

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE

LARISSA DE FREITAS SANTIAGO ISRAEL

**PRODUÇÃO DE BIOFILME POR *Staphylococcus chromogenes*
(STAPHYLOCOCCACEAE) ISOLADOS DE AMOSTRAS DE LEITE
PROVENIENTES DE REBANHOS BOVINOS COM MASTITE**

**RIO BRANCO
ACRE – BRASIL
MARÇO – 2017**

LARISSA DE FREITAS SANTIAGO ISRAEL

PRODUÇÃO DE BIOFILME POR *Staphylococcus chromogenes*
(STAPHYLOCOCCACEAE) ISOLADOS DE AMOSTRAS DE LEITE
PROVENIENTES DE REBANHOS BOVINOS COM MASTITE

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Acre, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal Sustentável na Amazônia Ocidental, para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal

RIO BRANCO
ACRE – BRASIL
MARÇO - 2017

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da UFAC

I854p Israel, Larissa de Freitas Santiago, 1991-
Produção de biofilme por *Staphylococcus chromogenes*
(Staphylococcaceae) isolados de amostras de leite provenientes de
rebanhos bovinos com mastite / Larissa de Freitas Santiago Israel. – 2017.
14f.: il.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Acre, Programa de
Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal Sustentável na Amazônia
Occidental, 2017.

Incluem referências bibliográficas.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Luciana dos Santos Medeiros.

1. Bovinos. 2. Mastite bovina. 3. Rebanho leiteiro. I. Título.

CDD: 636.089

Bibliotecária: Maria do Socorro de Oliveira Cordeiro CRB-11/667

LARISSA DE FREITAS SANTIAGO ISRAEL

PRODUÇÃO DE BIOFILME POR *Staphylococcus chromogenes*
(STAPHYLOCOCCACEAE) ISOLADOS DE AMOSTRAS DE LEITE
PROVENIENTES DE REBANHOS BOVINOS COM MASTITE

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Acre, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal Sustentável na Amazônia Ocidental, para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

APROVADA: 27 de Março de 2017

Dra. Clarice Maia Carvalho
UFAC

Dra. Tamyres Izarely Barbosa da Silva
UFAC

Dra. Luciana dos Santos Medeiros
UFAC
(Orientadora)

Ao meu marido, Gabriel Isaac do Vale Israel.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por iluminar meu caminho e me dar forças para seguir sempre em frente.

À Universidade Federal do Acre (UFAC) e ao Programa de Pós-graduação em Sanidade e Produção Animal Sustentável na Amazônia Ocidental (PPGESPA) pelas oportunidades oferecidas.

A todos os docentes do PPGESPA pelo conhecimento transmitido.

À orientadora Dra. Luciana dos Santos Medeiros, pelos valiosos ensinamentos, conselhos, confiança e incentivos ao longo dessa jornada, sendo um exemplo de profissional a qual almejo ser.

À co-orientadora Dra. Renata Fernandes Rabello, pela disponibilidade em passar sua experiência e pelas valiosas contribuições, imprescindíveis à realização deste trabalho.

À Dra. Clarice Maia e toda a sua equipe de pesquisa, pelas experiências trocadas, pela paciência e disponibilidade do laboratório de microbiologia da Bionorte sempre que necessário.

Aos alunos Susan Braga e Marcelo Fernando, por auxiliarem nas coletas à campo e no processamento das amostras, sempre dispostos a ajudar.

Aos produtores leiteiros e aos seus funcionários pela ajuda e por permitirem a coleta das amostras de leite dos animais de seus rebanhos.

Aos meus pais Francisca e Santiago, pela educação base para minha vida e apoio nos meus estudos.

Ao meu marido Gabriel Isaac, por ter estado sempre ao meu lado nessa jornada, me apoiando e incentivando, se dispondo a ajudar quando preciso, pelo imenso amor e paciência, por todos esses anos juntos e por todos os outros anos que iremos ainda compartilhar.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão de bolsa de estudo.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho

CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – UFAC

Título do projeto: Produção de biofilme por *Staphylococcus chromogenes* isolados de amostras de leite provenientes de rebanhos bovinos com mastite.

Processo número: 23107010416/2015-38.

Protocolo número: 61/2015.

Responsável: Profa. Dra. Luciana dos Santos Medeiros.

Data de aprovação: 18/06/2015.

RESUMO

ISRAEL, Larissa de Freitas Santiago. Universidade Federal do Acre, março de 2017. **Produção de biofilme por *Staphylococcus chromogenes* (Staphylococcaceae) isolados de amostras de leite provenientes de rebanhos bovinos com mastite.** Orientadora: Luciana dos Santos Medeiros. Foram estudadas 135 vacas mestiças, provenientes de dez rebanhos leiteiros no estado do Acre. O objetivo foi identificar espécies de *Staphylococcus* isoladas dos quartos mamários de vacas com mastite e posteriormente avaliar a capacidade de produção de biofilme pela espécie *Staphylococcus chromogenes*. A caracterização dos isolados presentes nas amostras encontradas, correspondentes a *Staphylococcus* sp., foi realizada utilizando a técnica do MALDI TOF MS (Matrix Associated Laser Desorption-Ionization – Time of Flight – Mass Spectrometry). Foram identificados: *S. chromogenes* (36), *Staphylococcus saprophyticus* (5), *S. chromogenes* ou *Staphylococcus hycus* (5), *Staphylococcus haemolyticus* (4), *Staphylococcus epidermidis* (3), *Staphylococcus hycus* (3), *Staphylococcus aureus* (1), *Staphylococcus auricularis* (1), *Staphylococcus kloosii* (1) e *Staphylococcus xylosus* (1). A espécie *S. chromogenes* correspondeu a 60% dos isolados do gênero (17 isolados coagularam o plasma de coelho no teste da coagulase em tubo), sendo 83,3% dos isolados (30/36) produtores de biofilme, não estando este fator de virulência associado ao fenótipo de coagulação do plasma. A identificação desses microorganismos é importante para a elucidação da etiologia da mastite bovina. O alto percentual de *S. chromogenes*, produtores de biofilme, isolados de vacas com mastite é um achado importante e pode revelar uma mudança de perfil na colonização de agentes etiológicos causadores desta enfermidade.

Palavras-chaves: *Staphylococcus* sp., MALDI TOF MS, virulência, mastite bovina

ABSTRACT

ISRAEL, Larissa de Freitas Santiago. Universidade Federal do Acre, March 2017. **Biofilme production by *Staphylococcus chromogenes* (Staphylococcaceae) isolated from milk samples from bovine with mastitis.** Advisor: Luciana dos Santos Medeiros. It was studied 135 crossbred cows from ten dairy herds in the state of Acre. The objective was to identify species of *Staphylococcus* isolated from the mammary quarters of cows with mastitis and to evaluate the capacity of biofilm production by the species *Staphylococcus chromogenes*. The characterization of the isolates present in the samples found, corresponding to *Staphylococcus* sp., was performed using the MALDI TOF MS (Matrix Associated Laser Desorption-Ionization - Time of Flight - Mass Spectrometry) technique. *S. chromogenes* (36), *Staphylococcus saprophyticus* (5), *S. chromogenes* or *Staphylococcus hycus* (5), *Staphylococcus haemolyticus* (4), *Staphylococcus epidermidis* (3), *Staphylococcus hycus* (3), *Staphylococcus aureus* (1), *Staphylococcus auricularis* (1), *Staphylococcus kloosii* (1) e *Staphylococcus xylosus* (1). *S. chromogenes* corresponded to 60% of the isolates of the genus (17 isolates were positive in the tube coagulase test) and 83.33% of them (30/36) being biofilm producers. This virulence factor had no association with the plasma coagulation phenotype. The identification of these microorganisms is important for the elucidation of the etiology of bovine mastitis. The high percentage of *S. chromogenes*, biofilm producers, isolated from cows with mastitis is an important finding and may reveal a profile change in the colonization of etiologic agents that cause this disease.

Keywords: *Staphylococcus* sp., MALDI TOF MS, virulence, bovine mastitis

SUMÁRIO

	págs.
RESUMO	
ABSTRACT	
1 ARTIGO.....	1
1.1 ARTIGO.....	1

1 ARTIGO

1.1 Artigo 1

Produção de biofilme por *Staphylococcus chromogenes* isolados de amostras de leite provenientes de rebanhos bovinos com mastite.

Larissa de Freitas Santiago Israel, Renata Fernandes Rabello, Susan Christina Braga Domingos, Luciana dos Santos Medeiros

Submetido ao Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia em Março de 2017.

1
2
3
4
5
6
7
8

1. INTRODUÇÃO

9 A mastite bovina é considerada a principal doença que afeta os rebanhos
10 leiteiros em todo o mundo, causando sérios prejuízos econômicos na produção bovina
11 leiteira mundial (Freitas *et al.*, 2005; Hoogeveen *et al.*, 2011).

12 Entre os patógenos mais prevalentes associados com mastite em vacas em
13 lactação estão as bactérias pertencentes ao gênero *Staphylococcus* sp., sendo divididos
14 em *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN) e *Staphylococcus* coagulase positiva
15 (SCP) (Pyörälä e Taponen, 2009; De Vliegher *et al.*, 2012). Apesar de serem
16 considerados menos patogênicos que os *Staphylococcus aureus*, as infecções causadas
17 por SCN têm sido associadas com perdas consideráveis de leite e tendem a persistir
18 durante todo o período da produção (Pjörälä e Taponen, 2009).

19 *Staphylococcus chromogenes* é uma espécie de SCN não hemolítica. Foi
20 originalmente considerada uma subespécie de *Staphylococcus hyicus*, no entanto
21 atualmente é classificada como uma espécie separada (Hajek *et al.*, 1986). *S.*
22 *chromogenes* tem sido encontrado como espécie mais prevalente de SCN associado à
23 mastite em gado leiteiro em vários estudos (Tomazi *et al.*, 2014; Srednik *et al.*, 2015).
24 Adicionalmente esta espécie está associada a infecções persistentes e com alta
25 contagem de células somáticas (Supré *et al.*, 2011).

26 Atualmente se discute o papel dos fatores de virulência do gênero
27 *Staphylococcus* sp., como a coagulase e produção de biofilme, na persistência e
28 disseminação no hospedeiro, na expressão da doença grave e na interferência do
29 tratamento com antimicrobianos (Pyörälä e Taponen, 2009; Giardini, 2013; Marques
30 *et al.*, 2013). Biofilmes são descritos como aglomerações de células embebidas em
31 matriz heterogênea extracelular, resultando em estruturas tridimensionais com
32 características fisiológicas específicas, dificultando a ação dos macrófagos e
33 aumentando a resistência a diversos antimicrobianos (Marques *et al.*, 2013).

34 O presente trabalho teve como objetivo identificar a ocorrência de isolados
35 do gênero *Staphylococcus* nos quartos mamários de vacas com mastite provenientes
36 de rebanhos bovinos do estado do Acre, bem como avaliar a capacidade de produção
37 de biofilme pela espécie *S. chromogenes*.

38

39 2. MATERIAL E MÉTODOS

40 O experimento foi realizado após aprovação do Comitê de Ética no Uso de
41 Animais em Ensino e Pesquisa (CEUA) da Universidade Federal do Acre (UFAC),
42 conforme o parecer 61/2015.

43 Foram selecionadas 10 propriedades leiteiras localizadas no município de Rio
44 Branco e Senador Guiomard – AC com histórico de queda de produção e com no
45 máximo 35 vacas em lactação, durante o período de Novembro de 2015 a Agosto de
46 2016. Três das 10 propriedades selecionadas utilizam ordenha mecânica e as sete
47 restantes, ordenha manual. Na maioria das propriedades não eram aplicadas várias
48 práticas de controle, como a higienização e imersão dos tetos em antissépticos antes e
49 após a ordenha, uso do *California Mastitis Test* (CMT) para identificação da mastite
50 subclínica e tratamento da mastite clínica com produtos prescritos por veterinários.

51 Inicialmente, foi realizado exame clínico da glândula mamária. Em seguida,
52 realizou-se a lavagem dos tetos com água e sabão, secagem com papel toalha e anti-
53 sepsia do óstio com álcool 70%. Os três primeiros jatos de leite foram desprezados em
54 caneca telada e em seguida foi realizado o CMT para cada teto, a fim de ser realizada
55 a identificação de animais com mastite subclínica (Fonseca e Santos, 2000).

56 O critério de classificação da mastite clínica foi a detecção de alterações da
57 glândula mamária compatíveis com processo inflamatório ao exame clínico e/ou a
58 presença de alterações macroscópicas no leite, tais como presença de grumos e
59 coloração alterada (Fonseca e Santos, 2000).

60 Uma vez diagnosticada a mastite, clínica ou subclínica, foram coletados
61 aproximadamente 5 ml de leite do teto acometido em tubos do tipo *Falcon* previamente
62 esterilizados. O material foi acondicionado à 4 °C e encaminhado imediatamente ao
63 laboratório para análises microbiológicas.

64 As amostras de leite foram semeadas em ágar sangue contendo 5% de sangue
65 ovino (Laboclin), incubadas em condições aeróbias a 37 °C, por 24 até 48 horas
66 (Machado et al., 2008). As colônias suspeitas foram semeadas posteriormente em ágar

67 Mueller Hinton (Kasvi), também incubadas em condições aeróbias a 37 °C, por 24 até
68 48 horas. A identificação inicial dos isolados foi realizada por morfologia colonial,
69 coloração de GRAM, teste da catalase e teste da coagulase em tubo (NMC, 2004).

70 Após a identificação inicial, as amostras sugestivas do gênero *Staphylococcus* foram
71 submetidas à técnica de MALDI TOF no equipamento MALDI Biotypes 3.1 (Bruker
72 Daltonik, Bremen, Germany).

73 A caracterização da produção de biofilme foi avaliada quantitativamente pelo
74 teste de aderência em microplaca com modificações na metodologia proposta por
75 Christensen *et al.* (1985) e Cucarella *et al.* (2001). As bactérias foram inoculadas na
76 concentração de 1 UFC/ml em meio Tryptic Soy Both (TSB) (Kasvi) e incubadas a
77 37°C por 24h. Posteriormente, as células em suspensão foram inoculadas em micro-
78 placas de poliestireno estéreis com 96 poços, diluídas em 1:40 em TSB e incubadas
79 por 24 horas à 37°C sem agitação.

80 Após incubação, os poços foram lavados duas vezes com 200 µL de solução
81 salina estéril, secos em estufa à 60°C e deixados até a secagem da placa, durante 30
82 minutos. Adicionou-se, então, 200µL de cristal violeta a 1% por 15 minutos. Em
83 seguida, os poços foram lavados três vezes com água destilada e secos à temperatura
84 ambiente. A absorbância foi determinada à 490nm em leitor de ELISA (Polaris, Celer).
85 Poços não inoculados contendo apenas TSB serviram como controle negativo. As
86 leituras foram realizadas em triplicata e os valores da densidade óptica (DO), tomados
87 como a média das leituras.

88 As amostras foram classificadas em quatro categorias de acordo com a média
89 das DOs relacionada com os resultados obtidos para o controle negativo (DOCN)
90 (Peña e Uffo, 2013). As categorias foram baseadas nos seguintes critérios: não
91 aderente (NA), quando $DO \leq DOCN$; fracamente aderente (+) quando $DOCN <$
92 $DO \leq 2 \times DOCN$; moderadamente aderente (++) , quando $2 \times DOCN < DO \leq 4 \times DOCN$
93 ou fortemente aderente (+++), quando $4 \times DOCN < DO$.

94

95 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

96 Foram avaliados os quartos mamários de 135 vacas mestiças, provenientes de
97 10 propriedades leiteiras localizadas no estado do Acre. Sessenta e sete (67) vacas
98 foram classificadas como tendo mastite (49,63%). Destas, 3 foram identificadas com
99 mastite clínica (4,5%) e 64 com mastite subclínica (95,5%).

100 Foram coletadas amostras de leite de 162 tetos provenientes de 67 vacas com
 101 mastite. Foram isoladas colônias suspeitas indicativas do gênero *Staphylococcus* de 83
 102 tetos, correspondentes a 55 vacas. Os isolados suspeitos foram submetidos ao MALDI
 103 TOF. Foi confirmada a presença de 60 isolados do gênero *Staphylococcus* em 57 tetos
 104 de 40 vacas. Dentre os 60 isoladas de *Staphylococcus sp*, foram identificados: *S.*
 105 *chromogenes* (36), *Staphylococcus saprophyticus* (5), *Staphylococcus haemolyticus*
 106 (4), *Staphylococcus epidermidis* (3), *S. hycus* (3), *S. aureus* (1), *Staphylococcus*
 107 *auriculares* (1), *Staphylococcus kloosii* (1) e *Staphylococcus xylosus* (1). Cinco
 108 isolados não foram identificados ao nível de espécie de forma confiável. A espécie *S.*
 109 *chromogenes* correspondeu a 60% (36/60) do total de isolados do gênero (Tab. 1).

110

111 Tabela 1. Distribuição das espécies de *Staphylococcus* isoladas de vacas com mastite entre as diferentes
 112 propriedades investigadas no Acre.

Espécie (n)	Propriedade	Vaca (n)	Teto (n)
<i>S. chromogenes</i> (36) ^a	A	1	1
	B	1	1
	C	2	2
	E	3 (1*)	5 (3*)
	F	4	7
	G	2	3
	H	3	3
	I	2	2
	J	8	10
	<i>S. saprophyticus</i> (5)	C	1
E		1	1
F		2	3
<i>S. haemolyticus</i> (4)	I	4	4
<i>S. epidermidis</i> (3)	C	1	1
	J	2	2
<i>S. hycus</i> (3)	H	2	3
<i>S. aureus</i> (1)	A	1	1
<i>S. auriculares</i> (1)	I	1	1
<i>S. kloosii</i> (1)	H	1	1
<i>S. xylosus</i> (1)	H	1	1

113

114 ^a Uma única colônia foi selecionada de cada teto para o estudo, com exceção de
 115 dois tetos de onde foram isoladas duas colônias com fenótipos diferentes.

116 * Fora do parêntese é o número de vacas ou tetos com infecção enquanto que
 117 dentro do parêntese é o número daqueles com infecção clínica.

118 A identificação das espécies de SCN, citados como microrganismos
 119 considerados habitantes normais da pele dos animais, é mais difícil de ser realizada
 120 rotineiramente. Deve haver crescimento de uma quantidade considerável de colônias
 121 (cerca de 10 UFC) isoladas em cultura pura para serem considerados responsáveis pela

122 infecção, enquanto *S. agalactiae* e *S. aureus* são considerados sempre que isolados,
123 independente da pureza e da quantidade de colônias isoladas no meio de cultura (Brito
124 e Brito, 1999). Seguindo este critério, dos 36 isolados de *S. chromogenes* presentes
125 nesse trabalho, 22 podem realmente ser considerados como agente da mastite,
126 enquanto nos 14 restantes não é possível afirmar.

127 No presente trabalho foi encontrado somente 1 isolado da espécie *S. aureus*,
128 resultado inesperado para este estudo, já que trabalhos na literatura (Rabello, 2007;
129 Marques *et al.*, 2013) a citam como a espécie mais frequentemente isolada em casos
130 de mastite.

131 O isolamento de *S. chromogenes* neste estudo está de acordo com resultados
132 encontrados na literatura (Sampimon *et al.*, 2009; Piessens *et al.*, 2011; Supré *et al.*,
133 2011; Fry *et al.*, 2014; Srednik *et al.*, 2015), que têm mostrado a disseminação deste
134 agente em rebanhos bovinos, inclusive no Brasil (Santos *et al.*, 2008; Lange *et al.*,
135 2011; Tomazi *et al.*, 2014), sendo *S. chromogenes* atualmente a espécie de SCN mais
136 frequentemente isolada de mastite bovina. No entanto, Bochniarz *et al.* (2014)
137 encontraram uma frequência maior de *S. xylosus* dentre todos os SCN isolados de
138 vacas com mastite clínica e subclínica, seguido por *S. chromogenes*, sendo essa a
139 espécie mais prevalente quando considerada apenas a forma subclínica da mastite.

140 Dentre os isolados de *S. chromogenes*, 47,2% (17/36) dos isolados
141 apresentaram a capacidade de coagular o plasma no teste da coagulase em tubo apesar
142 desta espécie ser considerada SCN. Dois destes isolados foram recuperados de tetos
143 de onde foram recuperados também isolados que foram negativos no teste da coagulase
144 em tubo. O fenótipo coagulase positivo de isolados de *S. chromogenes* foi relatado
145 anteriormente em outros estudos (Lange *et al.*, 2011; Dos Santos *et al.*, 2016). Lange
146 *et al.* (2011) isolaram 53,9% (7/13) dos isolados de *S. chromogenes* provenientes de
147 mastite bovina que apresentaram-se positivos no teste da coagulase em tubo. A
148 atividade de coagulação desses isolados pode ser causada por interferência de
149 proteases, porém estudos devem ser realizados para explicar melhor. A capacidade de
150 coagular plasma pode levar a identificação equivocada desta espécie em outras mais
151 prevalentes como *S. aureus*.

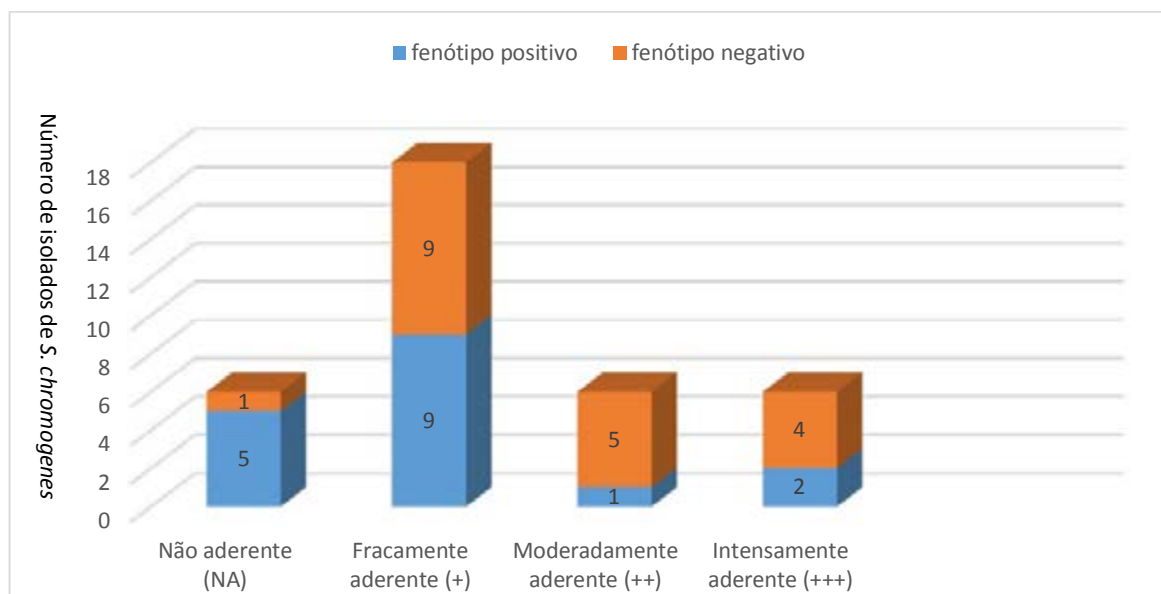
152 *S. chromogenes* é filogeneticamente mais semelhante a muitos SCP e
153 coagulase-variáveis (dos Santos *et al.*, 2016). Na sequência genômica de *S.*
154 *chromogenes*, há uma *open reading frame* com 41% de identidade com o gene da
155 coagulase da espécie de SCP *Staphylococcus pseudintermedius* (Fry *et al.*, 2014). Esta

156 descoberta reforça a necessidade de metodologias que possam diferenciar estas
157 espécies. A identificação por MALDI TOF de várias espécies de *Staphylococcus* é
158 confiável. No estudo realizado por Tomazi *et al.* (2014), 100% dos isolados de *S.*
159 *chromogenes* foram identificados por tal técnica.

160 Um grande progresso para o diagnóstico em microbiologia é o método hoje
161 conhecido como MALDI-TOF MS (Matrix Associated Laser Desorption-Ionization –
162 Time of Flight – Mass Spectrometry), tornando-se atualmente um recurso de referência
163 para microbiologistas que trabalham nos laboratórios de rotina, devido a sua
164 característica de permitir a identificação confiável e rápida de microorganismos
165 (Benagli *et al.*, 2011; Zárate *et al.*, 2014).

166 Trinta (83,3%) isolados de *S. chromogenes* foram identificados como
167 produtores de biofilme. Dos isolados com capacidade para coagular o plasma, 70,6%
168 (12/17) são produtores de biofilme e 29,4% (5/17) não são produtores. Já dentre os
169 isolados de *S. chromogenes* que não coagularam o plasma, 94,7% (18/19) são
170 produtores de biofilme e apenas 5,3% (1/19) não foram produtores (Fig. 1).

171



172

173 Figura 1. Classificação da produção de biofilme por *S. chromogenes*.

174

175 Fry *et al.* (2014) identificaram dois genes de proteínas associadas à produção
176 de biofilme em *S. chromogenes* através de seu sequenciamento genômico. Bochniarz
177 *et al.* (2014) avaliaram a produção de *slime* por SCN isolados de vacas com mastite e
178 encontraram 38,5% (10/26) dos isolados de *S. chromogenes* com essa capacidade. Em

179 estudo realizado por Bochniarz *et al.* (2016), a capacidade de produzir *slime* foi
180 confirmada em 24 isolados (63.2%) de *S. chromogenes*.

181 Há um consenso de que o biofilme contribua para a persistência bacteriana em
182 sítios infecciosos ou para infecções crônicas, pois dificulta a ação dos mecanismos de
183 defesa do hospedeiro e de agentes antimicrobianos. Além disso, as cepas de
184 *Staphylococcus* produtoras desse polissacarídeo extracelular têm uma maior
185 capacidade para colonizar (Cucarella *et al.*, 2001; Giardini, 2013).

186 O alto percentual de *Staphylococcus chromogenes*, produtores de biofilme,
187 isolados de vacas com mastite é um achado importante deste estudo e pode revelar
188 uma mudança de perfil na colonização de agentes etiológicos causadores desta
189 enfermidade. Esse achado pode ser decorrente também ao uso de novas técnicas
190 diagnósticas como o MALDI TOF MS. Atualmente, os métodos de identificação dos
191 estafilococos estão sendo reavaliados e, com isso, estão sendo desenvolvidos métodos
192 moleculares, podendo ser esperados avanços substanciais no conhecimento sobre a
193 mastite bovina causada por *Staphylococcus*.

194

195 4. CONCLUSÕES

196 Foi confirmada a presença de 60 isolados pertencentes ao gênero
197 *Staphylococcus* isolados de 57 tetos provenientes de 40 vacas com mastite. A espécie
198 *S. chromogenes* correspondeu a 60% (36/60) do total de isolados do gênero,
199 demonstrando a importância dessa espécie como agente causador da mastite em
200 bovinos.

201 Trinta (83,3%) isolados de *S. chromogenes* foram identificados como
202 produtores de biofilme. Dos isolados com capacidade para coagular o plasma, 70,6%
203 (12/17) são produtores de biofilme. Já dentre os isolados de *S. chromogenes* que não
204 coagularam o plasma, 94,7% (18/19) são produtores de biofilme. Esses dados mostram
205 um alto percentual desse fator de virulência nas cepas isoladas.

206 Foram observados isolados de *S. chromogenes*, denotados como coagulase-
207 negativo em literatura, entretanto com capacidade de coagular o plasma. Estudos
208 adicionais são necessários para elucidar os mecanismos que conferem a capacidade de
209 coagular o plasma nestes isolados de *S. chromogenes* e o papel deste fenótipo na
210 virulência desta espécie. Além disso, a fenotipagem pode facilmente levar a erros de

211 identificação de *S. aureus*, espécie pouco prevalente nesse estudo e citada como a
212 espécie SCP mais prevalente em mastite. Portanto, a questão restante é avaliar se o *S.*
213 *chromogenes* coagulase-negativo deve ser reclassificado como um coagulase variável.

214

215

5. REFERÊNCIAS

216 BENAGLI, C.; ROSSI, V.; DOLINA, M. et al. Matrix-assisted laser desorption
217 ionization-time of flight mass spectrometry for the identification of clinically relevant
218 bacteria. *PLoS One*, 6(1):e16424, 2011.

219 BOCHNIARZ, M.; WAWRON, W.; SZCZUBIAL, M. Production of slime by
220 coagulase-negative staphylococci (CNS) isolated from clinical and subclinical
221 mastites in cows. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, v.17, n.3 p.447–452, 2014.

222 BOCHNIARZ, M.; ADASZEX, L.; DZIEGIEL, B. et al. Factors responsible for
223 subclinical mastitis in cows caused by *Staphylococcus chromogenes* and its
224 susceptibility to antibiotics based on *bap*, *fnbA*, *eno*, *mecA*, *tetK*, and *ermA* genes.
225 *Journal of Dairy Science*, v.99, n.12, 2016.

226 BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F. Diagnóstico microbiológico da mastite. Juiz de
227 Fora, MG: Embrapa Gado de Leite, 1999. 26p. (Embrapa Gado de Leite. Circular
228 Técnica, 55).

229 CHRISTENSEN, G.D.; SIMPSON, W.A.; YOUNGER, J.J. et al. Adherence of
230 coagulase-active staphylococci to plastic tissue culture plates: A quantitative model
231 for the adherence of staphylococci to medical devices. *J. Clin. Microbiol*, 22(6):996-
232 1006, 1985.

233 CUCARELLA, C.; SOLANO, C.; VALLE, J. et al. Bap, a *Staphylococcus aureus*
234 Surface Protein Involved in Biofilm Formation. *J. Bacteriology*. 183(9):2888-2896,
235 2001.

236 DE VliegHER, S.; FOX, L.K.; PIEPERS, S. et al. Invited review: Mastitis in dairy
237 heifers: nature of the disease, potential impact, prevention, and control. *J. Dairy Sci.*
238 95(3):1025-1040, 2012.

- 239 DOS SANTOS, D.C.; LANGE, C.C.; AVELLAR-COSTA, P. *Staphylococcus*
240 *chromogenes*, a Coagulase-Negative *Staphylococcus* Species That Can Clot Plasma.
241 *Journal of Clinical Microbiology*, v.54. p.1372-1375, 2016.
- 242 FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. Qualidade do leite e controle da mastite. São
243 Paulo: Lemos, 2000. 314p.
- 244 FREITAS, M.F.L.; PINHEIRO JUNIO R, J.W.; STAMFORD, T.L.M. et al. Perfil de
245 sensibilidade antimicrobiana in vitro de *Staphylococcus* coagulase positivos isolados
246 de leite de vacas com mastite no agreste do Estado de Pernambuco. *Arquivos do*
247 *Instituto Biológico*, São Paulo, v.72, n.2, p.171-177, 2005.
- 248 FRY, P.R.; CALCUTT, M.J.; FOECKING, M.F. et al. Draft genome sequence of
249 *Staphylococcus chromogenes* strain MU 970, isolated from a case of chronic bovine
250 mastitis. *Genome Announc.* 2(4):e00835-14, 2014.
- 251 GIARDINI, L.K. *Identificação de grupos clonais, resistência aos antimicrobianos e*
252 *presença de genes associados à formação de biofilmes (icaA e IcaD) em*
253 *Staphylococcus aureus* isolados de propriedades produtoras de leite bovino. 2013.
254 92f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal do Rio Grande
255 do Sul, Porto Alegre – RS.
- 256 HAJEK, V.; DEVRIESE, L.A.; MORDARSKI, M. et al. Elevation of *Staphylococcus*
257 *hyicus* subsp. *Chromogenes* (Devriese et al., 1978) to Species Status: *Staphylococcus*
258 *chromogenes* (Devriese et al., 1978) *comb. nov.* *System. Appl. Microbiol.* v.8, p.169-
259 173, 1986.
- 260 HOOGEVEEN, H.; HUIJPS, K.; LAM, T.J.G.M. Economic aspects of mastitis: new
261 developments. *New Zealand Veterinary Journal.* v.59, p.16-23, 2011.
- 262 LANGE, C.C.; BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F. et al. Uso de PCR e sequenciamento
263 do rDNA 16S para identificação de bactérias do gênero *Staphylococcus* isoladas de
264 mastite bovina. *Pesq. Vet. Bras.* 31(1):36-40, 2011.
- 265 MACHADO, T.R.O.; CORREA, M.G.; MARIN, J.M. Antimicrobial susceptibility of
266 coagulase-negative *Staphylococci* isolated from mastitic cattle in Brazil. *Arquivo*
267 *Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.* v.60, p.278-282, 2008.

268 MARQUES, V.F.; SOUZA, M.M.S.; MENDONÇA, E.C.L. et al. Análise fenotípica e
269 genotípica da virulência de *Staphylococcus* spp. e de sua dispersão clonal como
270 contribuição ao estudo da mastite bovina. *Pesq Vet Bras.* 33(2):161-170, 2013.

271 NATIONAL MASTITIS COUNCIL. 2004. Microbiological procedures for the
272 diagnosis of bovine udder infection and determination of milk quality, 4th ed. National
273 Mastitis Council, Madison, WI.

274 PEÑA, J.; UFFO, O. Biofilm production of *Staphylococcus aureus* genotypes isolated
275 from bovine mastitis in Cuba. *Rev Salud Anim.* v.35, n.3, p.189-196, 2013.

276 PIESSENS, V.; VAN COILLIE, E.; VERBIST, B. et al. Distribution of coagulase-
277 negative *Staphylococcus* species from milk and environment of dairy cows differs
278 between herds. *J. Dairy Sci.* 94:2933–2944, 2011.

279 PYÖRÄLÄ, S.; TAPONEN, S. Coagulase-negative staphylococci-emerging mastitis
280 pathogens. *Veterinary Microbiology*, v.134, n.1/2, p.3-8, 2009.

281 RABELLO, R.F. Diversidade Genética e Genes de Virulência de Amostras de
282 *Staphylococcus aureus* Isoladas de Mastite Bovina no Estado do Rio de Janeiro. 2007.
283 161f. Tese (Doutorado) - UFRJ/ Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes/
284 Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Imunologia.

285 SAMPIMON, O.C.; BARKEMA, H.W.; BERENDS, I.M. et al. Prevalence and herd-
286 level risk factors for intramammary infection with coagulase-negative staphylococci
287 in Dutch dairy herds. *Vet. Microbiol.* 134:37–44, 2009.

288 SANTOS, O.C.S.; BARROS, E.M.; BRITO, M.A.V.P. et al. Identification of
289 coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis using RFLP-PCR of the groEL
290 gene. *Vet. Microbiol.* 130, p.134–140, 2008.

291 SREDNIK, M.E.; GRIEBEN, M.A.; BENTANCOR, A.; GENTILINI, E.R. Molecular
292 identification of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis and
293 detection of β -lactam resistance. *J Infect Dev Ctries*; 9(9):1022-1027, 2015.

294 SUPRÉ, K.; HAESEBROUCK, F.; ZADOKS, R.N. et al. Some coagulase-negative
295 *Staphylococcus* species affect udder health more than others. *J. Dairy Sci.* 94:2329–
296 2340, 2011.

297 TOMAZI, T.; GONÇALVES, J.L.; BARREIRO, J.R. et al. Identification of
298 Coagulase-Negative Staphylococci from Bovine Intramammary Infection by Matrix-
299 Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *Journal of*
300 *Clinical Microbiology.* p.1658–1663, 2014.

301 ZÁRATE, M.S.; ROMANO, V.; NIEVAS, J. et al. Utilidad de la espectrometria de
302 masas MALDI-TOF en la identificación de bacterias anaeróbias. *Rev Argent*
303 *Microbiol.* 46(2):98-102, 2014.