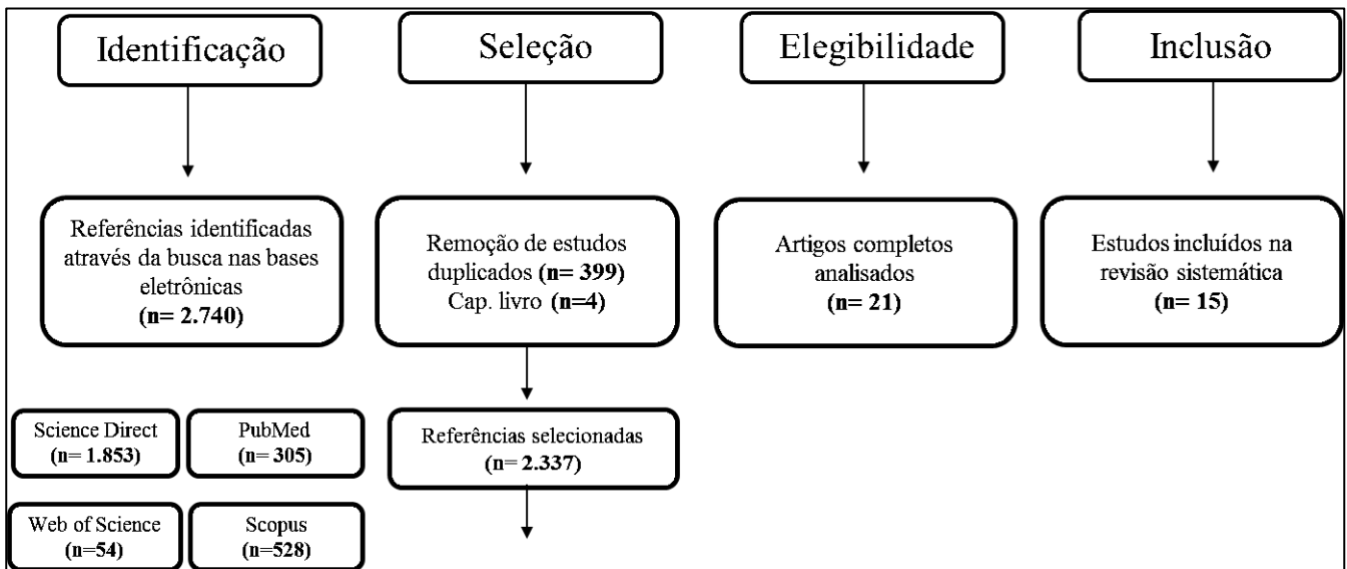


Fig. 1. Fluxograma da busca, seleção e inclusão dos estudos na revisão sistemática.

CAPÍTULO II

Caracterização fenogenotípica da resistência e produção de biofilme de *Staphylococcus* spp. isolados de casos de mastite subclínica em cabras criadas no semiárido nordestino

Trabalho a ser submetido à Revista Ciência Rural

Caracterização fenogenotípica da resistência e produção de biofilme de *Staphylococcus* spp. isolados de casos de mastite subclínica em cabras criadas no semiárido nordestino

Phenogenotypic characterization of bacterial and biofilm production of *Staphylococcus* spp. isolated from cases of subclinical mastitis in goats reared in the northeastern semiarid

Renata de Moraes Peixoto Araújo^{1*} Maura Marinete Sousa³ Rodolfo de Moraes Peixoto²

Bruna Crislane da Silva Souza³ Daniel Maia Nogueira⁴ Beatriz Nascimento Araújo³

Gisele Veneroni Gouveia³ Mateus Matiuzzi da Costa³ Felício Garino Júnior¹ Eldinê

Gomes de Miranda Neto¹

RESUMO

Devido a importância de *Staphylococcus* spp. nos casos de mastite caprina, o objetivo desse trabalho foi comparar as técnicas de identificação das espécies, verificar a presença de marcadores de resistência aos antimicrobianos e à produção de biofilme dos isolados. Para isso, foram coletadas 264 amostras de leite caprino. Após o isolamento bacteriano, trinta e um *Staphylococcus* spp. foram submetidos a espectrometria de massa (MALDI-TOF MS), a pesquisa do gene *nuc*, além da caracterização fenotípica e molecular para resistência (*blaZ* e *mecA*) e produção de biofilme (*icaA*, *icaD* e *bap*). A lactocultura demonstrou crescimento bacteriano em 16,3% (43/264) das amostras de leite, comprovando a presença da mastite subclínica, ocasionada principalmente por *Staphylococcus* spp. O MALDI-TOF MS identificou quatro isolados pertencentes ao grupo dos SCP e 27 como SCN. A análise estatística indicou concordância ruim entre as técnicas de MALDI-TOF MS e a pesquisa do gene *nuc*. Com isso,

¹ Universidade Federal de Campina Grande, Hospital Veterinário Universitário/UFCG, Av. Universitária, s/n, bairro Santa Cecília, CEP: 58708-110, Patos/PB, Brasil. E-mail: renatavet_peixoto@hotmail.com. Autor para correspondência.

² IF Sertão Petrolina, Campus Zona Rural, Petrolina/PE, Brasil.

³ Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF, Campus Ciências Agrárias, Petrolina/PE, Brasil.

⁴ Embrapa Semiárido, Petrolina/PE, Brasil.

os autores sugerem o uso simultâneo de outros iniciadores. Os isolados demonstraram maior resistência à penicilina (9/31) e a tetraciclina (7/31) e um *S. aureus* resistente à cefoxitina. Na pesquisa do gene *blaZ*, 64,5% dos isolados apresentaram tal gene. As análises *in vitro* puderam demonstrar que todos os isolados formaram biofilme e o gene *bap* estava presente em 22,5% dos isolados. Desta forma, vale salientar a importância dos SCN na etiologia da mastite subclínica em caprinos, uma vez que demonstraram a capacidade de produzir biofilme e de carrear genes de resistência.

Palavras-chave: MALDI-TOF MS, resistência bacteriana, biofilme, mastite caprina.

ABSTRACT

Due to the importance of *Staphylococcus* spp. in cases of goat mastitis, the objective of this study was to compare the techniques of species identification, verify the presence of antimicrobial resistance markers and the biofilm production of the isolates. For this, 264 samples of goat milk were collected. Thirty-one *Staphylococcus* spp. were subjected to mass spectrometry (MALDI-TOF MS), *nuc* gene research, in addition to phenotypic and molecular characterization for resistance (*blaZ* and *mecA*) and biofilm production (*icaA*, *icaD* and *bap*). The lactoculture showed bacterial growth in 16.3% (43/264) of the milk samples, proving the presence of subclinical mastitis, caused mainly by *Staphylococcus* spp. MALDI-TOF MS identified four isolates belonging to the SCP group and 27 as SCN. The statistical analysis indicated poor agreement between the MALDI-TOF MS techniques and the *nuc* gene search. Thus, the authors suggest the simultaneous use of other initiators. The isolates showed greater resistance to penicillin (9/31) and tetracycline (7/31) and a cefoxitin-resistant *S. aureus*. In the search for the *blaZ* gene, 64.5% of the isolates had this gene. *In vitro* analyzes could demonstrate that all isolates formed biofilm and the *bap* gene was present in 22.5% of the isolates. Thus, it is worth emphasizing the importance of CNS in the etiology of subclinical

mastitis in goats, since they have demonstrated the ability to produce biofilm and to carry resistance genes.

Keywords: MALDI-TOF MS, bacterial resistance, biofilm, goat mastitis.

INTRODUÇÃO

A mastite é uma inflamação da glândula mamária, que apresenta múltiplos agentes etiológicos (PEIXOTO et al. 2010). Em casos de mastite clínica, o patógeno *Staphylococcus aureus* é considerado o agente causador mais comum de mastite caprina, contudo, o SCN – *Staphylococcus coagulase negativos* são os mais prevalentes em casos de mastite subclínica (DORE et al. 2016). Para a identificação dessas espécies, são feitos testes fenotípicos. Contudo, alguns métodos podem demorar dias para serem concluídos, além de produzir resultados difíceis de interpretar, portanto, é necessário um sistema de identificação rápido e confiável (ALATOOM et al. 2011).

Desta forma, novos métodos de diagnósticos são necessários, exemplo da técnica de desorção/ionização a laser assistida por matriz seguida de espectrometria de massas por *tempo de voo* (MALDI-TOF MS) considerada uma ferramenta de identificação microbiana mais rápida (MANUKUMAR & UMESHA, 2017). E a PCR (*Polymerase Chain Reaction*) também é uma ferramenta de grande importância para a identificação microbiana. Contudo, a PCR possui suas limitações (LANGE et al. 2011).

Além da importância de verificar corretamente o patógeno envolvido na inflamação intramamária, faz-se necessário investigar fatores de virulência, os quais provocam uma resposta inflamatória mais acentuada no úbere de cabras (GOSSELIN et al. 2020). Como exemplo, *Staphylococcus* spp. possuem diversos genes de resistência, como o *blaZ* (codifica a enzima beta-lactamase) *mecA*, *mecC* (modificam a proteína de ligação da penicilina, inibindo a ação do fármaco) além da capacidade de inibir ou reduzir a ação dos antibióticos por meio do biofilme e das bombas de efluxo (LAMUT et al. 2019; BLAIR et al. 2014).

Diante da diversidade de espécies de *Staphylococcus* spp. nos casos de mastite caprina, faz-se necessário utilizar técnicas fenotípicas e moleculares para uma identificação bacteriana mais precisa. Desta forma o objetivo desse trabalho foi de comparar as técnicas de identificação das espécies e verificar a presença de marcadores de resistência aos antimicrobianos e à produção de biofilme dos isolados.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de leite

Foram coletadas 264 amostras de leite caprino, em oito propriedades localizadas no Sertão de Pernambuco e 2 propriedades no Sertão da Bahia (Fig. 1). A coleta de leite foi realizada seguindo as recomendações do National Mastitis Council (NMC, 2004).

Identificação fenotípica – Staphylococcus spp.

A identificação prévia dos isolados foi realizada por meio da coloração de Gram, e a prova de catalase (Laborclin®). Trinta e um isolados de *Staphylococcus* spp. foram selecionados para a realização da prova da coagulase em tubos (Laborclin®) e encaminhados para o Laboratório Qualileite (FMVZ/USP) em Pirassununga, SP, para realizar o MALDI-TOF MS, seguindo protocolo descrito por BARREIRO et al. (2010).

Identificação genotípica – Staphylococcus spp.

O DNA foi extraído e purificado seguindo adaptações do protocolo descrito no Manual de Laboratório (2009). Os isolados foram testados quanto à presença de parte do gene *nuc* (KATEETE et al. 2010).

Estudo da resistência bacteriana em isolados de Staphylococcus spp.

O perfil de resistência dos microrganismos foi determinado pelo método de difusão em disco *Kirby-Bauer* modificado (CLSI, 2019). Foram utilizados discos impregnados com

penicilina G (10UI), oxacilina (1 µg), ceftriaxona (30µg), cefoxitina (30µg), azitromicina (15µg), ciprofloxacina (5µg), norfloxacina (10µg), gentamicina (10µg), tetraciclina (30µg) e lincomicina (2µg) (Laborclin®). A análise do potencial genético para resistência aos antimicrobianos foi realizada por meio da amplificação de partes dos genes: *blaZ*, *mecA* (Adaptado de SAWANT et al. 2009).

Caracterização fenotípica da formação de biofilme

A caracterização fenotípica para formação de biofilme dos isolados foi realizada por meio do teste de aderência em placa, seguindo os protocolos descritos por MERINO et al. 2009; STEPANOVIĆ et al. 2007; 2000 com adaptações. A caracterização molecular foi realizada por meio da amplificação de partes dos genes: *icaA*, *icaD* e *bap* (Adaptado de VASUDEVAN et al. 2003; CUCARELLA et al. 2001).

Análise estatística

Para avaliar a sensibilidade da PCR para o gene *nuc* na detecção de *S. aureus*, utilizou-se como “padrão ouro” o MALDI-TOF MS. Além da sensibilidade, foram calculadas a especificidade, valor preditivo positivo e negativo, acurácia e coeficiente *Kappa*. Valores de *Kappa* acima de 0,7 indicam concordância excelente; valores entre 0,4 e 0,7 indicam concordância moderada/boa e valores menores que 0,4 indicam concordância ruim (THRUSFIELD, 2005).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resultado da lactocultura demonstrou crescimento bacteriano em 16,3% (43/264) das amostras de leite, sugerindo a presença da mastite subclínica. Considerando a coloração de Gram e catalase, os microrganismos responsáveis pela mastite subclínica desses animais foram: *Staphylococcus* spp.: 36 (83,7%); *Micrococcus* spp.: 05 (11,6%); *Corynebacterium* spp.: 01 (2,3%) e *Bacillus* spp.: 01 (2,3%). Geralmente, a mastite caprina é causada por

bactérias do gênero *Staphylococcus*. Diante dos 31 *Staphylococcus* spp. selecionados, o teste da coagulase identificou quatro isolados pertencentes ao grupo dos SCP e os outros 27 como SCN. Semelhante aos resultados obtidos pelo MALDI-TOF MS (Fig. 2).

Logo, o maior número foi de SCN. Segundo RUIZ-ROMERO et al. (2017) a mastite de cabra é ocasionada principalmente pelo SNC. E de acordo com MACHADO et al. (2018), as infecções por SCN são mais compatíveis com a ausência de manifestações clínicas nos animais e constituem agentes significativos das mastites subclínicas em cabras. Além disso, os SCN estão envolvidos em casos de mastite persistente com o aumento de CCS (Contagem de Células Somáticas) (GOSSELIN et al. 2019; SUPRÉ et al. 2011).

Considerando o MALDI-TOF MS como padrão-ouro, a pesquisa de *S. aureus* por meio do gene *nuc* apresentou 100% de sensibilidade e apenas 37% de especificidade. Além da amplificação observada em quatro amostras de *S. aureus*, outros 12 isolados foram positivos para o gene. Conseqüentemente, o valor *Kappa* foi de 0,13 indicando concordância ruim entre as técnicas. No trabalho de ANDRADE et al. (2021) os autores também observaram a presença do gene *nuc* em SCN isolados de mastite caprina e ovina.

No entanto, os pesquisadores utilizam o gene *nuc* como marcador para identificação molecular de *S. aureus* (RANA et al. 2020; ACOSTA et al. 2018; MOURA et al. 2018; KATEETE et al. 2010). Contudo, um trabalho realizado por Saraiva et al. (2018), sugerem o uso simultâneo de iniciadores direcionados aos genes *femA*, *coa* e *nuc*.

Na caracterização fenotípica de resistência, os isolados demonstraram maior resistência à penicilina (9/31) e a tetraciclina (7/31). Embora a terapia antimicrobiana voltada para mastite nos rebanhos amostrados não seja tão comum, sabe-se da utilização da tetraciclina para outras infecções nestes pequenos ruminantes. Vale salientar, que todos os isolados que apresentaram resistência à penicilina e a tetraciclina são SCN. De acordo com SALABERRY et al. (2016) os estudos demonstram que os SCN podem apresentar-se mais

resistentes do que o *S. aureus*, além de demonstrar resistência a inúmeros antimicrobianos utilizados na medicina veterinária.

Um achado relevante foi a resistência de um isolado de *S. aureus* à cefoxitina. Conforme descrito pelo CLSI (2019) pode-se avaliar fenotipicamente a resistência de *S. aureus* à meticilina, por meio dos testes de difusão em disco e concentração inibitória mínima (CIM), utilizando a cefoxitina e oxacilina respectivamente. De acordo com SILVA et al. (2018) a meticilina não é um fármaco comumente utilizado no tratamento de mastites. Contudo, pode ocorrer a transmissão de MRSA (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) entre seres humanos e animais (vice-versa) e conseqüentemente, ocasionar graves problemas de saúde pública (RANA et al. 2020). Além disso, este isolado não apresentou o gene *mecA*. De acordo com PEREIRA et al. (2021) pode ocorrer a perda do gene ou outros mecanismos moleculares estão envolvidos.

Na pesquisa do gene *blaZ*, 64,5% dos isolados (20/31) apresentaram tal gene. O qual é encontrado em *Staphylococcus* spp. isolados de casos de mastite (ANDRADE et al. 2021; PÉREZ et al. 2020).

Ao avaliar a produção de biofilme, verificou-se que todos os isolados (31/31) produziram biofilme *in vitro*. Contudo, na pesquisa dos genes associados à produção de biofilme, seis isolados (6/31) apresentaram o gene *icaA*, quatro (4/31) foram positivos para *icaD* e sete isolados (7/31) apresentaram o gene *bap*. Estes resultados demonstram, que *Staphylococcus* spp. possui outros mecanismos de patogenicidade para formar biofilme sem carrear um gene específico (IBRAHIM et al. 2022).

CONCLUSÃO

A baixa especificidade de identificação de *S. aureus* pelo gene *nuc*, denota a importância de utilizar outros marcadores moleculares específicos. E, neste estudo, foram obtidos achados relevantes, tais como a resistência de *S. aureus* a cefoxitina. Contudo, vale

destacar a importância dos SCN, os quais demonstraram a capacidade de produzir biofilme, de carrear genes de resistência, assim, é preciso reforçar a importância deste grupo de microrganismos na etiologia da mastite subclínica em caprinos, além de gerar perspectivas para pesquisas que investigam a epidemiologia da doença.

AGRADECIMENTOS

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão da bolsa de Pós-graduação.

DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSES

Não temos nenhum conflito de interesse a declarar.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Todos os autores contribuíram igualmente para a concepção e redação do manuscrito. Todos os autores revisaram criticamente o manuscrito e aprovaram a versão final.

APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

Protocolo CEP/CEUA nº84-2017

REFERÊNCIAS

ACOSTA, A. C. et al. Frequency of *Staphylococcus aureus* virulence genes in milk of cows and goats with mastitis. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n.11, p.2029-2036, 2018.

Disponível em: <https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2018001102029>. Acesso: Maio, 4, 2020. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-5786>.

ALATOOM, A. A. et al. Comparison of Direct Colony Method versus Extraction Method for Identification of Gram-Positive Cocci by Use of Bruker Biotyper Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**, v.49, n.8, p. 2868–2873, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3147777/>>. Acesso: Maio, 4, 2020. doi: 10.1128/JCM.00506-11.

ANDRADE, N. C. et al. Virulence factors in *Staphylococcus* associated with small ruminant mastitis: Biofilm production and antimicrobial resistance genes. **Antibiotics**, v. 10, n. 6, p. 633, 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2079-6382/10/6/633>>. Acesso: Set, 13, 2022. doi: 10.3390/antibiotics10060633.

BARREIRO, J. R. et al. Identification of subclinical cow mastitis pathogens in milk by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Journal of dairy science**, v. 93, n. 12, p. 5661-5667, 2010. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030210006156>>. Acesso: Ago, 2, 2021. doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3614>.

BLAIR, J. M. A. et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**. v. 13, 2014. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrmicro3380>>. Acesso: Maio, 4, 2020. doi: 10.1038/nrmicro3380.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARD INSTITUTE (CLSI) **Performance Standard for Antimicrobial susceptibility Testing**. 2019. 29 th ed. CLSI Supplement M100, Wayne, Pennsylvania, Disponível em: <<https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100/>>. Acesso: Maio, 4, 2020.

DORE, S. et al. Survey on small ruminant bacterial mastitis in Italy, 2013–2014. **Small Ruminant Research**. v.141, p.91-93. 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0921448816301729?via%3Dihub>>. Acesso: Jun, 29, 2020. doi: <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.07.010>.

GOSSELIN, V. B. et al. Association between species-specific staphylococcal intramammary infections and milk somatic cell score over time in dairy goats. **Preventive Veterinary Medicine**. v.174, p.104815, 2020. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167587719304003>>. Acesso: Jun, 29, 2020. doi: <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2019.104815>.

GOSSELIN, V. B. et al. Longitudinal microbiological evaluation of subclinical non-aureus staphylococcal intramammary infections in a lentivirus-infected dairy goat herd. **Veterinary Microbiology**. v. 230, p. 156–163, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113518311611?via%3Dihub>>. Acesso: Jun, 29, 2020. doi: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.02.012>.

IBRAHIM, E. S. et al. Molecular characterization of genes responsible for biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cows. **Veterinary World**, v. 15, n. 1, p. 205, 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35369599/>>. Acesso: Set, 14, 2022. doi: [10.14202/vetworld.2022.205-212](https://doi.org/10.14202/vetworld.2022.205-212).

KATEETE, D. P. et al. Identification of *Staphylococcus aureus*: DNase and mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v.9, n.23, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2927478/>>. Acesso: Jul, 2, 2020. doi: [10.1186/1476-0711-9-23](https://doi.org/10.1186/1476-0711-9-23).

LAMUT, A. et al. Efflux pump inhibitors of clinically relevant multidrug resistant bacteria. **Medicinal Research Reviews**. v.45, 2019. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/med.21591>>. Acesso: Maio, 4, 2020. doi: <https://doi.org/10.1002/med.21591>.

LANGE, C. C. et al. Uso de PCR e sequenciamento do rDNA 16S para identificação de bactérias do gênero *Staphylococcus* isoladas de mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.31, n.1, p.36-40, 2011. Disponível em:

<https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2011000100006>

Acesso: Jul, 2, 2020. doi: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2011000100006>.

MACHADO, G. P. et al. Ocorrência, patógenos e fatores de risco para mastite subclínica em cabras leiteiras. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.70, n.5, p.1665-1670, 2018. Disponível em: <

<https://www.scielo.br/j/abmvz/a/wFX5P9RhMvcLNwFbpKzfyCR/?lang=pt>>. Acesso: Jun, 29, 2020. doi: <https://doi.org/10.1590/1678-4162-10169>.

MANUAL DE LABORATÓRIO. **Técnicas de biologia molecular aplicadas a produção animal**, 2009. 99p. (Boletim Técnico).

MANUKUMAR, H. M.; UMESHA, S. MALDI-TOF-MS based identification and molecular characterization of food associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Scientific Reports**. v.7, p.11414, 2017. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5595867/>>. Acesso: Maio, 4, 2020. doi: 10.1038/s41598-017-11597-z.

MERINO N. et al. Protein A-Mediated Multicellular Behavior in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v.191, n.23, p.832-843, 2009. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2632097/>>. Acesso: Maio, 4, 2020. doi: 10.1128/JB.01222-08.

MOURA, G. S. et al. Short communication: Occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci in dairy goat herds in Ohio, United States. **Journal of Dairy Science**. v.101, n.9, p.7804-7807, 2018. Disponível em: <
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30007804/>>. Acesso: Jun, 29, 2020. doi: 10.3168/jds.2017-13361.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL (NMC). **Microbiological Procedures for the Diagnosis of Bovine Udder Infection and Determination of Milk Quality**. [NMC publication, 2004. Disponível em: <<https://www.nmconline.org/nmc-protocols-guidelines-and-procedures/>>. Acesso: Jun, 29, 2020.

PEIXOTO, R. M. et al. Mastite em pequenos ruminantes no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.30, n.9, p.754-762, 2010. Disponível em: <https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2010000900008>. Acesso: Jul, 2, 2020. doi: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2010000900008>.

RANA, E. A. et al. Coagulase-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* circulating in clinical mastitic goats in Bangladesh. **Veterinary World**, v. 13, n. 7, p. 1303, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32848304/>>. Acesso: Set, 13, 2022. doi: [10.14202/vetworld.2020.1303-1310](https://doi.org/10.14202/vetworld.2020.1303-1310).

SALABERRY, S.R.S. et al. Análise microbiológica e perfil de sensibilidade do *Staphylococcus* spp. em mastite subclínica de caprinos leiteiros. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v.68, n.2, p.336-344, 2016. Disponível em: <https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S01020935201600020036&lng=en&tlng=pt>. Acesso: Maio, 4, 2020. doi: <https://doi.org/10.1590/1678-4162-8205>.

SARAIVA, M. M. et al. Accuracy of PCR targeting different markers for *Staphylococcus aureus* identification: a comparative study using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry as the gold standard. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v.30, n.2, p.252 –255, 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29105571/>>. Acesso: Maio, 4, 2020. doi: [10.1177/1040638717732370](https://doi.org/10.1177/1040638717732370).

SAWANT A. A. et al. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative *Staphylococcus* species isolated from bovine milk. **Veterinary Microbiology**. v.134, 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18950969/>>. Acesso: Maio, 4, 2020. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.09.006.

SILVA, J. G. et al. Mastite bovina causada por *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina: revisão de literatura. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, p. 223-228, 2018. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/pvb/a/fRjvfV9mzzdXVFpTresn5cc/abstract/?lang=pt>>. Acesso: Maio, 4, 2020. doi: 10.1590/1678-5150-PVB-4996.

STEPANOVIĆ, S. et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **Apmis**, v.115, n.8, p.891-899, 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17696944/>>. Acesso: Maio, 4, 2020. doi: 10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x .

STEPANOVIĆ, S. et al. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of microbiological methods**, v.40, n.2, p. 175-179, 2000. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701200001226>>. Acesso: Maio, 4, 2020. doi: [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00122-6](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00122-6).

SUPRÉ, K. et al. Some coagulase-negative *Staphylococcus* species affect udder health more than others. **Journal of Dairy Science**. v.94, 2011. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030211002086>>. Acesso: Maio, 4, 2020. doi: 10.3168/jds.2010-3741.

THRUSFIELD, M. **Veterinary epidemiology**. Oxford, England, 2005.

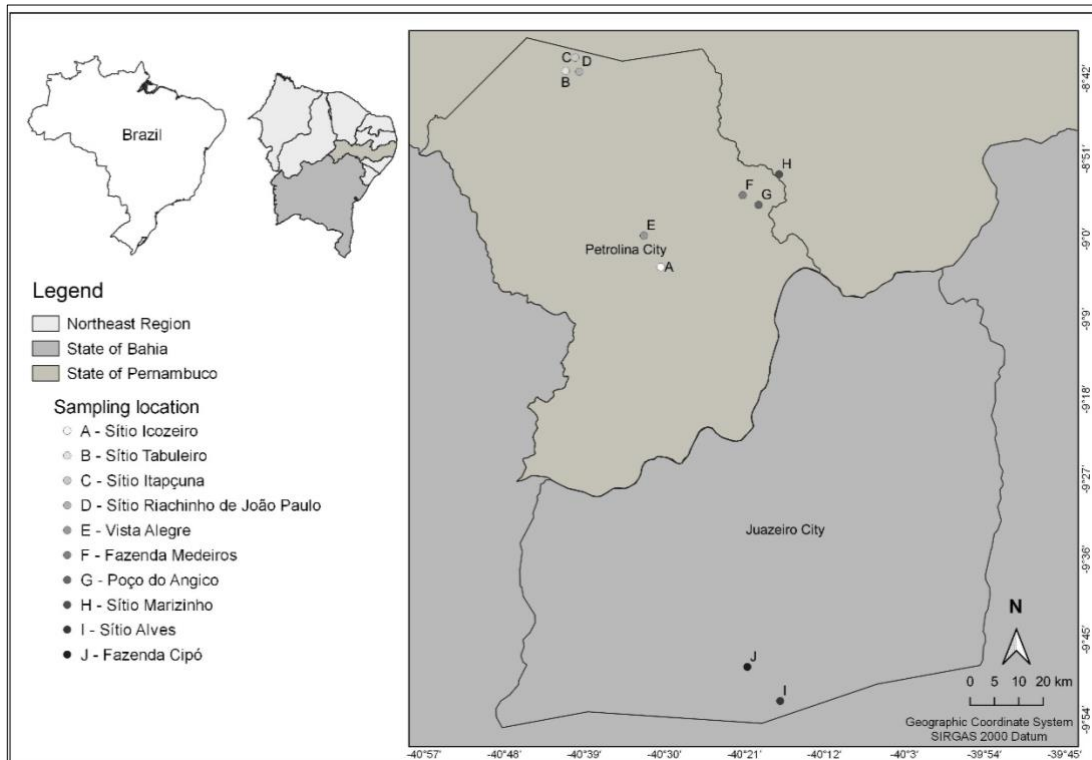


Figura 1. Georreferenciamento dos locais da coleta de leite caprino, Petrolina-PE e Juazeiro- BA, 2019.

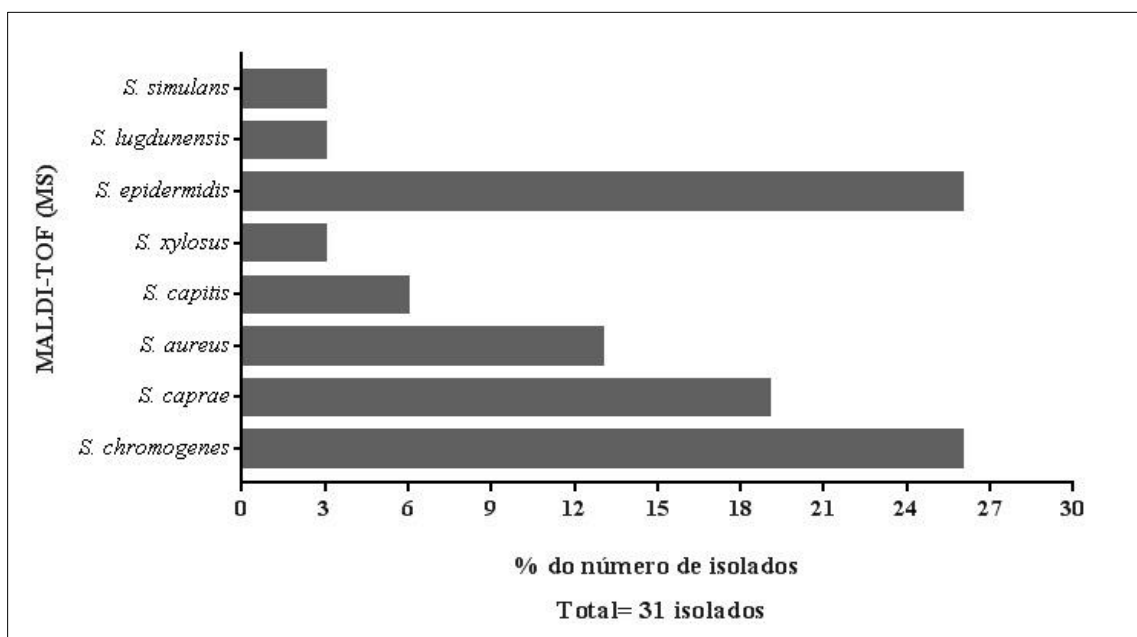


Figura 2. Identificação das espécies de *Staphylococcus* spp. isolados de mastite caprina.

CAPÍTULO III

Interference of quercetin in the biofilm production in *Staphylococcus* spp. isolated from cases of goat mastitis

Trabalho a ser submetido à Revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

Interference of quercetin in the biofilm production in *Staphylococcus* spp. isolated from cases of goat mastitis

Interferência da quercetina na produção de biofilme em *Staphylococcus* spp. isolados de casos de mastite caprina

Renata de Moraes Peixoto Araújo* - <https://orcid.org/0000-0003-1591-3438>

Maura Marinete de Sousa - <https://orcid.org/0000-0002-5109-5156>, Instituto Federal do Sertão Pernambucano - Campus Zona Rural, Petrolina, PE, Brasil.

Letícia Stheffany de Barros Cunha - <https://orcid.org/0000-0003-2501-919X>, Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), Campus Ciências Agrárias, Petrolina, PE, Brasil.

Rodolfo de Moraes Peixoto - <http://orcid.org/0000-0002-5757-5935>, Instituto Federal do Sertão Pernambucano, Campus Zona Rural, Petrolina, PE, Brasil.

Márcio Rennan Santos Tavares - <http://orcid.org/0000-0002-90720727>, Instituto Federal do Sertão Pernambucano - Campus Zona Rural, Petrolina, PE, Brasil.

Mateus Matiuzzi da Costa - <http://orcid.org/0000-0002-9884-2112>, Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), Campus Ciências Agrárias, Petrolina, PE, Brasil.

Felício Garino Júnior - <http://orcid.org/0000-0003-4868-3894>, Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Campus Patos, PB, Brasil.

Eldinê Gomes de Miranda Neto - <http://orcid.org/0000-0002-9398-6539>, Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Campus Patos, PB, Brasil.

ABSTRACT

In the search for antimicrobial alternatives, the purpose in this study was to determine the antibacterial and antibiofilm properties of quercetin against *Staphylococcus* spp. of goat mastitis. For this, four isolates obtained from goats with subclinical mastitis, identified by MALDI-TOF MS – *S. aureus*, *S. chromogenes*, *S. lugdunensis*, *S. epidermidis* and an ATCC 25923 were used. To determine antibacterial activity in vitro of quercetin, MIC (Minimum Inhibitory Concentration) and MBC (Minimum Bactericidal Concentration) were performed. Concentrations used in this study were - 1000µg/mL to 7.81µg/mL. Subsequently, the antibiofilm activity of quercetin could be evaluated. The results of this study indicated bacteriostatic and antibiofilm activity by quercetin. The subinhibitory concentrations (500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL) were able to reduce the formation of biofilm. Thus, these findings allow a direction for new antimicrobial strategies against *Staphylococcus* spp. causes of caprine mastitis.

Keywords: goat mastitis; *Staphylococcus* spp.; quercetin; antibiofilm activity.

RESUMO

Na busca por alternativas antimicrobianas, o objetivo deste estudo foi determinar as propriedades antibacterianas e antibiofilme da quercetina contra isolados de *Staphylococcus* spp. de mastite caprina. Para isso, foram utilizados quatro isolados de caprinos com mastite subclínica, identificados por meio do MALDI-TOF MS – *S. aureus*, *S. chromogenes*, *S. lugdunensis*, *S. epidermidis* e uma ATCC 25923. Para determinar a atividade antibacteriana *in vitro* da quercetina, realizou-se a CIM e a CBM. A concentração inicial e final foi de 1000µg/mL e 7,81µg/mL respectivamente. Posteriormente, pôde-se avaliar a atividade antibiofilme da quercetina.

*Universidade Federal de Campina Grande, Hospital Veterinário Universitário/UFCG, Av. Universitária, s/n, bairro Santa Cecília, CEP: 58708-110, Patos/PB, Brasil. E-mail: renatavet_peixoto@hotmail.com. Autor para correspondência.

Os resultados desse estudo indicaram que a quercetina apresentou atividade bacteriostática e antibiofilme. As concentrações subinibitórias (500 µg/mL, 250 µg/mL e 125 µg/mL) foram capazes de reduzir o biofilme em formação. Dessa forma, esses achados possibilitam um direcionamento para novas estratégias antimicrobianas, contra *Staphylococcus* spp. causadores de mastite caprina.

Palavras-chave: mastite caprina; *Staphylococcus* spp.; quercetina; atividade antibiofilme.

INTRODUCTION

Small ruminants perform a significant role in the socioeconomic and nutritional requirements at most countries (Danmallam e Pimenov, 2019). However, among infectious diseases attacking these animals, mastitis is one main illness affecting production on dairy goats (Gebrewahid *et al.*, 2012).

According to Acosta *et al.* (2016) mastitis control is important, since the resistance of pathogens to antimicrobials makes it difficult to treat the disease, as also represents a high risk to public health. Besides, there are few licensed pharmaceuticals for use in small ruminants, especially on goats (Peixoto *et al.*, 2010).

Staphylococcal genus bacteria are responsible for the most cases of intramammary infection in goats. These microorganisms are identified in diverse researches, whereas *Staphylococcus* spp. have several resistance mechanisms, as biofilm formation. Slime production facilitates *S. aureus* adherence in the mammary gland (Aguilar *et al.*, 2001) and according to Simojoki *et al.* (2012) the biofilm was suggested as an important factor for virulence, associating to the *Staphylococcus* coagulase negative persistence. Furthermore, it offers protection against immune system and antibiotics (Tremblay *et al.*, 2013).

As these bacteria use their virulence factors against antibiotics, a lot of researchers are evaluating antibacterial activity from natural substances. Among these substances, it is found flavonoids, which demonstrate activity against pathogenic microorganisms (Biharee *et al.*, 2020). In the flavonoids group, the quercetin has an antibiofilm potential (Memariani *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2013). Sousa *et al.* (2020) in their work recognized that use the plants extract from caatinga biome exhibit biological activity against *Staphylococcus* spp., demonstrating that quercetin and myricetin were two principal compounds in the evaluated extracts.

Although the new studies relating quercetin antimicrobial activity, there is no studies about its biological activity against *Staphylococcus* spp. from goat mastitis. Thereby this study aimed verify the quercetin interference on biofilm formation in *Staphylococcus* spp. from goat milk, besides evaluating its antibacterial activity.

MATERIALS AND METHODS

Isolates from goats with subclinical mastitis were identified by do MALDI-TOF MS – *S. aureus* (N7), *S. chromogenes* (10), *S. lugdunensis* (N25) *S. epidermidis* (N27) and ATCC 25923.

The bacterial growth standardization of the isolates was used to determine the optic density (OD) and colony forming unit (CFU/ml) correlation. Each isolate was incubated in Müeller-Hinton broth (MH, Kasvi®, São José dos Pinhais, Brazil) for 24 hours at 37 °C, and quantified in a spectrophotometer at 620nm GENESYS 10S UV-VIS (Thermo Fisher SCIENTIFIC, Madison, United States). Then, 100 µL of dilutions were plated in MH agar (Kasvi®) with the aid of glass beads, and subsequent incubation for 24 hours at 37 °C, according to the methodology proposed by Baron *et al.* (2006) with modification, using Petri plates. The essay was performed in technical duplicate.

The quercetin (Sigma-Aldrich®) was obtained commercially. Stock solution was adjusted to 2,000 µg/mL concentration, diluted in 10% dimethyl sulfoxide (DMSO, Neon). The MIC and MBC were used to determine in vitro antimicrobial activity of quercetin, established by M07-A9 protocol (CLSI, 2012). It consisted in successive microdilutions, in 96-well microplates (OLEN, São José dos Pinhais, Brazil) containing Müeller-Hinton broth (MH, Kasvi, São José dos Pinhais, Brazil), finishing with 2:1 dilution, final volume of 100 µL. Then, 10 µL bacterial suspension at 1.5×10^6 CFU/mL have been added, the microplates were incubated for 24 h at 37°C. After, an aliquot of each well was inoculated in MH agar (Kasvi), with the replicator support, and incubated at 37 °C for 24 h. The lowest concentration was considered MBC of the test substance capable of causing bacterial death. Then, 30 µL of 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (CTT, Dinâmica, Indaiatuba, Brazil) were added to each well, with incubation for 1 h. MIC was considered the lowest concentration of the test substance able to inhibit bacterial growth. Assays were performed in technical triplicate and on three independent days. Control of sterility and bacterial viability was performed.

To quantify biofilm production, the gentian violet test was used (adapted from Stepanović *et al.*, 2007; Merino *et al.*, 2009). Initially, 195 µL of Tryptic Soy Broth medium (TSB, Kasvi) were added in 96-well microplates with a flat bottom (TPP® – Techno Plastic Products, Trasadingen, Switzerland), and 5 µL of bacterial inoculum at 6×10^6 CFU/mL were added. These microplates were then incubated for 24 h at 37°C. As sterility control, wells containing TSB were used. The microplates were washed three times with 200 µL of sterile distilled water, allowing them to dry for 5 min. Then, 150 µL of methanol P.A. (Isofar, Trenthorst, German) for biofilm fixation, discarding it after 20 min and allowing it to dry. 100 µL of 0.25% crystal violet (Proquímios, Rio de Janeiro, Brazil) were added for 5 min and three more washes were performed, as previously described. 200 µL of ethanol-acetone [ethanol 99.8% P.A. (Neon) with acetone 99.5% P.A. (Fmaia, Belo Horizonte, Brazil) (80:20)], were added for subsequent reading in an EXPERT PLUS-UV reader (ASYS, Cambridge, United Kingdom) at 620 nm. Biofilm production by the isolates was classified according to the criteria by Stepanović *et al.* (2000). The essay was carried out in technical triplicate.

The antibiofilm activity of quercetin during biofilm formation was adapted from Nostro *et al.* (2007); Stepanović *et al.* (2007); Merino *et al.* (2009). Initially, 100 µL of quercetin in ½, 1/4 and 1/8 MIC were added to the 96-well microplate (TPP), and subsequently, 100 µL of bacterial inoculum adjusted to 3×10^5 CFU/mL in TSB were added. These microplates were then incubated for 24 h at 37°C. As a sterility control, wells containing TSB were used. After this period, the steps of washing, fixing, staining and reading were carried out, as described for the biofilm quantification methodology. The assay performed out in technical triplicate.

For the analysis of the quercetin antibiofilm activity in consolidated biofilm. 195 µL of TSB and 5 µL of bacterial inoculum at 6×10^6 CFU/mL were added to 96-well microplates (TPP), with incubation for 24 h at 37 °C, for previous formation of the biofilm. After this period, the microplates were washed three times with 200 µL of sterile distilled water, letting them dry for 5 min. Subsequently, 200 µL of quercetin were added at ½ MIC, 1 x MIC of each isolate, the first reading being performed (0 h) with an EXPERT PLUS-UV reader (ASYS), measured at 620 nm. The second reading was performed after 24 h of incubation at 37°C. As a sterility control, wells containing TSB were used. The essay was carried out in technical triplicate (Johnson *et al.*, 2002; Merino *et al.*, 2009).

For the values obtained from MIC and MBC, a descriptive statistical analysis was performed, distributing the values in absolute numbers. As for the interference tests results of compounds

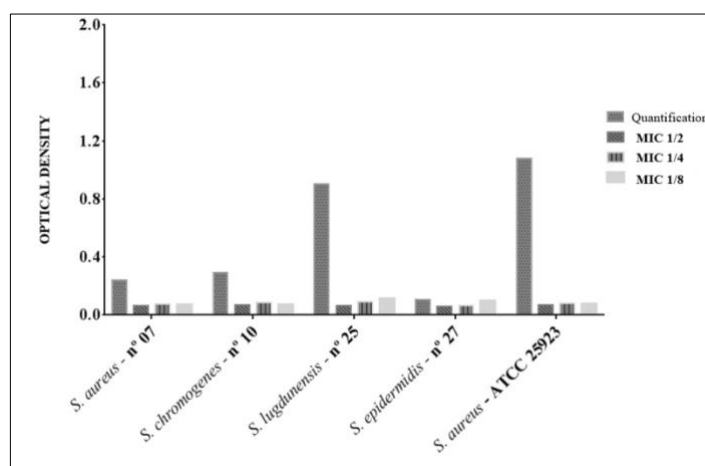
on the biofilm in formation, the analysis followed the classification proposed by Stepanović *et al.* (2000): no biofilm production (OD sample \leq DO negative control), weak biofilm production (OD negative control $<$ OD sample $\leq 2x$ OD negative control), moderate biofilm production (OD negative control $<$ OD sample $\leq 4x$ OD negative control) and strong biofilm production (OD sample $> 4x$ OD negative control). Analyzes of quercetin effect on consolidated biofilm followed the description proposed by Nostro *et al.*, (2007): average OD620 of the 24 h well / average OD620 of the 0 h well $\times 100$. If, the value was = 100 (there was no difference) > 100 (increased biofilm) and < 100 (reduced biofilm).

In the molecular docking analysis, quercetin molecules were drawn using the MarvinSketch extension, part of ChemAxon's JChem package (<https://www.chemaxon.com/>). The proteins structures related to the cell membrane of *S. aureus* were obtained from the Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). The binding energy between molecules and proteins was calculated according to the standardization configuration. Molecular fitting was performed using Molegro Virtual Docker (MolDock), v. 6.0.1 (MVD). Initially, all water molecules were excluded from the protein and compound structures, which were prepared using the same default parameter settings in the software package (score function: MolDock score; ligand evaluation: internal ES, internal HBond, Sp2-Sp2 twists, all verified; number of executions: 10; search algorithm: MolDock SE; maximum interactions: 1500; maximum population size: 50; maximum steps: 300; distance factor from neighbor: 1.00; and maximum number of poses returned. The coupling procedure was performed using a GRID of 10Å radius and 0.20 resolution to cover the ligand binding site of the structure in question (Tavares *et al.*, 2020).

RESULTS AND DISCUSSION

In order to evaluate the MIC of quercetin on isolates, concentrations used were 1000µg/mL (initial) to 7.81µg/mL (final). Therefore, the concentration capable of reducing bacterial growth was 1000 µg/mL for the four isolates of *Staphylococcus* and ATCC 25923. However, no MBC was obtained for quercetin. Thus, quercetin had a bacteriostatic effect. Corroborating the work by Júnior *et al.* (2018) who evaluated the effect of quercetin on *Staphylococcus* isolated from humans.

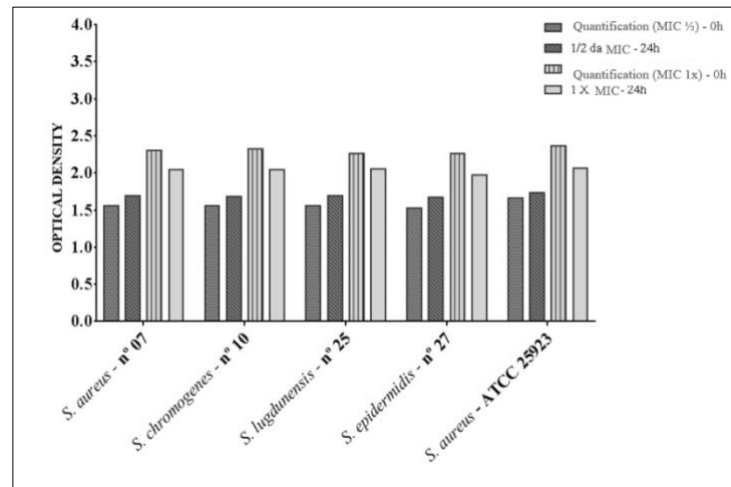
In the quantification of biofilm production, the results demonstrated that all isolates produced biofilm. Therefore, when analyzing quercetin interference on biofilm formation, it was possible to verify that the substance reduced the biofilm even in subinhibitory concentrations - 500µg/mL, 250µg/mL and 125µg/mL (Fig. 1).



Source: Self-authored (2022).

Figure 1. Quercetin interference on biofilm formation.

In the consolidated biofilm, quercetin was able to destabilize the biofilm in MIC (1000 $\mu\text{g/mL}$) (Fig.2).



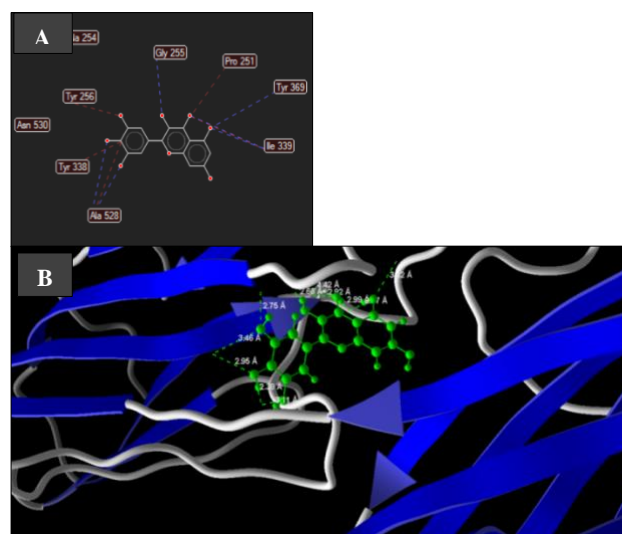
Source: Self-authored (2022).

Figure 2. Quercetin interference on consolidated biofilm.

The results demonstrated that quercetin has potential in the biofilm once it is formed. Some authors describe in a general way how flavonoids can be effective against *Staphylococcus* spp. Structural characteristics, mainly the position and quantity of hydroxyl groups, as an example, quercetin with five hydroxyl groups, reduced the biofilm formed by *S. aureus* by more than 80%. (Cho *et al.*, 2015).

According to Matilla-Cuenca *et al.* (2020) the aromatic rings of polyphenols can interact and compete with predominant aromatic residues of amyloids and block the self-assembly process and the biofilm formation of fibers.

Another study points out that antibiofilm molecules act in different mechanisms, in other words, they have multiple cellular targets (Roy *et al.*, 2018; Cushnie e Lamb, 2005). Molecular docking carried out in this study could demonstrate that quercetin had greater affinity with the ClfA protein (Cumpling Factor A) (Fig. 3A e B). The best binding energies between the substance and the proteins are shown in Table 1.



Source: Self-authored (2022)

Figure 3- Quercetin binding to the target sites of *S. aureus* membrane proteins. Intermolecular attractions by hydrogen bonds and electrostatic interactions between quercetin and amino acids of the ClfA (A) protein. 3D structure of the binding between quercetin and the ClfA protein target site (B).

Table 1- Quercetin binding energies with *S. aureus* membrane proteins.

| Proteins | Best binding energy |
|--------------------|---------------------|
| ClfA, PDB - 2vr3 | -140.455 |
| FnBPA, PDB - 3cal | -140.401 |
| FtsA, PDB - 3wqu | -135.92 |
| StaDDI, PDB - 2i8c | -130.44 |
| IsdA, PDB - 2itf | -129.28 |

PDB (Protein Data Bank). ClfA (Cumpling Factor A). FnBPA (Fibronectin). FtsA (Cell division protein FtsA). StaDDI (*Staphylococcus aureus* D-alanine:D-alanine ligase) IsdA (Iron-regulated surface determinant protein A).

Cumpling Factor A (ClfA) is a protein anchored in the cell wall of *S. aureus*, defined as a virulence factor, facilitating colonization of protein-coated biomaterials, and promoting bacterial adhesion to the blood plasma protein fibrinogen (Fg) (Herman-Bausier *et al.*, 2018). According to Kang *et al.* (2006) bacterial surface proteins constitute a diverse group of molecules with important functions, such as adhesion, invasion, signaling and interaction with the host's immune system or the environment. Stutz *et al.* (2011) described that the initial binding of *S. aureus* to epithelial cells from teat canal depends on the interaction of bacterial surface proteins, such as cumpling factors A and B (ClfA and ClfB).

Thus, inhibition of biofilm formation provides an alternative way of reducing bacterial virulence. According to Amin *et al.* (2015) as plant metabolites are not part of conventional therapy, they can be used as monotherapy or in combination therapy against them, i.e., the activity of antibiotics was increased in combination with flavonoids.

Therefore, quercetin can be used as an antibiofilm substance along with antibiotic. Since the substance will have action on the biofilm, making it unstable for the antimicrobial to eliminate the bacteria (Abraham *et al.*, 2011). These results make it possible to guide new antimicrobial strategies against *Staphylococcus* spp. causative agents of goat mastitis.

CONCLUSION

The discovery of new substances for treating mastitis in goats is of great importance, and the results obtained in this study are promising. With bacteriostatic and antibiofilm action, quercetin may represent a potential strategy for the treatment of caprine mastitis.

REFERENCES

- ABRAHAM, S. V. P. I. *et al.* Antiquorum sensing and antibiofilm potential of *Capparis spinosa*. *Arc. of Med. Res.*, v. 42, n. 8, p. 658-668, 2011.
- ACOSTA, A. C. *et al.* Mastites em ruminantes no Brasil. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 36, p. 565-573, 2016.
- AGUILAR B.; AMORENA, B.; ITURRALDE, M. Effect of slime on adherence of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine and ovine mastitis. *Vet. Microb.*, v.78, p.183-191, 2001.

AMIN, M. U *et al.* Antibiotic additive and synergistic action of rutin, morin and quercetin against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *BMC compl. and alt.med.*, v. 15, n. 1, p. 1-12, 2015.

BARON, F. *et al.* Rapid and cost-effective method for micro-organism enumeration based on miniaturization of the conventional plate-counting technique. *Le Lait*, v. 86, n. 3, p. 251-257, 2006.

BIHAREE, A., SHARMA, A., KUMAR, A., & JAITAK, V. Antimicrobial flavonoids as a potential substitute for overcoming antimicrobial resistance. *Fitoterapia*, v. 146, p. 104720, 2020.

CLSI, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Ninth Edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: *Clinical and Laboratory Standards Institute*, 88p, 2012.

CUSHNIE, T. P T.; HAMILTON, V. E. S; LAMB, A. J. Assessment of the antibacterial activity of selected flavonoids and consideration of discrepancies between previous reports. *Microb. research*, v. 158, n. 4, p. 281-289, 2003.

CHO, H. S.; LEE, J. H.; CHO, M. H.; LEE, J. Red wines and flavonoids diminish *Staphylococcus aureus* virulence with anti-biofilm and anti-hemolytic activities. *Biofouling*, v. 31, n. 1, p. 1-11, 2015.

DANMALLAM, F.A.; PIMENOV, N,V. Study on prevalence, clinical presentation, and associated bacterial pathogens of goat mastitis in Bauchi, Plateau, and Edo states, Nigeria. *Vet. World*, v.12, p.638-645, 2019.

GEBREWAHID, T.T.; ABERA, B.H.; MENGHISTU, H.T. Prevalence and Etiology of Subclinical Mastitis in Small Ruminants of Tigray Regional State, North Ethiopia. *Vet. World*, v.5, p.103-109, 2012.

HERMAN-BAUSIER, P. *et al.* *Staphylococcus aureus* clumping factor A is a force-sensitive molecular switch that activates bacterial adhesion. *Proceed. of the Nat. Acad. of Sci.*, v. 115, n. 21, p. 5564-5569, 2018.

KANG, S. S.; KIM, J. G.; LEE, T. H.; O. H, K. B. Flavonols inhibit sortases and sortase-mediated *Staphylococcus aureus* clumping to fibrinogen. *Biol. and Pharm. Bull.*, v. 29, n. 8, p. 1751-1755, 2006.

KATEETE, D. P. *et al.* Identification of *Staphylococcus aureus*: DNase and mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. *Annals of Clin. Microb. and Antimic.*, v.9, 2010.

JOHNSON, S. A. *et al.* Comparative susceptibility of resident and transient hand bacteria to para-chloro-meta-xylenol and triclosan. *J. Appl. Microb.*, v.93, p.336-344, 2002.

DA COSTA JÚNIOR, S. D. *et al.* Antibacterial and antibiofilm activities of quercetin against clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus saprophyticus* with resistance profile. *Internac. J. of Envirom., Agricult. and Biotech.*, v. 3, n. 5, p. 266213, 2018.

LEE, J-H. *et al.* Anti-biofilm activities of quercetin and tannic acid against *Staphylococcus aureus*. *Biofouling*, v.29, p.491-499, 2013.

MANUAL DE LABORATÓRIO. Técnicas de biologia molecular aplicadas a produção animal, 2009. 99p. (Boletim Técnico).

MATILLA-CUENCA, L. *et al.* Antibiofilm activity of flavonoids on staphylococcal biofilms through targeting BAP amyloids. *Scie. Reports*, v.10, p.18968, 2020.

MEMARIANI, H.; MEMARIANI, M.; GHASEMIAN, A. An overview on anti-biofilm properties of quercetin against bacterial pathogens. *World J. of Microb. and Biotech.*, v. 35, n. 9, p. 1-16, 2019.

MERINO, N. *et al.* Protein A-Mediated Multicellular Behavior in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriology*, v.191, p.832–843, 2009.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL (NMC). Microbiological Procedures for the Diagnosis of Bovine Udder Infection and Determination of Milk Quality. *NMC publication*, 2004.

NOSTRO, A. *et al.* Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *J. Med. Microb.*, v.56, p.519–523, 2007.

JANG, S. Multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus* and their clinical implications. *J. of Microb.*, v.54, p.1–8, 2016.

YUAN, Y-G.; PENG, Q-L.; GURUNATHAN, S. Effects of Silver Nanoparticles on Multiple Drug-Resistant Strains of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* from Mastitis-Infected Goats: An Alternative Approach for Antimicrobial Therapy. *Inter. J. of Molecular Scie.*, v.18, p.569, 2017.

ROY, R.; TIWARI, M.; DONELLI, G.; TIWARI, V. Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence*, v. 9, n. 1, p. 522-554, 2018.

SIMOJOKI, H. *et al.* Is the biofilm formation and slime producing ability of coagulase negative staphylococci associated with the persistence and severity of intramammary infection? *Vet. Microb.*, v.158, p.344–352, 2012.

STUTZ, K.; STEPHAN, R.; TASARA, T. SpA, ClfA, and FnbA genetic variations lead to Staphaurex test-negative phenotypes in bovine mastitis *Staphylococcus aureus* isolates. *J. of clinical microb.*, v. 49, n. 2, p. 638-646, 2011.

SOUSA, M. M. *et al.* Antimicrobial potential of Jurema preta and umburana, native species of the Caatinga biome, on *Staphylococcus* isolated from small ruminants with mastites. *Semina: Ciênc. Agrár.*, v. 41, p. 2231-2244, 2020.

STEPANOVIĆ, S. *et al.* A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J. Microb. Methods*, v.40, p.175–179, 2000.

STEPANOVIĆ, S. *et al.* Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*, v.115, p.891–899, 2007.

TAVARES, M.R.S. In silico evaluation of potassium usnate: a composite promiser in the covid-19 combat. *Int. J. Innov. Educ. Res.*, v. 8, n. 6, p.524–531. 2020.

TINTINO, S.R. *et al.* Evaluation of the tannic acid inhibitory effect against the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus*. *Microb. Pathog.*, v.97, p.9-13, 2016.

TREMBLAY, Y.D.N. *et al.* Characterization of the ability of coagulase-negative staphylococci isolated from the milk of Canadian farms to form biofilms. *J. of Dairy Scie.*, v.96, p.234–246, 2013.

CONCLUSÃO GERAL

-Os resultados desta investigação confirmam a alta especificidade da técnica de MALDI-TOF MS, uma vez que a identificação precisa do agente causador da mastite é fundamental para o monitoramento adequado de cepas resistentes a agentes antimicrobianos.

-Destaca-se a importância dos SCN na etiologia da mastite subclínica em caprinos, uma vez que demonstraram a capacidade de produzir biofilme e de carrear genes de resistência.

-Na busca por alternativas antimicrobianas, a quercetina apresentou atividade biológica contra *Staphylococcus* spp., dessa forma, esses achados podem ser um direcionamento para novas estratégias de tratamento da mastite caprina.