

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

Chirles Araújo de França

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE ISOLADOS DE
Staphylococcus spp. OBTIDOS DE CAPRINOS E OVINOS**

Petrolina - PE
2010

CHIRLES ARAÚJO DE FRANÇA

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE ISOLADOS DE
Staphylococcus spp. OBTIDOS DE CAPRINOS E OVINOS**

Trabalho apresentado a Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF, Campus Ciências Agrárias, como requisito da obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa
Co-orientadora: Dr^a. Josir Laine Aparecida Veschi

Petrolina - PE
2010

F814c

França, Chirles Araújo de
Caracterização fenotípica e molecular de isolados de
Staphylococcus spp. obtidos de caprinos e ovinos / Chirles Araújo
de França. -- Petrolina, PE, 2010.
60f. : il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade
Federal do Vale do São Francisco, Campus de Ciências Agrárias,
PE, 2010.

Orientador: Mateus Matiuzzi da Costa

Bibliografia

1. Caprinos e Ovinos - Doenças. 2. Mastite – Doenças –
Ovinos e Caprinos. I. Título. II. Universidade Federal do Vale do
São Francisco.

CDD 636.39

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Integrado de Biblioteca
SIBI/UNIVASF

Bibliotecário: Lucídio Lopes de Alencar

UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

Chirles Araújo de França

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal, pela Universidade Federal do Vale do São Francisco.

Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa
Orientador (UNIVASF)

Prof. Dr. Celso José Bruno de Oliveira
Departamento de Zootecnia (UFPB)

Dr. Nataniel Franklin de Melo
Embrapa Semiárido

Petrolina, 27 de Agosto de 2010.

Dedicatória

Dedico aos meus amados pais Farias e Acione,
Às minhas irmãs Sheila e Sheilane e
Ao meu noivo Elissandro
pelo amor e dedicação de sempre.

Agradecimentos

Agradeço ao Deus, pai celestial em quem tanto confio sem o qual não estaríamos aqui hoje. Obrigado senhor por cobrires sempre de bênçãos a mim e a todos que amo, muito obrigada.

Agradeço infinitamente à minha família, que sempre esteve ao meu lado em todo tempo na minha vida. Agradeço a minha rainha Acione Araújo de França e a meu pai tão amado Manoel Farias de França, pelo amor, carinho e dedicação constante. Agradeço também às minhas irmãs abençoadas Sheila Araújo de França e Sheilane Araújo de França, pela paciência e companheirismo e as minhas primas Erivânia e Pamela pelo apoio mesmo estando distante. Outra pessoa muito especial a quem não posso deixar de agradecer, meu namorado Elissandro Dias, pela paciência, ajuda e compreensão sempre.

Ao professor orientador Mateus Matiuzzi da Costa, por acreditar em minha capacidade, pelos ensinamentos e apoio em todo esse período de trabalho. Não poderia ter escolhido pessoa melhor pra me acompanhar, tão dedicado ao seu trabalho, a seus alunos. Pra ele não há tempo ruim, toda hora é hora de fazer algo e quando pensávamos que as coisas não caminhariam, lá estava ele dizendo: para tudo têm-se um jeito. Esse é meu orientador.

A professora Adriana Mayumi Yano de Melo, que também me ajudou muito durante a realização do mestrado estando sempre à disposição no fosse preciso.

A meu amigo José Nilton Moreira, a quem também devo mais essa conquista, obrigada pelo forte incentivo que veio na hora certa.

As minhas amigas: Ítala, Roberta, Fabiana, Karlúzia, pela amizade e companheirismo de muito tempo.

A meu amigo Eduardo pela atenção, conhecimento transmitido e ajuda constante.

Aos amigos que ganhei depois que entrei na UNIVASF: Rodolfo, Valdenice, Isabelle, Carina, Luciana, Samira, Eleine, Márcia, Ceixa, Milka, Marielly, Renata, Wellington, Aldo, Grace, Mirele, Evandro, Jarbas, Jorge e Flávia.

Todos aqueles que me ajudaram diretamente durante esse período, em especial, Rodolfo, Marielly, Renata, Wellington, Aldo e Milka.

Aos colegas de turma do Mestrado em Ciência Animal, assim como a Prof.^a Cristina Krewer. Também agradeço aos funcionários da UNIVASF – Ciências Agrárias, pelo constante apoio nas diversas desenvolvidas.

Agradeço também à Embrapa Semiárido pelo apoio durante a realização do experimento, em especial ao Dr^a. Josir Laine e ao Dr. Nataniel Franklin.

Agradecemos a FACEPE pela concessão da bolsa de pós-graduação, além do CNPq e ao FINEP-IPESB, pelo auxílio financeiro que permitiu à compra de equipamentos e materiais de consumo. Ao IDR Sisal pelo apoio financeiro cedido e que foi de fundamental importância na realização deste trabalho.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta conquista na minha vida! Muito obrigada!

SUMÁRIO

	Pág.
Lista de Abreviaturas e Siglas	ix
Lista de Símbolos	x
Lista de Tabelas	xi
Lista de Figuras	xii
Resumo	xiii
Abstract	xiv
Introdução	01
Capítulo 1- Mastite estafilocócica em pequenos ruminantes: resistência aos antimicrobianos e produção de biofilme	04
Resumo.....	05
Abstract.....	06
1. Introdução.....	07
2. Tratamento e prevenção da mastite.....	11
3. Resistência aos antimicrobianos.....	13
4. Gene <i>mecA</i>	16
5. Gene <i>blaZ</i>	17
6. Gene <i>erm</i>	18
7. Bombas de efluxo.....	19
8. Biofilme.....	20
9. Conclusão.....	25
10. Referências bibliográficas.....	27
Capítulo 2 – Antimicrobial resistance of <i>Staphylococcus</i> spp. from small ruminant mastitis	40
Abstract.....	41
1. Introduction.....	42
2. Material and methods.....	43
2.1 Bacterial.....	43
2.2 Antimicrobial susceptibility test.....	43
2.3 Biofilm production.....	43
2.4 Monoplex PCR for <i>icaD</i> , <i>mecA</i> , <i>ermA</i> , B ,C and <i>msrA</i> genes.....	43
2.5 Efflux pump detection.....	44
3. Results.....	44
4. Discussion.....	45
5. Conclusions.....	48
6. References.....	49
Conclusões	57
Referências bibliográficas	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	Adenosine triphosphate - binding cassette
ATP	Trifosfato de Adenosina
Bap	Biofilm associated protein
CCS	Contagem de Células Somáticas
CECS	Contagem Eletrônica de Células Somáticas
CMT	California Mastitis Test
CNS	Coagulase Negative <i>Staphylococcus</i>
CPS	Coagulase Positive <i>Staphylococcus</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP's	Desoxirribonucleotídeo Fosfatado
erm	Erythromycin ribosome methylase
HCl	Ácido Clorídrico
Kb	Kilobase
KCl	Cloreto de potássio
MATE	Multidrug and toxic compound extrusion
MDR	Multi Drug Resistance
MFS	Major Facilitator Super Family
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MRSA	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
MIC	Concentração Inibitória Mínima
SCC _{mec}	<i>Staphylococcal cassette chromosome mec</i>
SMR	Small multidrug resistance
SCN	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa
SCP	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva
PBP	Proteína Ligadora de Penicilina
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PIA	Adesina Intercelular Polissacarídica
pH	Potencial Hidrogeniônico

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
mL	Mililitro
mM	Milimolar
μL	Microlitro
μg	Micrograma
pb	Par de base
%	Porcentagem

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Capítulo 1	
Tabela 1. Metodologias de detecção de biofilmes com suas vantagens e desvantagens.....	39
Capítulo 2	
Table 1. Oligonucleotide primers and amplification conditions.....	54
Table 2. Distribution of <i>Staphylococcus</i> spp. isolates from small ruminant mastitis in Pernambuco and Bahia States, Brazil according to resistance genes and multi drug resistance rates.....	55

LISTA DE FIGURAS

	Capítulo 2	Pág.
Figure 1. Perceptual of resistant <i>Staphylococcus</i> spp. isolates in disk diffusion test.....		56

RESUMO

A mastite é uma doença infecciosa mais importante dos rebanhos leiteiros. O agente etiológico importante da mastite é *Staphylococcus* spp. e especial preocupação está associada à resistência aos antimicrobianos dos isolados. O presente estudo visa determinar a resistência antimicrobiana através de marcadores fenotípicos e genotípicos em *Staphylococcus* spp. isolados de mastite em pequenos ruminantes nos estados de Pernambuco e Bahia no Brasil. O potencial de produção de biofilme dos isolados foi determinada pelo teste de Ágar Vermelho Congo e detecção do gene *icaD*. Os padrões de resistência aos antimicrobianos foram avaliados pelo teste de difusão em disco e detecção dos genes *mecA*, *blaZ*, *ermA*, *ermB*, *ermC* e *msrA* por PCR. O teste de triagem de bomba de efluxo foi realizado através do crescimento em Ágar Muller Hinton contendo brometo de etídio. No geral o percentual de resistência às drogas testadas foi baixo, com exceção do ácido nalidíxico (59,1%= caprino e 56,4%=ovino) e amoxicilina que apresentaram 57,3% e 18,0%, para caprino e ovino respectivamente. Em Ágar Vermelho Congo 7,1% dos isolados foram considerados produtores de biofilme em caprinos e 0,5% em ovinos, enquanto que 26,2% e 6,2% dos caprinos e ovinos tinham o gene *icaD* na PCR, respectivamente. Todas as amostras testadas foram negativas para o gene *mecA* na PCR. Para os outros determinantes da resistência antimicrobiana foram obtidos 37,1% em caprinos e 8,6% em ovinos para *blaZ*, no entanto para o genes *ermA* e *ermC* 1,4% e 16,2% foram positivos na PCR para caprinos. O gene *ermB* apresentou amplificação de 10% para caprinos e 0,5% em ovinos e apenas 0,95% foram positivas para *msrA* em caprinos. Setenta e três amostras de *Staphylococcus* spp. foram negativas para todos os genes testados na PCR. Quarenta e um isolados foram positivos para bomba de efluxo. Os isolados foram menos resistentes à gentamicina e quinolonas. A PCR para o gene *icaD* foi mais precisa. Descobrir os níveis de resistência nos isolados provenientes dessas regiões pode ser vital no tratamento e controle efetivo da mastite.

Palavras-chave: caprinos, ovinos, *Staphylococcus* spp., multirresistência, *mecA*, *blaZ*, biofilme.

ABSTRACT

Mastitis is a major infectious disease of dairy herds. *Staphylococcus* spp. is one of the most important mastitis cause and special concern is associated to antimicrobial resistance of the bacterial isolates. This present study aims to determine the phenotypic and genotypic markers of antimicrobial resistance in *Staphylococcus* spp. isolated from small ruminant mastitis in the Brazilian states of Pernambuco and Bahia. The potential for biofilm production was determined by the Congo Red Agar test and detection of *icaD* gene. Resistance patterns to antimicrobial drugs were evaluated by disk diffusion test and detection *mecA*, *blaZ*, *ermA*, *ermB*, *ermC* and *msrA* genes by PCR. Efflux pump screening test was performed by culture in Muller Hinton Agar containing ethidium bromide. In general, the percentage of resistance to tested drugs was low, with the exception of nalidixic acid (59.1% = goats and 56.4% = sheep) and amoxicilin, claiming 57.3% and 18.0% for goats and sheep respectively. On Congo Red Agar, 7.1% of the goats isolates were considered biofilm producers whilst only 0.5% of the sheep isolates had the same feature. At the same time, 26.2% and 6.2% - goats and sheep respectively - of the isolates had the *icaD* gene. All tested samples were negative for the *mecA* gene. The *blaZ* gene was present in 37.1% of goats isolates and 8.6% from sheep, however the PCR detection of the genes *ermA* and *ermC* came positive for 1.4% and 16.2% of goats isolates, respectively. The *ermB* gene amplification was positive in 10% of goats isolates and 0.5% in sheep and only 0.95% of goats isolates were positive for *msrA*. Seventy one *Staphylococcus* spp. isolates were negative to all tested genes. Forty one isolates were positive for efflux pump. The isolates were less resistant to gentamicin and quinolones. The *icaD* gene PCR was more accurate than Congo Red Agar test. Discover the resistance levels in the isolates from these regions could be vital for the effective treatment and control of mastitis.

Key-Words: goat, sheep, infectious, milk, *mecA*, *blaZ*, efflux pump.

Introdução

O rebanho de pequenos ruminantes representa um número expressivo no cenário nacional, principalmente na Região Nordeste do país, onde se encontra 93% e 55% de caprinos e ovinos, respectivamente, sendo os estados da Bahia, Ceará, Pernambuco e Piauí os maiores detentores na criação desses animais (IBGE, 2009).

A adaptação eficiente destes animais às condições edafoclimáticas da região, além da baixa necessidade de recursos iniciais, torna a criação de ruminantes deste porte uma alternativa viável para a geração de renda, promovendo maior segurança alimentar para as famílias dependentes dessa atividade, principalmente aquelas alocadas nas áreas mais secas (Holanda Júnior & Araújo, 2004, Nogueira et al., 2008). Segundo Quadros (2008), a adaptabilidade dos caprinos às condições adversas faz com que eles apresentem maior eficiência produtiva em relação a qualquer outro ruminante doméstico, inclusive ovino, bovino e bubalino, uma vez que estão presentes em regiões onde o desenvolvimento de outras espécies é inviável.

Os pequenos ruminantes possuem um papel importante na nutrição e na renda da população mundial (Mbilu, 2007). Esses animais servem primariamente como fonte de carne e leite, para alimentação das populações de média e baixa renda, como fonte de proteína animal de baixo custo, mas também fornecem pele e adubo (Silva & Araújo, 2000). Ovelhas e cabras estão relacionadas com a produção de aproximadamente 16% da carne mundial e de quantidades similares em relação à pele e leite (Mbilu, 2007).

Nesse contexto, fatores como a falta de organização por parte dos criadores, bem como a escassez na assistência técnica especializada, e a precariedade do manejo sanitário na região Nordeste, são alguns dos obstáculos que impedem o desenvolvimento da atividade. Assim os problemas sanitários, nutricionais e de manejo em geral, acabam limitando o potencial dos animais (Vieira et al., 1998). Em pequenos ruminantes, alguns fatores relacionados à sanidade do rebanho são considerados como limitantes para a exploração comercial, entre eles a mastite.

Além das alterações quantitativas e qualitativas do leite, a ocorrência de mastite nos rebanhos determina perdas econômicas acentuadas, principalmente quando há o surgimento de casos clínicos, além dos problemas inerentes à saúde pública, devido aos riscos de ocorrência de doenças de origem alimentar causadas pelo consumo de leite ou derivados com baixa qualidade microbiológica (Vautor et al., 2005, Contreras et al., 2007, Santos, 2009). Esta enfermidade acarreta aumento nas despesas com assistência veterinária, medicamentos e substituição de fêmeas decorrente da redução de sua vida útil pela perda da glândula mamária comprometida e consequente desvalorização comercial do animal (Freitas et al., 2005, Santos et al., 2007). Além disso, observa-se elevação nas taxas de mortalidade de ovelhas e cordeiros em rebanhos com alta prevalência da enfermidade (Vautor et al., 2003).

Considerada uma doença multifatorial de grande importância para a pecuária leiteira, a mastite pode ser classificada quanto à forma de apresentação, em clínica ou subclínica, sendo no entanto, uma doença de difícil controle (Pyörälä, 2002). A mastite subclínica tem sido considerada a forma mais preocupante, pois se caracteriza pela ausência de sinais clínicos, o que dificulta sua detecção e, conseqüente, intervenção terapêutica, podendo permanecer silenciosa no rebanho,

sem alterações evidentes no úbere e da secreção láctea, com efeitos significativos tanto na produção como na qualidade do leite (Hartman et al., 2009). Segundo Santos (2006), a etiologia da mastite pode ser de origem tóxica, traumática, alérgica, metabólica ou infecciosa.

Os *Staphylococcus* spp. são considerados importantes causadores de mastite em rebanhos leiteiros, visto que, apresentam vários fatores de virulência que contribuem para sua persistência no tecido mamário, além de se destacar pela capacidade de ser ou se tornar resistente a vários antibióticos (Santos et al., 2003, Freitas et al., 2005). Espécies de *Staphylococcus* coagulase negativos (SCN), bem como o *Staphylococcus aureus*, têm merecido atenção especial devido à emergência de linhagens resistentes a múltiplos antibióticos (Neves et al., 2007, Taponen & Pyörälä, 2009). O fenômeno da resistência bacteriana aos antimicrobianos é um sério problema, pois muitos dos antibióticos utilizados não apresentam efeito sobre os microrganismos com essa característica, dificultando o tratamento dos animais e dos seres humanos. O agravamento dessa resistência está associado ao uso freqüente e indiscriminado de antimicrobianos (pressão seletiva), às aplicações sub-terapêuticas de antimicrobianos para a prevenção de doenças e, aos mecanismos de transferência de genes de resistência entre os microrganismos. Estas situações são comumente observadas quando há surtos de mastite (Witte, 2000, Brito et al., 2001, Cunha et al., 2006).

Nesse caso, a incorporação de conhecimentos e de tecnologias na prevenção e no controle de doenças na caprinocultura leiteira poderá não só incrementar a produtividade e a saúde do rebanho, mas assumir posição estratégica no processo de comercialização ao garantir a qualidade do leite e seus produtos, além de oferecer segurança ao consumidor (Alves, 2008).

Nesse presente estudo, propusemos como de suma importância caracterizar fenotipicamente os isolados de *Staphylococcus* spp. envolvidos nos casos de mastite nos estados de Pernambuco e Bahia, bem como verificar a presença de biofilmes, afim de indicar seu potencial em ocasionar infecções de caráter crônico. Além disso, fez-se necessário determinar a presença de genes de resistência, destacando este perfil para indicar o melhor tratamento possível para os animais infectados.

CAPÍTULO 1

**Mastite estafilocócica em pequenos ruminantes: resistência aos antimicrobianos e produção de biofilme
(A ser submetido, como artigo de revisão, à Ciência Rural)**

**Mastite estafilocócica em pequenos ruminantes: resistência aos antimicrobianos e
produção de biofilme**

**Staphylococcal mastitis in small ruminants: antimicrobial resistance and biofilm
production**

Chirles Araújo de França^I, Josir Laine Aparecida Veschi^{II}, Mateus Matiuzzi da Costa^{III}

- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA-

RESUMO

A mastite é uma das doenças que mais ocorre nos rebanhos leiteiros em todo o mundo. Bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. são considerados os mais importantes patógenos de mastites contagiosas e crônicas que muitas vezes resultam no descarte de animais de grande potencial genético. A capacidade de resistir aos diferentes compostos antimicrobianos também é uma característica de extrema importância em bactérias, sendo esta associada a diferentes genes. A permanência (cronicidade) desta e de outras infecções bacterianas nos animais está diretamente relacionada com a capacidade de crescer em biofilmes. Somente a correta compreensão destas características possibilitará o desenvolvimento de medidas adequadas de terapia, prevenção e controle da mastite em pequenos ruminantes.

Palavras-Chave: caprino, ovinos, mastite, *Staphylococcus* spp., multirresistência, biofilme.

Recebido em de de 2010.

Aceito para publicação em de 2010.

^(I) Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), Rodovia BR 407, Km 12 Lote 543 – Projeto de Irrigação Nilo Coelho – S/N C1, Petrolina, PE 56300-000, Brasil. e-mail: chirleskb@yahoo.com.br *Autor para correspondência.

^(II) Embrapa Semiárido, Rodovia BR 428, Km 152, Zona Rural – Caixa Postal 23, Petrolina, PE 56302-970, Brasil. e-mail: josi.veschi@cpatsa.embrapa.br

^(III) Colegiado de Zootecnia, Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), Rodovia BR 407, Km 12 Lote 543 – Projeto de Irrigação Nilo Coelho – S/N C1, Petrolina, PE 56300-000, Brasil. e-mail: mateus.costa@univasf.edu.br

ABSTRACT

Mastitis is one of the most prevalent diseases in dairy herds around the world. Bacteria from *Staphylococcus* genus are considered the most important pathogen from contagious and chronic mastitis that several times results in female discards. The ability of bacteria to resist to different antimicrobial drugs is a very important characteristic, being associated to several genes. The large time bacteria infection in the animals is directly associated with the ability to biofilm formation. The complete understanding of this characteristics helps to development of correct actions for therapy, prevention and control of mastitis in small ruminants.

Key- Words: goats, sheep, mastitis, *Staphylococcus* spp. multidrug resistance, biofilm.

1. INTRODUÇÃO

A caprinovinocultura é uma das alternativas mais promissoras para o semiárido (MOREIRA et al., 1998) como também é uma atividade que vem apresentando um crescimento significativo. Esta atividade é relacionada à agricultura familiar, além de possuir um forte compromisso com o desenvolvimento regional. Na região Nordeste, a maior parte da produção visa a subsistência (NOGUEIRA et al., 2008). Esses animais representam uma parte significativa do rebanho nacional, sendo 93 % e 55% dos caprinos e ovinos criados no Nordeste (IBGE, 2009). Grande parte da pecuária desenvolvida nos estados nordestinos é definida como semi-extensiva e representa uma atividade de grande importância econômica e social. A caprinocultura leiteira, por exemplo, é uma atividade que tem crescido significativamente na agropecuária brasileira, conquistando assim novos mercados para o leite de cabra e seus derivados (ALBUQUERQUE et al., 2009). Contudo, alguns entraves especialmente de ordem sanitária, vêm contribuindo para a limitação desta atividade. Dentre eles está a mastite que representa o maior perigo para os rebanhos leiteiros (bovinos, caprinos ou ovinos).

Em animais acometidos pela doença, observa-se a redução da quantidade de leite e subsequentemente de seus derivados, sendo que nos casos de maior severidade e cronicidade é recomendado o descarte do animal. Em rebanhos de ovinos de corte, a mastite também é problemática, pois reduz a capacidade das fêmeas em alimentar seus filhotes, atrasando o desenvolvimento dos cordeiros (SANTIAGO et al., 2009). MA et al. (2006) demonstraram que além de comprometer a qualidade do leite, a mastite também causa outras modificações fisiológicas no animal que podem comprometer mais ainda sua saúde.

Nesse contexto, as perdas em qualidade como em quantidade de leite que são provocadas por mastites são variáveis e dependem de fatores ligados ao agente etiológico, do sistema imune do animal e, principalmente, dos cuidados e medidas sanitárias que são

adotados (BAREILLE et al., 2003). A mastite pode ser causada por uma grande variedade de patógenos (contagiosos ou ambientais) logo, para garantir as melhores condições de saúde do rebanho, toda a fazenda deve estar sob as melhores condições de higiene (CONTRERAS et al., 2007).

Esta doença é ocasionada por vários microrganismos, particularmente de origem bacteriana, que podem ser classificados em agentes contagiosos e ambientais. Os contagiosos são transmitidos fundamentalmente no momento da ordenha ou no ato de mamar do filhote e são representados por *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP), como o *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN), como *S. epidermidis* e *S. caprae*, *Streptococcus agalactiae* e *Corynebacterium bovis*. Enquanto que os agentes ambientais são transmitidos antes e após as ordenhas e incluem principalmente as enterobactérias (*Escherichia coli*, *Klesbsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*), *Nocardia* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, fungos e algas (RADOSTITS et al., 2002; CONTRERAS et al., 2007).

As bactérias do gênero *Staphylococcus*, têm sido apontadas como os principais patógenos responsáveis pela mastite intramamária em pequenos ruminantes (COUTINHO et al., 2006; LANGONI et al.; 2006, MOTA, 2008; BOLSANELLO et al., 2009). Infecções intramamárias causadas por *S. aureus* têm merecido atenção especial, pois esta bactéria é responsável por dois tipos graves de mastite (mastite gangrenosa) e mastite subclínica, sendo seu tratamento difícil devido à elevada resistência (FAGUNDES & OLIVEIRA, 2004). *S. aureus* produz algumas toxinas contribuindo para a patogênese da mastite e também têm um papel em doenças alimentares, mesmo com leite pasteurizado (CONTRERAS et al., 2007). Outro fator de virulência produzido por *S. aureus* é a formação de leucotoxinas, estas por sua vez, podem seletivamente destruir leucócitos polimorfonucleares e monócitos. RAINARD et al. (2003), em uma investigação das ações de leucotoxinas de cepas *S. aureus* isolados de

vacas, ovelhas e cabras com mastite detectaram que a maioria dos isolados eram leucotóxicos e que cepas de isolados de pequenos ruminantes foram mais leucotóxicas em relação as cepas de origem bovina.

Staphylococcus coagulase negativa (SCN) são os mais prevalentes patógenos causadores de mastite subclínica em ruminantes leiteiros, provavelmente em virtude do comportamento oportunista deste gênero nas infecções mamárias, favorecido pela sua manutenção como agente da microbiota da pele e úbere de animais domésticos (COUTINHO et al., 2006). Embora menos patogênico que *S. aureus*, SCN podem também produzir mastite subclínica persistente, significativo aumento de CCS, causar mastite clínica (DEINHOFER & PERNTANER, 1995; CONTRERAS et al., 1997), bem como produzir enterotoxinas termoestáveis (UDO et al., 1999). Entretanto, apesar do reconhecido papel dessa bactéria como maior causadora de infecções intramamárias em pequenos ruminantes, a patogenicidade de diferentes espécies de SCN é variável. Esta patogenicidade também é associada a aderência, pois estes microrganismos têm grande poder de adesão, produção de enzimas extracelulares e toxinas capazes de provocar níveis elevados de lesão tecidual (MOTA, 2008). A maioria das espécies de SCN, comumente isoladas de mastite subclínica em cabras e ovelhas são *Staphylococcus epidermidis*, *S. caprae*, *S. simulans*, *S. chromogenes* e *S. xylosus* (BERGONIER et al., 2003).

Staphylococcus epidermidis e *S. caprae* estão entre os mais prevalentes patógenos da mastite em cabras e *S. epidermidis* e *S. simulans* em ovelhas. Entre as espécies de SCN, existe uma forte associação de *S. epidermidis* com altas contagens de células somáticas (CCS) em ovelhas e cabras, diferentemente do observado para *S. caprae* (BERGONIER et al., 2003). A presença de diferentes espécies de SCN pode ser atribuída, até certo ponto, as práticas de controle da mastite, bem como o protocolo e tipo de desinfetante usado para imersão do teto ou terapia no período seco (CONTRERAS et al., 2003).

Normalmente o isolamento de SCN está associado à ausência de sinais clínicos evidentes. Isso pode resultar em danos no tecido da glândula mamária com conseqüente redução da produção leiteira devido à progressão silenciosa da infecção (CONTRERAS et al.; 1997, SOARES et al.; 2008). Estes patógenos podem causar infecções constantes, que resultam no aumento da CCS, tendo como principal conseqüência a diminuição da qualidade do leite. Somado a esse cenário, o fenômeno da resistência antimicrobiana é comum entre as espécies de SCN. Estudos têm demonstrado que estes agentes são reservatórios de genes de resistência, sendo potenciais transmissores desses para outras espécies de estafilococos (TAPONEN & PYÖRÄLÄ, 2009). Por outro lado, apesar da alta prevalência de SCN nos casos de mastite em caprinos e ovinos os mecanismos de patogenicidade relacionados à infecção subclínica ainda são desconhecidos (CONTRERAS et al., 2007).

No tocante ao diagnóstico da mastite, este pode ser realizado por exames diretos e indiretos, onde as técnicas diretas baseiam-se na identificação do agente etiológico mediante sua presença no leite mastítico, enquanto os métodos indiretos fundamentam-se em critérios de evolução de intensidade da reação inflamatória (MOTA, 2008).

A cultura bacteriana é considerada como o padrão ouro para o diagnóstico de infecções intramamárias em espécies leiteiras (SÁNCHEZ et al., 2004; CONTRERAS et al., 2007). A contagem de células somáticas (CCS) constitui o princípio das técnicas de diagnóstico indireto das mastites em todas as espécies de ruminantes leiteiros (MOTA, 2008). Por isso, CCS é amplamente utilizada para avaliação do *status* sanitário da glândula mamária em cabras e ovelhas (McDOUGALL et al., 2001).

Estudos desenvolvidos por LEITNER et al. (2009) identificaram um surto de mastite subclínica por SCN, onde foi observada a necessidade do uso de técnicas moleculares para uma rápida identificação destes microrganismos. Da mesma forma, outros autores como PYÖRÄLÄ & TAPONEN (2009), também sugerem a aplicação dessas técnicas para

identificação de SCN, uma vez, que os métodos fenotípicos não apresentam uma total confiança nos resultados. Estudos com epidemiologia molecular envolvendo *S. aureus* provenientes de explorações leiteiras em caprinos e ovinos no Brasil ainda são limitados (AIRES-DE-SOUSA et al., 2007). Tais autores caracterizaram fenotípica e genotípicamente *S. aureus* isolados de vacas, ovelhas, cabras, e búfalas em diferentes regiões do estado do Rio de Janeiro. Estes chegaram a conclusão que apenas um tipo clonal principal foi responsável por mastite subclínica nessas regiões, além destes não demonstrarem especificidade por hospedeiro.

2. Tratamento e Prevenção da Mastite

A prevenção é sem dúvida a chave para o controle da mastite. Um adequado manejo de ordenha (higiene, procedimentos e equipamentos corretos) pode diminuir o número de animais acometidos por mastite clínica e subclínica, reduzir a taxa de novas infecções, melhorar a CCS (contagem de células somáticas) do rebanho, além de propiciar um leite produzido com qualidade (DIAS, 2007). O tratamento precoce da mastite aliado a outras medidas constitui importante profilaxia, pois elimina a fonte de infecção (LANGONI et al., 2000). Segundo CHAFFER et al. (2003) e GONZALO et al. (2004), a terapia no período seco é uma prática comum que tem sido recomendada em programas de controle por quase 30 anos. No entanto, existem poucos relatos deste tipo de tratamento para caprinos (FOX et al., 1992) e da eficácia da terapia seca para ovinos (CHAFFER et al., 2003). Ao lançar mão de medicamentos para o tratamento da mastite, vários fatores devem ser levados em consideração, incluindo a escolha da droga, a suscetibilidade do organismo, determinado através da concentração inibitória mínima (MIC) de teste de cada droga, duração do tratamento e otimização da dosagem, e o estado imunológico do animal (ERSKINE et al., 1993).

A maioria das rotinas implementadas para vacas leiteiras, incluindo a ordem de ordenha de acordo com o status sanitário, são também aplicáveis para pequenos ruminantes, especialmente quando os rebanhos apresentam alta incidência de infecções intramamárias (CONTRERAS et al., 2007). RUPP et al., (2000) afirmam que o primeiro passo de um programa de controle de mastite é verificar o quadro atual da doença no rebanho antes da realização de alterações no manejo, sendo um ponto importante a conscientização dos produtores quanto às perdas econômicas, assim como a educação sanitária dos tratadores.

A adequada higiene do úbere é considerada a medida isolada mais importante na prevenção de novas infecções intramamárias, assim como a técnica tem sido aplicada em pequenos ruminantes, principalmente, em rebanhos altamente infectados (PAAPE et al., 2001; BERGONIER & BERTHELOT, 2003; CONTRERAS et al., 2003), e tem revelado eficiência em prevenir a mastite nesses animais. Existe uma relação direta entre o número de bactérias presentes nos tetos e a taxa de infecções intramamárias. Desta forma, todos os procedimentos que contribuam para a manutenção de uma baixa população de bactérias na superfície dos tetos ajudam de forma significativa no controle da mastite (FONSECA & SANTOS, 2000). A ordenha se caracteriza como uma prática aparentemente simples, porém muito importante na exploração leiteira, pois a forma como é processada influencia diretamente na qualidade do leite (DINGWELL et al., 2004). O manejo da ordenha é um dos principais fatores relacionados ao controle da mastite, sendo um de seus objetivos assegurar que os tetos estejam limpos e secos antes do seu início, assim como o bom funcionamento da sala de ordenha, devendo ser limpa, arejada e desinfetada com produtos adequados (SANTOS et al., 2004). Segundo DINGWELL et al. (2004) a realização do pré e pós-*dipping* reduz a taxa de novas infecções no rebanho, sendo a imersão de tetos na pós-ordenha em solução desinfetante recomendado principalmente para o controle da mastite ambiental.

Apesar do controle da mastite ser principalmente dependente da prevenção, o aumento da capacidade de resposta imune do animal através da vacinação contra o agente específico é uma importante estratégia de controle (SANTOS & FONSECA, 2005). A utilização de vacinas no controle da doença têm se apresentado como alternativa bastante viável, uma vez que promove a redução nos custos e não interfere na qualidade do leite e saúde pública, já que reduz a necessidade do uso de antibióticos (PORTES et al., 2006). Embora as vacinas contra mastite apresentem efeito limitado, atuando de forma paliativa (CALZOLARI et al., 1997), podem ser potencializadas em associação com antibioticoterapia elevando os índices de cura de 20 para 70% (SEARS & BELSCHNER, 1998). Segundo ALBERTON et al. (2001), a vacinação com bacterina de *S. aureus* foi capaz de diminuir tanto a prevalência quanto a gravidade dos casos de mastite em vacas leiteiras. Resultados semelhantes foram encontrados por LEITNER et al. (2003) para uma bacterina composta de fragmentos de *S. aureus*. Trabalhos têm demonstrado a efetividade dos programas de vacinação contra mastite causada por *S. aureus* em ovelhas, mas não para cabras (AMORENA et al., 1994; TOLLERSRUD et al., 2002). Contudo, estudo desenvolvido por COELHO et al. (2008), demonstrou que a administração de vacina associada ao antimicrobiano em cabras leiteira com mastite subclínica apresentou redução significativa no número de tetos infectados.

3. Resistência aos antimicrobianos

Uso excessivo de antibióticos favorece o evento da resistência antimicrobiana, o que tem se tornado um problema tanto para animais como para humanos (CONTRERAS et al., 2007). A detecção de cepas de *S. aureus* resistentes aos aminoglicosídeos deve ser considerada uma preocupação para saúde pública, dado ao mecanismo de resistência similar encontrado em cepas isoladas em humanos (GONI et al., 2004).

Estudo desenvolvido por BJORLAND et al. (2005), demonstrou a distribuição de genes da resistência associado a *Staphylococcus* spp. em leite de vacas e cabras. Nesse sentido, poucas drogas são especificamente licenciadas para uso em pequenos ruminantes, particularmente em cabras. O uso de antibióticos ou outras drogas de bovinos em pequenos ruminantes, ou até mesmo o uso de produtos indicados para ovinos em caprinos, constituem um alto risco devido à segurança e eficácia destes produtos em cada espécie, por serem em grande parte desconhecidos (MAVROGIANNI et al., 2004).

Os mecanismos de resistência apresentam uma grande diversidade. As bactérias podem apresentar tolerância ao composto simplesmente por não possuir o sítio de reconhecimento da droga até estratégias mais complexas envolvendo enzimas hidrolíticas, metilases ou complexos protéicos transmembrana que bombeiam compostos nocivos para o meio extracelular (bombas de efluxo) (LAMBERT, 2005; BERGER-BACHI & McCALLUM, 2006; KUMAR & SCHWEIZER, 2005; WEBBER & PIDDOCK, 2003). Essa grande diversidade permite que as bactérias sobrevivam a um amplo espectro de compostos utilizados especificamente para combatê-las.

Durante as décadas de 40 e 50 iniciaram-se debates intensos sobre a origem da resistência a drogas em microrganismos (CREAGER, 2007), uma vez que em 1939 já haviam sido detectados isolados bacterianos resistentes a sulfonamidas, e tão logo a penicilina foi disponibilizada comercialmente em 1941 - como solução para tratamento de infecções bacterianas, também foram isoladas bactérias exibindo resistência ao medicamento (CREAGER, 2007; WRIGHT, 2005). Por volta de 1955, três quartos das cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas de pacientes hospitalares eram resistentes à penicilina (CRAGER, 2007). Entretanto, é importante ressaltar que a má utilização dos agentes antimicrobianos, principalmente os antibióticos, foi e continua sendo o fator que mais contribui para a disseminação e surgimento de cepas resistentes. KOLÁR et al. (2001)

defendem que a utilização apropriada dos antibióticos deve vir acompanhada de estudos de avaliação de drogas individuais com o monitoramento regular do grau de resistência bacteriana.

Outra fonte de preocupação são as cepas resistentes oriundas de animais e alimentos. Estima-se que metade de todo o montante de antibióticos é utilizada no setor de produção animal, mercado de animais de companhia e indústria alimentícia (MONROE & POLK, 2000; UMBER & BENDER, 2009). MARTEL & COUDERT (1993) destacaram a importância de um programa de monitoramento de abrangência nacional que contemple pelo menos as principais espécies de animais criadas, além de testes que incluam alimentos e isolados ambientais. Tal estudo criaria uma base para a epidemiologia preditiva e para o uso racional dos antibióticos na criação de animais e na medicina veterinária. Essa é uma abordagem muito importante para o problema que se configurou com a dispersão de cepas apresentando resistência, uma vez que a utilização de antibióticos levou ao acúmulo de um “pool” de resistência em bactérias patogênicas comensais (BERGER-BACHI & McCALLUM, 2006).

As bactérias apresentam em seus cromossomos ou em elementos extracromossomais (plasmídeos, por exemplo) uma quantidade muito grande de genes destinados a proteção contra drogas antibacterianas. Estes genes permitem que as bactérias expressem enzimas capazes de destruir os antibióticos, sistemas de efluxo que bombeiam esses compostos para fora da célula, modificar os sítios alvo das drogas ou produzirem uma rota metabólica alternativa que contornam a ação do agente antimicrobiano (TENOVER & MCGOWAN JR., 2008; WRIGHT, 2005). Segundo UMBER & BENDER (2009), existem duas classificações distintas para os mecanismos de resistência: intrínsecos e adquiridos. Intrínsecos são aqueles que ocorrem naturalmente nos microrganismos. A resistência intrínseca é resultado de processos adaptativos gerais que não são necessariamente ligados a uma dada classe de antibióticos (WRIGHT, 2005). Nesta modalidade, o organismo não possui os sítios alvo do

agente (parede celular, por exemplo) ou a maquinaria de transporte que permite que a droga seja mais eficiente. Por outro lado, na resistência adquirida estão envolvidas a emergência ou obtenção de genes que codifiquem algum determinante de resistência. A mutação espontânea e a transferência de DNA cromossomal ou extracromossomal (plasmídios e bacteriófagos) são os principais veículos de surgimento e disseminação deste tipo resistência. BERGER-BACHI & McCALLUM (2006) observaram que concentrações subinibitórias de antibióticos estimulam a transferência de material genético relacionado com resistência. Este fato é uma evidência clara dos perigos que a má utilização desses medicamentos pode oferecer para a saúde pública.

Segundo WRIGHT (2005) é possível identificar 3 estratégias distintas de resistência aos agentes antimicrobianos: 1) modificações do sítio alvo da droga; 2) degradação do antibiótico e 3) efluxo do antibiótico para fora da célula. *Staphylococcus* spp. possuem diversas estratégias genéticas para resistir ao ataque de compostos antimicrobianos.

Vários genes de resistência são associados a múltipla resistência em *Staphylococcus* spp. entre os quais podemos citar: *mecA*, *blaZ*, *erm* (A, B e C) e *msrA*.

4. Gene *mecA*

O gene *mecA* é responsável pela resistência a meticilina (oxacilina). A estratégia consiste na expressão de uma proteína ligadora de penicilina (PBP) de baixa afinidade (PBP2a). A PBP é uma enzima biossintética expressa na parede celular e envolvida na montagem do peptídeoglicano componente da mesma. Encontra-se num componente genético grande chamado *Staphylococcal Cassette Chromosome mec* (SCC*mec*) que está integrado ao cromossomo de MRSA (*Methicilin Resistant Staphylococcus aureus*) e acredita-se que tenha sido adquirido por transferência horizontal de *Staphylococcus* coagulase negativos (LAMBERT, 2005; LEE et al., 2006; LI et al., 2007; LEONARD & MARKEY, 2008). Este

gene é conservado em todas as cepas de *Staphylococcus aureus* meticilina resistentes (LEE et al., 2006) e é a única responsável pela resistência verdadeira a meticilina em *Staphylococcus* spp. (HACKBARTH E CHAMBERS, 1989). A expressão do gene *mecA* é regulada por dois elementos genéticos; *mecI* e *mecRI* que codificam uma proteína repressora e uma de transdução de sinal, respectivamente (LEE et al., 2006).

Staphylococcus meticilina-resistentes são muito presentes em humanos e sua ocorrência em animais é baixa (VAN DUIJKEREN, 2004, WEESE & VAN DUIJKEREN, 2010). O primeiro isolamento de MRSA em animais foi no leite de vacas mastíticas (DEVRIESE & HOMMEZ, 1975), contudo são mais encontrados em animais de companhia (cães e gatos) e em equinos. Acredita-se que a colonização destes animais seja apenas transitória (WEESE & VAN DUIJKEREN, 2010). LEE et al. (2006) reportaram a detecção de *S. aureus* portadores do gene *mecA* em gado e galinha, entretanto em baixa quantidade. SAWANT et al. (2009) também detectaram baixa prevalência de bactérias obtidas de leite bovino carregando o gene *mecA*.

5. Gene *blaZ*

LI et al. (2007) destacaram uma elevação nos relatos de isolamento de bactérias de origem animal produtoras de β -lactamases de amplo espectro, bem como o aumento global de isolados bacterianos resistentes aos β -lactâmicos. Essas enzimas (amidases) utilizam o anel beta-lactâmico das penicilinas como substrato, degradando-as por hidrólise. Mais de 400 β -lactamases já foram descritas (LI et al., 2007). Os genes para a expressão de β -lactamases em *Staphylococcus* spp. estão organizados num cluster *blaZ-blaR1-blaI* que codificam respectivamente a β -lactamases BlaZ, o repressor BlaI e o antirepressor BlaR1 (LI et al., 2007).

Este gene pode ser encontrado tanto em animais quanto em humanos. MALIK et al. (2007) detectaram o gene *blaZ* em *Staphylococcus* spp. isolados de cães e gatos e o posterior sequenciamento dos fragmentos gerados por PCR possibilitou a inferência de cinco tipos de assinaturas protéicas. Dentre estas assinaturas, uma era inédita. Ao estudar isolados bacterianos - *S. aureus* e SCN - de bovinos e humanos OLSEN et al., (2006) conseguiram demonstrar a existência de três linhas evolutivas do gene *blaZ*, uma de origem plasmidial, outra de origem cromossomal e uma terceira intermediária. TENOVER et al., (2006) também encontrou o gene *blaZ* numa cepa de *Staphylococcus aureus* amplamente disseminada em humanos nos Estados Unidos, porém este estava associado ao um plasmídeo de 30Kb que carregava também o gene *msrA*.

6. Genes *erm*

A resistência para macrolídeos, lincosamida e estreptogramina B é determinada por uma família de genes chamados de *erithromycin ribosome methylase* (*ermA*, B e C). Estão amplamente distribuídos em isolados de *Staphylococcus* spp. oriundos de humanos e animais e estão localizados principalmente em plasmídios pequenos de 2,3-2,5Kb (HAUSCHILD et al., 2006). Estes genes são responsáveis pela expressão de N-metiltransferases que realizam a metilação e dimetilação de um resíduo de adeninas no domínio funcional peptidil transferase do rRNA 23S (LAMBERT et al., 2005).

NAWAZ et al. (2000) observaram a presença dos genes *ermA*, B e C em cepas de *Staphylococcus* spp. de humanos e aves, sendo *ermA* encontrado exclusivamente no cromossomo, ao passo que *ermC* estava localizado em pequenos plasmídios. Suas análises de RFLP do gene *ermA* evidenciaram uma origem comum. A prevalência destes três genes é bastante variável. WANG et al. (2008) observaram que em *S. aureus* isolados de mastite bovina os genes *ermB* e C foram mais predominantes, sem a presença de *ermA*. JENSEN et

al. (1999) encontrou os genes *ermA*, B e C em isolados de origem animal e humana, porém poucos exibiram mais de um destes genes simultaneamente. ALMER et al. (2002) por sua vez, observaram que o gene *ermA* era mais prevalente do que o gene *ermC* em isolados de MRSA humanos, sendo que não houve detecção do gene *ermB*.

7. Bombas de efluxo

Trata-se de uma classe muito diversa de elementos de resistência, dividida em cinco famílias: *major facilitator superfamily* (MFS), *adenosine triphosphate-binding cassette* (ABC) *superfamily*, *small multidrug resistance* (SMR) *family*, *resistance-nodulation-cell division* (RND) *superfamily* e *multidrug and toxic compound extrusion* (MATE) *family* (KUMAR & SCHWEIZER, 2005). Bombas de efluxo são proteínas de transporte (transmembrana) envolvidas na extrusão de substratos tóxicos (incluindo virtualmente todas as classes de antibióticos clinicamente relevantes) de dentro das células para o ambiente extracelular (WEBBER & PIDDOCK, 2003; KUMAR & SCHWIZER, 2005) e contribuem significativamente para a multirresistência bacteriana. O efluxo de antibióticos como mecanismo de resistência foi primeiramente reconhecido para a tetraciclina no fim da década de 70 (BALL et al., 1977) e início da década de 80 (McMURRY et al., 1980). Esses sistemas existem em bactérias gram-negativas, gram-positivas e eucariotos (WEBBER & PIDDOCK, 2003) e bombeiam os compostos de maneira ativa (com gasto de energia) utilizando o gradiente de prótons ou a hidrólise de ATP (família ABC) como força motriz (WEBBER & PIDDOCK, 2003). Na maioria dos casos são codificadas por genes cromossomais e em muitos casos fazem parte de um operon, com um gene regulador controlando sua expressão (WEBBER & PIDDOCK, 2003; KUMAR & SCHWEIZER, 2005). As bombas da família ABC são as únicas que utilizam a hidrólise de ATP como força motriz para a extrusão de compostos tóxicos e estão intimamente ligadas à resistência a macrolídeos. São codificadas

pelos genes *msrA/B/C*. A primeira detecção destes genes em bactérias foi feita em isolados de *Staphylococcus epidermidis* (LEVY, 1992). Neste caso, o gene *msrA* estava contido num plasmídeo. LOCH et al. (2005) detectaram os genes *msrA/C* em isolados de *Streptococcus* de leite bovino e WANG et al. (2008) também encontraram os genes *msrA/B* em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina, porém com baixa prevalência. SAWANT et al. (2009) relataram a presença de isolados de *S. epidermidis* exibindo estratégia de resistência a eritromicina baseada no gene *msrA*, porém também em baixa quantidade.

8. Biofilme

Biofilmes são considerados um estágio do desenvolvimento bacteriano (O' TOOLE et al., 2000). Nesta estrutura, as bactérias passam da forma planctônica para a vida sésil e as modificações na fisiologia e resistência aos diversos tipos de estresse são evidentes (O' TOOLE et al., 2000).

As razões pelas quais uma bactéria cresce em modo biofilme são diversas e podem ser resumidas a: defesa, colonização do ambiente e crescimento em comunidade (JEFFERSON, 2004). Entretanto, existe um consenso de que as modificações ambientais são o fator chave para o acionamento dos processos de formação do biofilme (APARNA & SARITA, 2008). É importante ressaltar que as condições normais de qualquer hospedeiro ou do ambiente são hostis o suficiente para forçar os microrganismos a passarem a maior parte de sua existência crescendo em biofilmes (JEFFERSON, 2004).

Os biofilmes representam papel essencial nas infecções bacterianas. A cronicidade e resistência a agentes antimicrobianos de certas infecções estão intimamente ligadas à presença de biofilmes. De fato, o biofilme é um fator de virulência importante encontrado em algumas bactérias como, por exemplo, *Staphylococcus* spp. (JAIN & AGARWAL, 2009).

A primeira observação registrada de biofilmes foi realizada por Arthur T. Henrici em 1933, porém apenas em 1978 (COSTERTON et al., 1978) sua natureza abrangente e predominante foi devidamente constatada.

DONLAN & COSTERTON (2002) construíram um conceito bastante abrangente e completo para definir os biofilmes: são uma comunidade microbiana séssil composta por células irreversivelmente aderidas a um substrato, interface ou nelas próprias, embebidas numa matriz de substâncias poliméricas extracelulares por elas produzidas e exibindo um fenótipo alterado no que diz respeito à taxa de crescimento e transcrição genética. Os biofilmes, na forma como ocorrem nos ambientes naturais, costumam conter múltiplas espécies microbianas, podendo se consolidar num amplo espectro de superfícies bióticas e abióticas enquanto aqueles formados por apenas uma espécie estão mais associados a uma variedade de infecções e implantes médicos (catéteres e sondas) (O' TOOLE et al., 2000; JEFFERSON, 2004). Muitos dos patógenos de importância veterinária existem predominantemente em sua forma aderente (OLSON et al., 2002).

LASA et al. (2005) dizem que a capacidade de formar biofilme parece não ser restrita a um grupo específico de microrganismos e hoje se considera que, sob as condições ambientais adequadas, todos os microrganismos são capazes de crescer em biofilmes. Contudo, apesar de toda esta diversidade, a grande maioria dos estudos encontrados na literatura foca especialmente em biofilmes bacterianos. Este fato tem relação direta com a importância das infecções bacterianas para as ciências médicas e veterinárias (CLUTTERBUCK et al., 2007; PARSEK & SINGH, 2003).

A formação de um biofilme é um processo cíclico e basicamente composto de quatro estágios: iniciação, maturação, manutenção e dissolução (JEFFERSON, 2004). Sinais ambientais são considerados fundamentais no que diz respeito a sinalização para o início dos processos de produção de biofilme (O' TOOLE et al., 2000; APARNA & SARITA, 2008).

Dentre estes sinais estão as mudanças nos nutrientes disponíveis e suas concentrações no meio, variações do pH, temperatura e osmolaridade e a presença de ferro. No momento que tais sinais são percebidos pelas células planctônicas (células livres), estas passam por profundas mudanças fisiológicas e morfológicas a fim de se adaptarem a vida sésil no biofilme. Neste estágio inicial, ocorre a fixação das células no substrato e a posterior colonização das regiões circunvizinhas. Na maturação, as células inicialmente fixadas continuam a se multiplicar, aumentando a população e o número de colônias. Adicionalmente estas incrementam a produção de exopolissacarídeos e adesinas, dois fatores muito importantes que garantem a integridade do biofilme.

A quantidade de elementos genéticos envolvidos na produção de biofilme é muito diversificada (GENEVAUX et al., 1996; HEILMANN et al., 1996; MACK et al., 1994; MACK, 1999; O' TOOLE & KOLTER, 1998) e uma grande quantidade de funções e estruturas são reguladas, desde a adesão das células até a resposta ao estresse (JEFFERSON, 2004). Um dos componentes genéticos mais estudados e utilizados para identificação de *Staphylococcus* spp. produtores de biofilme é o locus *ica*. Este locus é um conjunto de quatro genes organizados em um operon (*icaADBC*) responsável pela expressão de uma adesina intercelular polissacarídica (PIA) ou de N-acetilglicosamina polimérica (PNAG) e a co-expressão dos genes *icaA* e *icaD* é fundamental para a síntese completa do muco. O locus *ica* é o componente genético melhor compreendido na síntese de biofilmes de *Staphylococcus* spp. e está presente na maioria dos isolados clínicos humanos e de mastite bovina (O' GARA, 2007). Outro componente envolvido na produção de biofilmes é o gene *bap* e a proteína associada a biofilme (Bap – *Biofilm Associated Protein*) expressa por este gene promove tanto a fixação primária a uma superfície quanto a adesão intercelular (CUCARELLA et al., 2004).

Os motivos pelos quais microrganismos, em especial bactérias, produzem biofilme ainda não foram determinados, contudo algumas hipóteses já foram propostas. A primeira

hipótese é a da defesa. Biofilmes são resistentes a forças de cisalhamento, logo conseguem resistir às tensões criadas pelo fluxo da saliva (placa dentária), da corrente sanguínea e até mesmo da água (vide biofilmes que colonizam canos e rochas em riachos). Entretanto, vale ressaltar que a resistência de determinado biofilme é proporcional ao ambiente em que se desenvolve. Biofilmes que crescem em ambientes menos agressivos tendem a ser mais sensíveis a quebra mecânica (MELCHIOR et al., 2006). Organismos dentro de biofilmes são capazes de suportar restrições nutricionais, mudanças no pH, espécies reativas de oxigênio, desinfetantes e antibióticos (JEFFERSON, 2004). Também são resistentes a fagócitos do sistema imunológico. A cronicidade de certas infecções é inquestionavelmente, devido ao desenvolvimento de biofilme no hospedeiro. A segunda hipótese é atribuída à capacidade de colonização de um ambiente. Neste caso, bactérias formariam biofilmes para garantir a permanência em um nicho favorável. Outra hipótese considerada é a de que o modo biofilme seria um padrão de crescimento ao invés de uma alternativa. As condições normais de um ambiente ou hospedeiro são hostis o suficiente, forçando os microrganismos a passarem a maior parte de sua existência como biofilmes (JEFFERSON, 2004).

A hipótese da defesa parece ser a mais apropriada principalmente considerando a extrema eficiência com a qual o biofilme protege seus componentes da ação dos agentes antimicrobianos como as drogas antimicrobianas e os desinfetantes. Biofilmes consolidados podem tolerar agentes antimicrobianos presentes em concentrações de 10 a 1000 vezes necessárias para eliminar bactérias da mesma espécie em sua forma planctônica (COSTERTON et al., 1995; JEFFERSON, 2004; MAH & O' TOOLE, 2001). A presença de elementos genéticos relacionados à produção de biofilmes foi diretamente associada com a resistência a múltiplos antibióticos (CUCARELLA et al., 2004). Em trabalhos publicados por LEWIS (2001) e MELCHIOR et al. (2009) foram levantados dois motivos pelos quais os biofilmes garantem tamanha proteção contra antibióticos: a penetração restrita e a redução na

taxa de crescimento dos microrganismos. O primeiro, bastante óbvio, diz respeito à camada protetora de exopolissacarídeos. A estrutura física e/ou química dos exopolissacarídeos ou outros aspectos da arquitetura do biofilme permitem a exclusão dos agentes da comunidade de microrganismos. Quanto à alteração na taxa de crescimento, ambos os trabalhos afirmam que quando sequestradas dentro do biofilme a taxa de crescimento é reduzida e isso está diretamente relacionada com a própria capacidade dos compostos em atacar células em crescimento ou estáticas. LEWIS (2001) afirma que a grande maioria dos antibióticos é mais eficiente no ataque a células em crescimento, as quais apresentam taxas metabólicas mais elevadas. Contudo, deve-se fazer uma ressalva com relação a uma classe específica de antibióticos, as fluoroquinolonas. Segundo o autor, este grupo de agentes antimicrobianos é capaz de infiltrar os biofilmes, o que leva a crer que outros mecanismos de resistência, além da própria defesa criada pelos biofilmes, estão ativos. LEWIS (2001) acredita que as células sésseis não são necessariamente mais resistentes ao ataque destes compostos do que células planctônicas. Ocorre que o próprio ataque de antibióticos capazes de atravessar a barreira do biofilme cria uma população de células “persistentes”, as quais são preservadas pela presença do antibiótico que inibe sua taxa de crescimento. MAH & O' TOOLE (2001) acreditam que bactérias seriam capazes de produzir fenótipos de resistência com um tipo específico de biofilme. Em outras palavras, para cada antibiótico ou outro agente antimicrobiano que ataca as células um tipo diferente de biofilme (química e estruturalmente diferentes) pode ser produzido.

A capacidade de proteção conferida pelos biofilmes é de grande preocupação a clínica médica e veterinária. De acordo com OLSON et al. (2002) a prevalência de mastite estafilocócica bovina vai de 7 a 40% de todo o gado leiteiro e esta infecção está diretamente associada a biofilmes bacterianos. *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis* produtores de biofilmes são os patógenos mais isolados em infecções animais. MELCHIOR et al. (2006,

2007) observaram que as cepas de *Staphylococcus* spp. foram poucos susceptíveis aos antimicrobianos mais utilizados no tratamento da mastite bovina. Em outro trabalho, MELCHIOR et al. (2009) descobriram que a divisão de cepas de *S. aureus* causadoras de mastite bovina em penicilina resistentes ou sensíveis não depende apenas da presença ou ausência do gene *blaZ*, mas sim de um íntimo relacionamento com a habilidade de formar biofilmes. Essa informação é vital, pois alerta que a estratégia de utilizar apenas antibióticos para combater infecções bacterianas pode não ser a mais adequada e eficiente e talvez precise ser repensada. Visto isso, PÉREZ et al. (2009) conseguiram proteger ovelhas contra mastite estafilocócica utilizando anticorpos contra a poli-N-acetil β -1,6 glicosamina (PNAG), um dos componentes majoritários dos biofilmes produzidos por *Staphylococcus* spp.

As metodologias de detecção de biofilme são geralmente baseadas em características fenotípicas ou genotípicas. É muito comum utilizar a PCR na detecção dos genes do locus *icaADBC*, preferencialmente *icaA* e *icaD*, devido ao seu papel majoritário na síntese do biofilme. Em alguns casos também é utilizada a hibridização com fluorescência *in situ* (FISH). As metodologias fenotípicas, apesar de sofrerem forte influência das condições *in vitro* (BASELGA et al., 1993) também são bastante utilizadas. Em especial destaca-se o Ágar Vermelho Congo. Na Tabela 1 é possível observar um sumário de algumas das técnicas mais utilizadas na determinação de cepas produtoras de biofilme e suas vantagens e desvantagens.

9. CONCLUSÃO

A mastite se configura como a doença mais preocupante, afetando em sua forma subclínica, em torno de 5-30 % de todos os rebanhos de pequenos ruminantes. A habilidade de resistir ativamente aos compostos antimicrobianos em conjunto com a capacidade de formar biofilmes são características extremamente importantes em bactérias. Estas características em conjunto permitem que estes microrganismos causem infecções de caráter

crônico em rebanhos leiteiros acarretando em grandes perdas econômicas. Embora a mastite configure como uma doença importante, as pesquisas envolvendo os mecanismos de infecções intramamárias em caprinos e ovinos no Brasil ainda são escassas, necessitando de mais estudos para determinar com exatidão a etiologia da doença nos âmbitos regionais e nacional, auxiliando a criação de estratégias preventivas e terapêuticas adequadas às realidades encontradas no país.

10. REFERÊNCIAS

11. AIRES-DE-SOUSA, M. et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from buffalo, bovine, ovine, and caprine milk samples collected in Rio de Janeiro State, Brazil. [Applied and Environmental Microbiology](#), v.73, n.12, p.3845-3849, 2007.
- ALBERTON, L. R. et al. Vacinação com bacterina de *Staphylococcus aureus* no controle da mastite em vacas em lactação. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia**, v.4, n.1, p.31-40, 2001.
- ALBUQUERQUE, I. A. **Produção e composição físico-química do leite de cabras puras e mestiças da raça Saanen no estado do Ceará**. 2009. 83f. Dissertação de Mestrado em Zootecnia, Universidade Federal do Ceará.
- ALMER, L. S. et al., Antimicrobial susceptibility and molecular characterization of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.43, p.225-232, 2002.
- AMORENA, B. et al. Use of liposome-immuno potentiated exopolysaccharide as a component of an ovine mastitis staphylococcal vaccine. **Vaccine**, v.12, p.243-249, 1994.
- APARNA, M. S.; SARITA, Y. Biofilms: Microbes and Disease. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.12, n.6, p.526-530, 2008.
- ARCIOLA, C. R. et al. 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.
- BALL, P. R. et al. Accumulation of tetracyclines by *Escherichia coli* K-12. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.77, p.1500-1507, 1977.
- BAREILLE, N. et al. Effects of health disorders on feed intake and milk production in dairy cows. **Livestock Production Science**, v.83, p.53-62, 2003.

- BASELGA, R. et al. Phase Variation of Slime Production in *Staphylococcus aureus*: implications in colonization and virulence. **Infection and Immunity**, v.61, p.4857-4862, 1993.
- BERGER-BACHI, B.; McCALLUM, N. State of the knowledge of bacterial resistance. **International Journal of the Care of the Injured**, v.37, p.20-25, 2006.
- BERGONIER, D. et al. Mastitis of dairy small ruminants. **Veterinary Research**, v.34, 689-716, 2003.
- BERGONIER, D.; BERTHELOT, X. New advances in epizootiology and control of ewe mastitis. **Livestock Production Science**, v.79, p.1-16, 2003.
- BJORLAND, J. et al. Widespread distribution of disinfectant resistance genes among Staphylococci of bovine and caprine origin in Norway. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.9, p.4363-4368, 2005.
- BOLSANELLO, R. X. et al. Etiologia da mastite em ovelhas Bergamácia submetidas à ordenha mecânica, criadas em propriedade de Botucatu, SP. **Veterinária e Zootecnia**, v.16, n.1, p.221-227, 2009.
- CALZOLARI, A. et al. Field trials of a vaccine against bovine mastitis. 2. Evaluation in two commercial herds. **Journal of Dairy Science**, v.80, p.854-858, 1997.
- CHAFFER, M. et al. Efficacy of dry-off treatment in sheep. **Small Ruminant Research**, v.47, p.11-16, 2003.
- CLUTTERBUCK, A. L. et al. Biofilms and their relevance to veterinary medicine. **Veterinary Microbiology**, v.121, p.1-17, 2007.
- COELHO, A. J. C. et al. Eficácia de três métodos empregados no controle da mastite estafilocócica em cabras leiteiras criadas no município de Santa Maria da Boa Vista, PE. In: V CONGRESSO NORDESTINO DE PRODUÇÃO ANIMAL; XI SIMPÓSIO NORDESTINO DE ALIMENTAÇÃO DE RUMINANTES; I SIMPÓSIO DE PRODUÇÃO ANIMAL, 2008,

- Aracajú. **Anais...** Aracaju: Sociedade Nordestina de Produção Animal, Embrapa Tabuleiros Costeiros, CD-ROM, 2008.
- CONTRERAS, A. et al. Mastitis in small ruminants. **Small Ruminant Research**, v.68, p.145-163, 2007.
- CONTRERAS, A. et al. The role of intramammary pathogens in dairy goats. **Livestock Production Science**, v.79, 273–283, 2003.
- CONTRERAS, A. et al. Persistence of subclinical intramammary pathogens in goats throughout lactation. **Journal Dairy Science**, v.80, n.2815–2819, 1997.
- COSTERTON, J. W. et al. Microbial biofilms. **Annual Reviews of Microbiology**, v.49, p.711-745, 1995.
- COSTERTON, J. W. et al. How bacteria stick . **Scientific American**, v.238, p.86-95, 1978.
- COUTINHO, D. A. et al. Etiologia e sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de bactérias isoladas de ovelhas da raça Santa Inês com mastite subclínica. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.7, n.2, p.139-151, 2006.
- CREAGER, A. N. H. Adaptation or selection? Old issues and new stakes in the postwar debates over bacterial drug resistance. **Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences**, v.38, p. 159-190, 2007.
- CUCARELLA, C. 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.
- DEINHOFER, M.; PERNTHANER, A. *Staphylococcus* spp. as mastitis-related pathogens in goat milk. **Veterinary Microbiology**, v.43, p.161–166, 1995.
- DEVRIESE, L. A., HOMMEZ, J. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dairy herds. **Research in Veterinary Science**, v.19, p.23-27, 1975.
- DIAS, R. V. C. Principais métodos de diagnóstico e controle da mastite bovina. **Acta Veterinaria Brasília**, v.1, n.1, p.23-27, 2007.

- DINGWELL, R. T. et al. Association of cow and quarter-level factors at drying-off with new intramammary infections during the dry period. **Preventive Veterinary Medicine**, v.63, p.75-89, 2004.
- DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v.15, n.2, p.167–193, 2002.
- ERSKINE, R. J. et al. Advances in the therapy of mastitis. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.9, n.3, p.499-517, 1993.
- FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C. A. F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. **Ciência Rural**, v.34, n.4, p.1315-1320, 2004.
- FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. **Qualidade do leite e controle da mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. 176p.
- FOX, L. K., et al. Selective intramammary antibiotic therapy during the nonlactating period in goats. **Small Ruminant Research**, v.9, p.313-318, 1992.
- GENEVAUX, P. et al. A rapid screening procedure to identify Mini-Tn10 insertion mutants of *Escherichia coli* K-12 with altered adhesion properties. **FEMS Microbiology Letters**, v.142, p.27-30, 1996.
- GONI, P. et al. Antibiotic resistance and epidemiological typing of *Staphylococcus aureus* strains from ovine and rabbit mastitis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.23, p.268–272, 2004.
- GONZALO, C., et al. Effects of selective and complete dry therapy on prevalence of intramammary infection and on milk yield in the subsequent lactation in dairy ewes. **Journal of Dairy Research**, v.71, p.33-38, 2004.
- HACKBARTH, C. J.; CHAMBERS, H. H. Methicillin-resistant staphylococci: genetics and mechanisms of resistance. **Antimicrobial Agents chemotherapy**, v.33, p. 991-994, 1989.

HAUSCHILD, T. et al. Characterization of a novel type of MLS_B resistance plasmid from *Staphylococcus saprophyticus* carrying a constitutively expressed *erm(C)* gene. **Veterinary Microbiology**, v.115, p.258-263, 2006.

HEILMANN, C. et al. Characterization of Tn917 insertion mutants of *Staphylococcus epidermidis* affected in biofilm formation. **Infection and Immunity**, v.64, n.1, p.277-282, 1996.

IBGE. Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br>. Acesso em 15/10/2009, On line.

JAIN, A. & AGARWAL, A. Biofilm production, a marker of pathogenic potential of colonizing and commensal staphylococci. **Journal of Microbiological Methods**, v.76, p.88-92, 2009.

JEFFERSON, K. K. What drives bacteria to produce a biofilm? **FEMS Microbiology Letters**, v.236, p.163–173, 2004.

JENSEN, L. B. Presence of *erm* gene classes in Gram-positive bacteria of animal and human origin in Denmark. **FEMS Microbiology Letters**, 170: 151-158, 1999.

KOLÁR, M. et al. Antibiotic selective pressure and development of bacterial resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.17, p.357-363, 2001.

KUMAR, A.; SCHWEIZER, H. P. Bacterial resistance to antibiotics: Active efflux and reduced uptake. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.57, p.1486-1513, 2005.

LAMBERT, P. A. Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.57, p.1471-1485, 2005.

LANGONI, H. et al. Mastite caprina: seus agentes e sensibilidade frente a antimicrobianos. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.13, n.1, p.51-54, 2006.

LANGONI, H. et al. Tratamento da mastite bovina com amoxicilina e enrofloxacinina bem como com a sua associação. **Arquivo do Instituto Biológico**, v.67, n.2, p.177-180, 2000.

- LASA, I. et al. Bacterial biofilms and infection. **Anales Del Sistema Sanitario de Navarra**, v.28, n.2, p.163-175, 2005.
- LEE, J. H. Occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from cattle and chicken, and analyses of their *mecA*, *mecR1* and *mecI* genes. **Veterinary Microbiology**, v.114, p.155-159, 2006.
- LEITNER, G. et al. Development of a *Staphylococcus aureus* vaccine against mastitis in dairy cows I. Challenge trials. **Veterinary immunology and immune pathology**, v.93. P.31-38, 2003.
- LEITNER, G. et al. Outbreak of subclinical mastitis in a flock of dairy goats associated with atypical *Staphylococcus haemolyticus*. **Journal of Dairy Research**, v.76, p.1-5, 2009.
- LEONARD, F. C.; MARKEY, B. K. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals: A review. **The Veterinary Journal**, v.175, p.27-36, 2008.
- LEVY, S. B. Active efflux mechanisms for antimicrobial resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.36, n.4, p.695-703, 1992.
- LEWIS, K. Riddle of biofilm resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.45, n.4, p.999–1007, 2001.
- LI, X. et al. β -Lactam resistance and β -lactamases in bacteria of animal origin. **Veterinary Microbiology**, v.121, n.197, p.214, 2007.
- LOCH, I. M. et al. Macrolide and lincosamide resistance genes of environmental streptococci from bovine milk. **Veterinary Microbiology**, v.111, p.133-138, 2005.
- MA, Y. P. et al. Characterization of bacterial susceptibility isolates in sixteen dairy farms in Taiwan. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p.4573–4582, 2006.
- MACK, D. Molecular mechanisms of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation. **Journal of Hospital Infection**, v.43, p.13-15, 1999.

- MACK, D. et al. Characterization of transposon mutants of biofilm-producing *Staphylococcus epidermidis* impaired in the accumulative phase of biofilm Production: Genetic identification of a hexosamine-containing polysaccharide intercellular adhesin. **Infection and Immunity**, v.62, n.8, p.3244-3253, 1994.
- MAH, T. C.; O'TOOLE, G. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends in Microbiology**, v.9, n.1, p.34-39, 2001.
- MALIK, S. et al. Presence and diversity of the β -lactamase gene in cat and dog staphylococci. **Veterinary Microbiology**, v.123, p.162-168, 2007.
- MARTEL, J. L.; COUDERT, M. Bacterial resistance monitoring in animals: the French national experiences of surveillance schemes. **Veterinary Microbiology**, v.35, p.321-338, 1993.
- MAVROGIANNI, V. S. et al. Field evaluation of flunixin meglumine in the supportive treatment of caprine mastitis. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v27, p.373-375, 2004.
- McDOUGALL, S. et al. Relationships among somatic cell count, California mastitis test, impedance and bacteriological status of milk in goats and sheep in early lactation. **Small Ruminant Research**, v.40, p.245-254, 2001.
- McMURRY, L. et al. Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.77, p.3974-3977, 1980.
- MELCHIOR, M. B. et al. Biofilm formation and genotyping of *Staphylococcus aureus* bovine mastitis isolates: evidence for lack of penicillin-resistance in Agr-type II strains. **Veterinary Microbiology**, v.137, p.83-89, 2009.

- MELCHIOR, M. B. et al. Extended antimicrobial susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis growing in biofilms. **Veterinary Microbiology**, v.125, p.141–149, 2007.
- MELCHIOR, M. B. et al. Biofilms: A role in recurrent mastitis infections? **The Veterinary Journal**, v.171, p.398–407, 2006.
- MERINO, N. et al. Protein A-mediated multicellular behavior in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v.191, n.3, p.832-843, 2009.
- MONROE, S.; POLK, R. Antimicrobial use and bacterial resistance. **Current Opinion in Microbiology**, v.3, p.496-501, 2000.
- MOREIRA, J. N. et al. **Estudo do circuito de comercialização de carnes de caprinos e ovinos no eixo Petrolina-PE/Juazeiro-BA**. Petrolina: EMBRAPA-CPATSA, 1998. 37p. (Documentos, 87).
- MOTA, R. A. Aspectos epidemiológicos, diagnóstico e controle das mastites em caprinos e ovinos. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v.2, n.3, p.57-61, 2008.
- NAWAZ, M. S. et al. Comparative molecular analysis of erythromycin-resistance determinants in staphylococcal isolates of poultry and human origin. **Molecular and Cellular Probes**, v.14, p.311-319, 2000.
- NOGUEIRA, D. M. et al. **Passos para obtenção do leite de cabra com qualidade**. Embrapa Semi-Árido, Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2008, 6p. (Comunicado Técnico, 135).
- O' GARA, J. P. *ica* and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. **FEMS Microbiology Letters**, v.270, p.179-188, 2007.
- OLIVEIRA, M. et al. Time course of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. **Veterinary Microbiology**, v.124, p.187-191, 2007.

- OLIVEIRA, M. et al. Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. **Veterinary Microbiology**, v.118, p.133-140, 2006.
- OLSEN, J. E. et al. Diversity and evolution of *blaZ* from *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.57, p.450-460, 2006.
- OLSON, M. E. et al. Biofilm Bacteria: Formation and Comparative Susceptibility to Antibiotics. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v.66, p.86-92, 2002.
- O' TOOLE, G. et al. Biofilm formation as microbial development. **Annual Reviews os Microbiology**, v.54, p.49-79, 2000.
- O' TOOLE, G.; KOLTER, R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways: A genetic analysis. **Molecular Microbiology**, v.28, n.3, p.449-461, 1998.
- PAAPE, M. J. et al. Milk somatic cells and lactation in small ruminants. **Journal of Dairy Science**, v.84, p.237-244, 2001.
- PARSEK, M. R.; SINGH, P. K. Bacterial biofilms: An emerging link to disease pathogenesis. **Annual Reviews of Microbiology**, v.57, p.677-701, 2003.
- PÉREZ, M. M. et al. Protection from *Staphylococcus aureus* mastitis associated with poly-N-acetyl β -1,6 glucosamine specific antibody production using biofilm-embedded bacteria. **Vaccine**, v.27, p.2379-2386, 2009.
- PORTES, V. M. et al. Efeito da vacinação contra mastite estafilocócica sobre a associação de *Staphylococcus* spp. a células do leite. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.34, n.2, p.137-141, 2006.
- PYÖRÄLÄ, S.; TAPONEN, S. Coagulase-negative staphylococci – Emerging mastitis pathogens. **Veterinary Microbiology**, v.134, p.3-8, 2009.

RADOSTITS, O. M. et al. **Clínica veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos**. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, p.541-629.

RAINARD, P. et al. 2003. Leucotoxic activities of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows, ewes, and goats with mastitis: importance of LukM/LukF'-PV leukotoxin. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.10, p.272-277, 2003.

RUPP, R. et al. Relationship between milk somatic-cell counts in the first lactation and clinical mastitis occurrence in the second lactation of French Holstein cows. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 46, p. 99-111. 2000.

SÁNCHEZ, A. et al. Influence of sampling time on bacteriological diagnosis of goat intramammary infection. **Veterinary Microbiology**, v.98, p.329-332, 2004.

SANTIAGO, L. B. et al. **Etiologia, fatores de risco e aspectos clínicos da mastite ovina**. Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos, 2009. 86p. (Documentos, 87).

SANTOS, J. E. P. et al. Effect of timing of first clinical mastitis occurrence on lactational and reproductive performance of Holstein dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 80, p. 31-45. 2004.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. **Importância do tratamento no controle da mastite bovina**. In: Coleção Gado de Leite. Campinas: Quiron, p.20, 2005.

SAWANT, A. A. et al. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative *Staphylococcus* species isolated from bovine milk. **Veterinary Microbiology**, v.134, p.73-81, 2009.

SEARS, P. M.; BELSCHNER, A. P. **Eliminating *Staphylococcus aureus* intramammary infections using immune enhancement and antibiotic therapy**. In: 31st. Annual Conference of the AABP (Washington, EUA). p.275-276, 1998.

SOARES, L. C. et al. Caracterização fenotípica da resistência a antimicrobianos e detecção do gene *mecA* em *Staphylococcus* spp. coagulase- negativos isolados de amostras animais e humanas. **Ciência Rural**, v.38, p.1346-1350, 2008.

TAPONEN, S.; PYÖRÄLÄ, S. Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis – Not so different from *Staphylococcus aureus*? **Veterinary Microbiology**, v.134, p.29-36, 2009.

TENOVER, F. C.; MCGOWAN JR., J. E. Antimicrobial resistance. **International Encyclopedia of Public Health**, p.211-219, 2008.

TENOVER, F. C. et al., Characterization of a strain of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* widely disseminated in the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, n.1, p.108-118, 2006.

TOLLERSRUD, T. et al. Antibody responses in sheep vaccinated against *Staphylococcus aureus* mastitis: a comparison of two experimental vaccines containing different adjuvants. **Veterinary Research Communications**, v.26, p.587-600, 2002.

UDO, E. E. et al. Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococci in restaurant workers from Kuwait City may be a potential cause of food poisoning. **Journal Medical Microbiology**, v.48, p.819–823, 1999.

UMBER, J. K.; BENDER, J. B. Pets and antimicrobial resistance. **The Veterinary Clinics of North America. Small animal practice**, v.39, p.279-292, 2009.

VAN DUIJKEREN, E. et al. Methicillin-resistant staphylococci isolated from animals. **Veterinary Microbiology**, v.103, p.91-97, 2004.

WANG, Y. et al. Macrolide-lincosamide-resistant phenotypes and genotypes of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis. **Veterinary Microbiology**, v.130, p.118-125, 2008.

WEBBER, M. A.; PIDDOCK, L. J. V. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.51, p.9-11, 2003.

WEESE, J. S.; VAN DUIJKEREN, E. Methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. **Veterinary Microbiology**, v.140, p.418-429, 2010.

WRIGHT, G. D. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.57, p.1451-1470, 2005.

Tabela I. Metodologias de detecção de biofilmes com suas vantagens e desvantagens.

	Vantagens	Desvantagens	Referência
Genotípicas			
PCR	Rápida (algumas horas) Alta especificidade e sensibilidade	Custo elevado Mão-de-obra especializada	Arciola et al., 2001
	Processamento de número elevado de amostras	Apenas qualitativo	
FISH	Rápida (algumas horas) Alta especificidade e sensibilidade	Custo elevado	Oliveira et al., 2007
	Processamento de número elevado de amostras	Mão-de-obra especializada	
	Qualitativo e quantitativo		
Fenotípicas			
Vermelho Congo	Baixo custo	Subjetividade da interpretação do resultado	Oliveira et al., 2006
	Fácil execução	Sujeita às variações das condições <i>in vitro</i>	
	Necessita de infraestrutura simples	Requer tempo de incubação (até 3 dias) Sujeita a contaminação	
Coloração com cristal violeta	Processamento simultâneo de amostras (microplacas de 96 poços)	Período de incubação (pelo menos 24h)	Heilmann et al., 1996
	Quantitativo	Sujeita a contaminação	
Ensaio de agregação celular (Densidade Óptica)	Qualitativo	Processamento lento (uma amostra por vez) Sujeita a contaminação	Merino et al., 2009
Coloração com safranina	Processamento simultâneo de amostras (microplacas de 96 poços)	Requer período de incubação	Melchior et al., 2009
	Quantitativo	Sujeita a contaminação	

**ANTIMICROBIAL RESISTANCE OF *Staphylococcus* spp. FROM SMALL
RUMINANT MASTITIS
(A ser submetido à Revista Veterinary Microbiology)**

ANTIMICROBIAL RESISTANCE OF *Staphylococcus* spp. FROM SMALL RUMINANT MASTITIS

C. A. de França^a, J. L. A. Veschi^b, R. A. Mota^c, M. M. da Costa^{a*}

^a Colegiado de Zootecnia, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Brasil

^b Pesquisador (a) Embrapa Semiárido, Brasil

*Corresponding author. Rodovia BR 407, Km 12 Lote 543 – Projeto de Irrigação Nilo Coelho – S/N C1, Petrolina, PE 56300-000, Brazil. e-mail: chirleskb@yahoo.com.br

Abstract

Mastitis is the most important infectious disease affecting dairy herds. The major etiologic agent of mastitis is *Staphylococcus* spp. and special concern is associated to the antimicrobial resistance of isolates. The present study aimed to determine the antimicrobial resistance patterns and to identify molecular resistance markers in *Staphylococcus* spp. isolated from small ruminant mastitis in Pernambuco and Bahia States. The biofilm production potential of isolates was determined by Congo Red Agar test and detection of *icaD* gene. The antimicrobial resistance patterns were evaluated by disk diffusion test and detection of *mecA*, *blaZ*, *ermA*, *ermB*, *ermC* and *msrA* genes was performed by PCR. Efflux pump screening test was performed by growing in Muller Hinton agar containing ethidium bromide. The results indicated that 7.6% of the isolates were considered biofilm producers by Congo Red Agar test and 31.9% of them carried *icaD*. The isolates were most resistant to nalidixic acid (81.9%), amoxicillin (50.0%), streptomycin (42.8%), tetracycline (40.4%), lincomycin (39.0%) and erythromycin (33.8%). Resistance to oxacillin was seen in 12.8% of the isolates. All tested isolates were negative to *mecA* gene by PCR. Regarding other antimicrobial resistance determinants, 45.7% of the isolates presented *blaZ*, 1.4% *ermA*, 10.4% *ermB*, 16.2% *ermC* and 0.9% *msrA*. Pan-susceptibility to all tested drugs was observed in 71 isolates and 41 *Staphylococcus* isolates were positive for efflux pump. The *icaD* gene PCR was more sensitive to potential biofilm detection than Congo Red Agar test.

Key-Words: goat, sheep, infectious, milk, *mecA*, *blaZ*, efflux pump.

Introduction

The northeast region of Brazil congregated the majority of goat and sheep herds (IBGE, 2009). Mastitis is a serious concern to both meat and milk producers due to economic losses caused by reduction in milk yield and decrease milk quality, as well as treatment costs (Sawant et al., 2009).

Staphylococci are considered the most important mastitis causing agents in ruminants (Aires-de-Sousa et al., 2007; Taponen and Pyörälä, 2009) and antimicrobial treatment is usually required (Bergonier et al., 2003; Contreras et al., 2007; Pyörälä and Taponen, 2009). However, there is growing evidence that resistance to antibiotics is increasing in staphylococci isolated from food animals (Phillips et al., 2004). The emergence of multidrug resistance (MDR) in *Staphylococcus* spp. is a concerning problem to animal production and public health issues (Kumar et al., 2009; Sawant et al., 2009; Viridis et al., 2010).

Two genetic mechanisms are associated to the resistance against beta-lactam antimicrobials in *Staphylococcus* spp. (Olsen et al., 2006). The beta-lactamase production is the most important mechanism and can be mediated by the *blaZ* gene (Olsen et al., 2006; Taponen and Pyörälä, 2009). Methicillin (and beta-lactams) resistance is primarily associated to *mecA* gene encoding for PBP2a, a cell wall synthetic protein with low affinity to beta-lactams (Lowy, 2003; Katayama et al., 2005). There is evidence that *S. aureus* has acquired the staphylococcal chromosomal cassette *mec* (*SSCmec*) from CNS (Leonard and Markey, 2008). Efflux mediated antimicrobial resistance are based on an cell energy dependent process and associated to resistance against several drugs, as macrolides and lincosamides (Butaye et al., 2003; Bjorland et al., 2005, Hassan et al., 2007). On the other hand, there is a lack of knowledge about the mechanisms of antimicrobial resistance in *Staphylococcus* spp. isolated from mastitis cases in small ruminants raised in northeastern Brazil. Therefore, this study aimed to determine the antimicrobial resistance patterns and identify putative antimicrobial resistance mechanisms of *Staphylococcus* spp. isolated from mastitis in goat and sheep in Bahia and Pernambuco States, Brazil.

2. Material and Methods

2.1. *Staphylococcus* spp. isolates

Two hundred ten (210) *Staphylococcus* spp. isolates from goat (n=171) and sheep (n=39) were evaluated. All bacteria were isolated from subclinical mastitis cases in Pernambuco (n=89) and Bahia (n=121) States distributed in twenty five farms, being 17 goat, six sheep and two mixed herds, in Pernambuco (n=64) and Bahia (n=101) States. The goats

are used to dairy production and carries animal with different ages, lactation stages and breeding management. All farms employed handling milking. Sheep are bred to meat production and were newly calving females with several ages, breed and breeding management. The isolates were identified according to Quinn et al. (1994).

2.2. Antimicrobial susceptibility test

The resistance pattern of *Staphylococcus* spp. isolates was determined by disk diffusion test (CLSI, 2006). The tested drugs and their concentrations were: gentamycin (5µg), streptomycin (10µg), enrofloxacin (5µg), norfloxacin (10µg), ciprofloxacin (30µg), nalidixic acid (30µg), amoxicillin (30µg), oxacillin (1µg), doxycycline (30µg), tetracycline (30µg), erythromycin (10µg), lincomycin (2µg) and rifampicin (30µg). A rate for MDR was calculated by division of number of resistant antimicrobial groups by the total tested antimicrobial groups (Krumperman, 1983).

2.3. Biofilm production

The biofilm production was performed according to Greco et al. (2008). Shortly, the presence of biofilm was tested in Congo Red Agar. After incubation at 37°C for 24h, black colonies were considered as biofilm producers.

2.4. Monoplex PCR for *icaD*, *mecA*, *blaZ*, *ermA*, B, C and *msrA* genes

The detection of resistant genes (*icaD*, *mecA*, *blaZ*, *ermA*, B, C and *msrA*) was performed by PCR using primers and cycle conditions described by Greco et al. (2008), Murakami et al. (1991) and Sawant et al. (2009) (Table 1). Shortly, bacterial genomic DNA was obtained by thermal extraction (Greco et al., 2008). DNA template (2µl) was added to a 23 µl master mix containing 4pmol of each primer, 0.4 mM of dNTPs mix, 1U of *Taq* DNA polymerase (Ludwig- Biotec), buffer (10mM Tris-HCl [pH 8.5] and 50mM KCl) and 2 mM MgCl₂. DNA template from a methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) was used as positive control. The amplicons with 249 pb (*icaD*), 214 bp (*mecA*), 517 bp (*blaZ*), 486 bp (*ermA*), 423 bp (*ermB*), 272 bp (*ermC*) and 1000 bp (*msrA*) were verified in 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide (0.5µg/mL) and observed under UV illumination.

2.6. Efflux pump detection

Efflux pump screening in *Staphylococcus* spp. was carried out as previously described (Bjorland et al., 2005) using ethidium bromide. Isolates were grown in Mueller Hinton Agar (MH) containing ethidium bromide (0.5 mg/ml) for 24 hours at 37°C and considered positive for efflux mediated resistance when no fluorescence under UV examination was observed.

3. Results

Out of the 210 confirmed *Staphylococcus* spp., 37 (17.6%) isolated were identified as *S. epidermidis*, 35 (16.7%) as *S. hycus*, 35 (16.7%) as *S. intermedius*, 34 (16.2%) as *S. aureus*, 23 (11.0%) as *S. caprae*, 5 (2.4%) as *S. gallinarum*, three (1.4%) as *S. simulans*, and one (0.5%) as *S. saprophyticus*. Thirty seven isolates (17.6%) were identified only as *Staphylococcus* spp. When analyzed the distribution of *Staphylococcus* spp. isolates among the host species, 30 (14.3%) and 7 (3.3%) isolates were identified as *S. epidermidis* from goat and sheep respectively. To *S. aureus* 26 (12.4) and 8 (3.8) were isolated to goat and sheep, to *S. caprae* 22 (10.5) and one (0.5), to *S. hycus* 28 (13.3%) were isolated from goat and 7 (3.3%) from sheep, to *S. intermedius* 26 (12.4%) from goat and 9 (4.3%) from sheep respectively. Only in sheep were identified 3 (1.4%) *S. simulans* and one (0.5%) *S. saprophyticus* and only in goats 5 (2.4%) *S. gallinarum* were identified. The identification only in genus level were performed in 31 (14.8%) isolates from goat and 6 (2.9%) from sheep.

The antimicrobial resistance profiles of the *Staphylococcus* spp. isolates can be observed in Figure 1. The isolates were most resistant to nalidixic acid (59.1% and 56.4%), amoxicillin (57.3% and 18.0%), streptomycin (46.8% and 10.3%), tetracycline (45.6% and 10.3%), lincomycin (45.6% and 7.7%) erythromycin (35.1% and 23.1%), rifampicin (25.7% and 23.1%), oxacillin (15.8% and 12.8%), norfloxacin (10.5% and 5.1%), doxycycline (10.5% and 7.7%), ciprofloxacin (5.9% and 10.3%), enrofloxacin (2.9% and 0.00%) and gentamycin (4.7% and 7.7%) from goat and sheep *Staphylococcus* spp. isolates respectively. The MDR rate ranged from 0 and 1 (Table 2). Ten (4.8%) in goat and five (2.4%) in sheep *Staphylococcus* spp. isolates were sensible to all tested antimicrobial drugs. Multi resistant isolates were higher in goat (81) than sheep 7 isolates. Seven goat (3.3%) and one sheep (0.5%) *Staphylococcus* spp. isolates were resistant to all tested drugs.

All tested isolates were negative for *mecA*, although *blaZ* gene was detected in 78 (37.1%) and 18 (8.6%) of *Staphylococcus* spp. isolates from goat and sheep respectively. Besides, *ermB* markers were observed in 21 (10%) and one (0.5%) isolates from goat and sheep respectively. The genes *ermA* and *ermC* in three (1.4%) and 34 (16.2%) isolates only in

goats. Seventy tree isolates were negative to all antimicrobial resistance genes tested (goat=54; sheep=19).

Regarding the screening test for efflux pump production, 34 goat isolates (16.2%) and seven sheep isolates (3.3%) were considered positive however *msrA* gene was detected in two isolates (1%) from goat. These isolates were also positive to *erm* genes. The association among *blaZ*, *ermA*, *ermB*, *ermC* and efflux pump were observed in 17 (goat=14; sheep=3) *Staphylococcus* spp. The biofilm encoding gene *icaD* was detected in 55 (26.2%) and 13 (6.2%) isolates from goat and sheep respectively, whereas 15 goat (7.1%) and one sheep (0.5%) isolates were considered biofilm producers phenotypically by Congo red agar test.

4. Discussion

A previous study performed in Brazil (Aires-de-Sousa et al., 2007) on 34 *S. aureus* from goat and sheep mastitis indicated high sensitivity of the isolates to antimicrobial drugs. In this study, pansusceptibility was observed only in fifteen *Staphylococcus* spp. isolates, in accordance to a previous study on *S. aureus* isolated from mastitis in dairy cows (Kumar et al., 2009). One hundred fifty seven (75%) isolates were resistant to two or more antimicrobial drugs simultaneously (goat 138; sheep 19). This rate is higher when compared the MDR rate of 8% in *S. aureus* from goat mastitis (Viridis et al., 2010) when perceptual of resistance to antimicrobial drugs (Figure1) was evaluated, our isolates presented values lower than 10% in three antimicrobial drugs from thirteen tested. Viridis et al. (2010) observed sensitivity of seven from ten tested drugs. These results may be explained by empiric usage of antimicrobial drugs without technical assistance.

Many mechanisms are associated to *Staphylococcus* spp. antimicrobial resistance (Lowy, 2003). The resistance of *Staphylococcus* spp. to beta-lactam group is well determined and associated to penicillin ring inactivation and production of PBP2a (Lowy, 2003). The frequency of resistance to B-lactams varied considerably and ranged from 10.9 (doxycycline) to 50% (amoxicillin). These results are higher than those described by Aires-de-Sousa et al. (2007) for 34 *S. aureus* isolates from goat and sheep. The results are also in accordance to Kumar et al. (2009) and Rabello et al. (2005) on *S. aureus* from cattle mastitis. However, CNS from bovine milk showed lower resistance to beta-lactams (Sawant et al., 2009). High resistance level against specific antimicrobials may be associated to frequent and long antimicrobial usage on farm (Pitkälä et al., 2004; Kumar et al., 2009).

Resistance to oxacillin was found in 16.6% *Staphylococcus* isolates but no *mecA* amplification by PCR was observed. These results are in accordance to those described by

Virdis et al. (2010) and Aires-de-Sousa et al. (2007) characterizing *Staphylococcus* spp. from small ruminant mastitis. Methicillin resistance is associated to resistance to all beta-lactams drugs despite the apparent susceptibility obtained in *in vitro* tests (CLSI, 2006; Sawant et al., 2009). Soares et al. (2008) reported a frequency of 5.6% of *mecA* gene in CNS from animal origin but no detection from CNS from humans. Methicillin resistant *Staphylococcus* spp. are unusual in veterinary medicine (Guérin-Faublée et al., 2003). According to Olsen et al. (2006) *blaZ* is the most important mechanism to beta-lactam resistance. In the present study, *blaZ* was seen in 45.7% of all *Staphylococcus* spp. isolates, which supports the finding high resistance level against beta-lactams observed in the disk diffusion test. The frequency of *blaZ* described herein was higher than 18.5% (Sawant et al., 2009) but lower than 100% penicillin resistant *S. aureus* from Denmark (Vesterholm-Nielsen et al., 1999). Transference of beta-lactam resistance genes may occur among human and animal *Staphylococcus* spp. isolates and is a concerning problem to public health (Vesterholm-Nielsen et al., 1999; Katayama et al., 2005; Olsen et al., 2006). Caution may be assumed to raw milk ingestion, what is common from small ruminant species dairy products. However, studies on the MRSA from animal origin are required in order to evaluate the role of those pathogen as foodborne pathogen. Studies have shown that MRSA isolate from foods do not correspond genetically to those linked to human infections (Kwon et al., 2005).

Out of 71 (goat=62; sheep=9) erythromycin resistant isolates, only 41 (goat=34; sheep=7) presented efflux pump in MH agar screening. For *msrA* gene two isolates from goat were positive in PCR. Forty eight *Staphylococcus* spp. isolates from goat (47) and sheep (1) isolates were positive to *erm* genes by PCR. The resistance to macrolides and tetracycline may occur due to several mechanisms besides efflux pump, as modification enzymes and ribosome protection (Gatermann et al., 2007; Butaye et al., 2003; Hassan et al., 2007). The difference in phenotypic and genotypic resistance to erythromycin may be explained by other no indentified macrolide resistance mechanisms that are usual in CNS isolates (Fiebelkorn et al., 2003). Differences in occurrence of resistance mechanisms for erythromycin are related to geographic localization and drug therapeutic usage (Pitkälä et al., 2004; Gatermann et al., 2007). Sawant et al. (2009) found high resistance rates for erythromycin in *S. epidermidis* as well as high frequency of *mrsA* gene in isolates from dairy cattle.

In the present study, 69 (goat=58; sheep=11) isolates presented two or more resistance genes simultaneously. The presence of two or more antimicrobial resistance genes may be associated to multidrug resistant *Staphylococcus* spp. (Sawant et al., 2009). MDR rates and resistance genes frequencies were higher to SCN than to SCP. SCN are considered a source of

resistance genes to *S. aureus* (Taponen and Pyörälä, 2009). The same results were reported by Sawant et al. (2009) and Kumar et al. (2009). These results are relevant considering the genetic relationship of Brazilian *S. aureus* isolates from human and ruminants reported by Aires-de-Sousa et al. (2007).

The drugs with lower resistance rates reported here were gentamycin, enrofloxacin and ciprofloxacin. The same results have been reported by others in studies on mastitis in several ruminant species (Hussain et al., 2007; Kumar et al., 2009). Viridis et al. (2010) reported high sensitivity to quinolones, but not to aminoglycoside in goat *Staphylococcus* spp. isolates. The results obtained in antimicrobial susceptibility tests may be an excellent indicator of therapy success in dairy herds (Aires-de-Sousa et al. 2007; Sawant et al., 2009). Therefore, the results presented can be of great importance for the treatment of mastitis caused by staphylococci in small ruminants raised in northeastern Brazil.

No relationship was observed between phenotypic and molecular tests for biofilm production. The same was described in other studies (Oliveira et al., 2006, Vasuvedan et al., 2003, Arciola et al., 2001, Baselga et al., 1993). Only nine (goat) isolates were positive to both methodologies. The occurrence of biofilm producer isolates is a concerning finding, once the infection chronicity and resistance to antimicrobial drugs are associated to this characteristic. Congo Red Agar is a practical technique, but the correct interpretation of the results is dependent of many factors, as colony color (Antunes et al., 2007; Baselga et al., 1993). PCR is a more sensitive technique than Congo Red Agar (Oliveira et al., 2006). The expression of biofilm may be associated to other genetic loci as *bap*, *agr* and *sar* (Oliveira et al., 2006) and its may explain the lower results in phenotypic test.

5. Conclusions

The isolates were less resistant to gentamycin and quinolones. Among the resistance genes marker *blaZ* gene are more prevalent. As expected, no *mecA* gene was observed in *Staphylococcus* spp. isolates. The not appropriated use of antimicrobial drugs may be associated to multi drug resistance in the isolates, as well as to high prevalence of CNS, that are recognized as a resistance gene source to other *Staphylococcus* spp. Identification of these characteristics in isolates of *Staphylococcus* spp. is crucial to know the mechanisms of bacterial pathogenicity, as well as implement measures to correct treatment and control of mastitis, minimizing risks to public and animal health.

Acknowledgments

The authors are thankful to Foundation for Science and Technology of Pernambuco State (FACEPE) by financial support (Master's scholarship and grants - PPP/FACEPE N°: APQ-O629-5.05/08). The authors are also thankful to Institute for Regional Development of Sisal (IDR Sisal) for support.

References

Aires-de-Sousa, M., Parente, C.E.S.R., Vieira-da-Mota, O., Bonna, I.C.F., Silva, D.A., Lencatre, H. 2007. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from buffalo, bovine, ovine and caprine milk samples collected in Rio de Janeiro, Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**. 73, 3845-3849.

Arciola, C.R., Baldassarri, L., Montanaro, L. 2001. Presence of *icaD* genes and slime production in a collection of Staphylococcal strains from catheter-associated infections. **Journal of Clinical Microbiology**. 39, 2151-2156.

Antunes, A. L. S., Perez, L., R. R., Reiter, K. C., Secchi, C., Freitas, A. L. P. 2007. Detecção da produção de biofilme em *Staphylococcus* spp. por Agar Congo Red. **Revista de Saúde da UCPEL**. 1,27-31.

Baselga, R., Albizu, I., De La Cruz, M., Del Cacho, E., Barberan, M., Amorena, B. 1993. Phase variation of slime production in *Staphylococcus aureus*: Implications in colonization and virulence. **Infection and Immunity**. 61, 4857-4862.

Bergonier, D., De Crémoux R., Rupp R., Lagriffoul G., Berthelot X. 2003. Mastitis of dairy small ruminants. **Veterinary Research**. 34, 689-716.

Bjorland, J., Steinum, T., Kvitle, B., Waage, S., Sunde, M., Heir, E. 2005. Widespread distribution of disinfectant resistance genes among staphylococci of bovine and caprine origin in Norway. **Journal of Clinical Microbiology**. 43, 4363-4368.

Butaye, P., Cloeckert, A., Schwarz, S. 2003. Mobile genes coding for efflux-mediated antimicrobial resistance in gram-positive and gram-negative bacteria. **International Journal of Antimicrobial Agents**. 22, 205-210.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2006. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, sixteenth informational supplement, document M100-S16. Wayne, PA, USA: CLSI.

Contreras, A., Sierra, D., Sánchez A., Corrales J.C., Marco J.C., Paape M.J., Gonzalo C. 2007. Mastitis in small ruminants. **Small Ruminant Research**. 68, 145-153.

Fiebelkorn, K.R., Crawford, S.A., McElmeel, M.L. et al. 2003. Practical disk diffusion method for detection of inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. **Journal Clinical Microbiology**. 41, 4740-4744.

Gatermann, S.G., Koschinski, T., Friedrich, S. 2007. Distribution and expression of macrolide resistance genes in coagulase-negative staphylococci. **Clinical Microbiology Infection**. 13, 777-781.

Greco, C., Mastronardi, C., Pagotto, F., Mack, D., Ramirez-Arcos, S. 2008. Assessment of biofilm-forming ability of coagulase-negative staphylococci isolated from contaminated platelet preparations in Canada. **Transfusion Complications**. 48, 969-977.

Guérin-Faubleé, V., Carret, G., Houffstchmitt, P. 2003. *In vitro* activity of 10 antimicrobial agents against bacteria isolated from cows with clinical mastitis. **Veterinary Record**. 152, 466-471.

Hassan, K.A., Skurray, R.A., Brown, M.H. 2007. Active export proteins mediating drug resistance in Staphylococci. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**. 12, 180-196.

Hussain, A., Shakoor, A., Shahid, M.A., Numam, M., Gulraiz, F. 2007. Clinical and subclinical *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy buffaloes: Disease characteristics and antibiotic susceptibility profiles of isolates. **International Journal of Agricultural Research**. 2, 804-811.

IBGE. Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA. Disponível na Internet: <http://www.sidra.ibge.gov.br>, capturado em 15/05/2009, On line.

Katayama, Y., Robinson, D.A., Enright, M.C., Chambers, H. 2005. Genetic background affects stability of *mecA* in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**. 43, 2380-2383.

Kwon, N.H., Park, K.T., Moon, J.S., Jung, W.K., Kim, S.H., Kim, J.M., Hong S.K., Koo, H. C., Joo, Y.S., Park, Y.H. 2005. Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) characterization and molecular analysis for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and novel SCC*mec* subtype IVg isolated from bovine milk in Korea. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. 56, 624-632.

Kumar, R., Yadav, B.R., Singh, R.S. 2009. Genetic determinants of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from milk of mastitic crossbred cattle. **Current Microbiology**. 60, 379-386.

Krumperman, P.H. 1983. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. **Applied Environmental Microbiology**. 46, 165-170.

Leonard, F.C., Markey, B.K. 2008. Meticilin-resistance *Staphylococcus aureus* in animals – a review. **Veterinary Journal**. 175, 27-36.

Lowy, F.D. 2003. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Investigation**. 111, 1265-1273.

Murakami, K.W., Minamide, W., Wada, K., Nakamura. E., Teraoka, H., Watanabe, S. 1991. Identification of methicillin resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**. 29, 2240-2244.

Oliveira, M., Bexiga, Nunes, S. F., Carneiro, C., Cavaco, L. M., Bernardo, F., Vilela, C. L. 2006. Biofilm-forming ability profiling os *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. **Veterinary Microbiology**. 118, 133-140.

Olsen, J.E., Christensen, H., Aarestrup, F.M. 2006. Diversity and evolution of *blaZ* from *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. 57, 450-460.

Phillips, I., Casewell, M., Cox, T., Groot, B.D., Friis, C., Jones, R., Nightingale, C., Preston, R., Waddell, J. 2004. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. 53, 28-52.

Pitkälä, A., Haveri, M., Pyölä, S., Mylly, V., Honkanen-Buzalski, T. 2004. Bovine mastitis in Finland 2001 – Prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. **Journal of Dairy Science**. 87, 2433-2441.

Pyörälä, S., Taponen, S. 2009. Coagulase-negative staphylococci - Emerging mastitis pathogens. **Veterinary Microbiology**. 134,3-8.

Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B.K., Carter, G.R. 1994. **Clinical Veterinary Microbiology**. London: wolf, 648p.

Rabello, R.F., Souza, C.R., Duarte, R.S. et al. 2005. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from bovine mastitis in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Dairy Science**. 88, 3211-3219.

Sawant, A.A., Gillespie, B.E., Oliver, S.P. 2009. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative Staphylococcus species isolated from bovine milk. **Veterinary Microbiology**. 134, 73-81.

Soares, L.C., Pereira, I.A., Coelho, S.M.O., Cunha, C.M.M., Oliveira, D.F.B., Miranda, A.N., Souza, M.M.S. 2008. Caracterização fenotípica da resistência a antimicrobianos e detecção do gene *mecA* em *Staphylococcus* spp. coagulase- negativos isolados de amostras animais e humanas. **Ciência Rural**. 38, 1346-1350.

Taponen, S., Pyörälä, S. 2009. Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis- Not so different from *Staphylococcus aureus*? **Veterinary Microbiology**. 134, 29-36.

Vasuvedan, P., Nair, M. K. M., Annamalai, T., Venkitanarayanan, K. S. 2003. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. **Veterinary Microbiology**. 92, 179-185.

Vesterholm-Nielsen, M., Larsen, M.O., Olsen, J.E., Aarestrup, F.M. 1999. Occurrence of the *blaZ* gene in penicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Denmark. **Acta Veterinaria Scandinavica**. 40, 279-86.

Viridis, S., Scarano, C., Cossu, F., Spanu, V., Spanu, V., Santis, P. L. 2010. Antibiotic resistance in Staphylococci isolated from goats with subclinical mastitis. **Veterinary Medicine International**. DOI: 10.4061/2010/517060.

Table 1. Oligonucleotide primers and amplification conditions.

Genes	Primer	Oligonucleotide sequences	Annealing temperature	References
<i>icaD</i>	<i>SeicaDFw</i>	5'-AAGCCCAGACAGAGGCAATATCCA-3'	53,5°C	Greco et al., 2008
	<i>SeicaDRev</i>	5'-AGTACAAACAAACTCATCCATCCGA-3'		
<i>mecA</i>	SA-1	5'-CGGTAACATTGATCGCAACGTTCA-3'	68°C – 15 cycles	Murakami et al., 1991
	SA-2	5'-CTTTGGAACGATGCCTAATCTCAT-3'	60°C – 20 cycles	
<i>blaZ</i>	<i>blaZ F</i>	5'-AAGAGATTTGCCTATGCTTC-3'	50°C	Sawant et al., 2009
	<i>blaZ R</i>	5'-GCTTGACCACTTTTATCAGC-3'		
<i>ermA</i>	<i>ermA F</i>	5'-ATCGGATCAGGAAAAGGACA-3'	49°C	Sawant et al., 2009
	<i>ermA R</i>	5'-CACGATATTCACGTTTTACCC-3'		
<i>ermB</i>	<i>ermB F</i>	5'-AAGGGCATTTAACGACGAAA-3'	49,5°C	Sawant et al., 2009
	<i>ermB R</i>	5'-CTGTGGTATGGCGGGTAAGT-3'		
<i>ermC</i>	<i>ermC F</i>	5'-TGAAATCGGCTCAGGAAAAG-3'	52°C	Sawant et al., 2009
	<i>ermC R</i>	5'-CAAACCCGTATTCCACGATT-3'		
<i>msrA</i>	<i>msrA F</i>	5'-TGGTACTGGCAAAACCACAT-3'	52°C	Sawant et al., 2009
	<i>msrA R</i>	5'-AAACGTCACGCATGTCTTCA-3'		

Table 2. Distribution of *Staphylococcus* spp. isolates from small ruminant mastitis in Pernambuco and Bahia States, Brazil according to resistance genes and multi drug resistance rates.

Resistance Gene Pattern	MDR								Total
	0	0,14	0,29	0,43	0,57	0,71	0,86	1	
<i>blaZ</i>	1	6	4	5	9	4	7	1	36
<i>ermA</i>	-	-	-	-	-	-	-	1	1
<i>ermB</i>	-	-	-	1	-	1	-	-	2
<i>ermC</i>	-	-	-	-	-	3	3	1	7
<i>icaD</i>	4	6	8	2	-	-	-	-	20
<i>blaZ, icaD</i>	5	7	6	3	5	1	3	-	30
<i>blaZ, ermB</i>	1	1	2	-	-	-	1	-	5
<i>blaZ, ermC</i>	-	-	-	1	-	4	5	-	10
<i>blaZ, msrA</i>	-	-	-	-	-	-	1	-	1
<i>blaZ, ermA, icaD</i>	-	-	-	-	-	-	1	-	1
<i>blaZ, ermB, ermC</i>	-	-	-	-	-	4	-	2	6
<i>blaZ, ermB, icaD</i>	-	1	1	-	1	1	-	-	4
<i>blaZ, ermC, icaD</i>	-	1	1	-	1	-	-	-	3
<i>blaZ, ermA, ermB, icaD</i>	-	-	-	-	-	-	-	1	1
<i>ermB, ermC</i>	-	-	-	-	-	1	-	-	1
<i>icaD, msrA</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>icaD, ermC</i>	-	-	1	-	-	2	1	-	4
<i>icaD, ermB, ermC</i>	-	1	1	1	-	-	-	-	3
Total	12	23	24	13	16	21	22	5	

MDR: Multi drug resistance

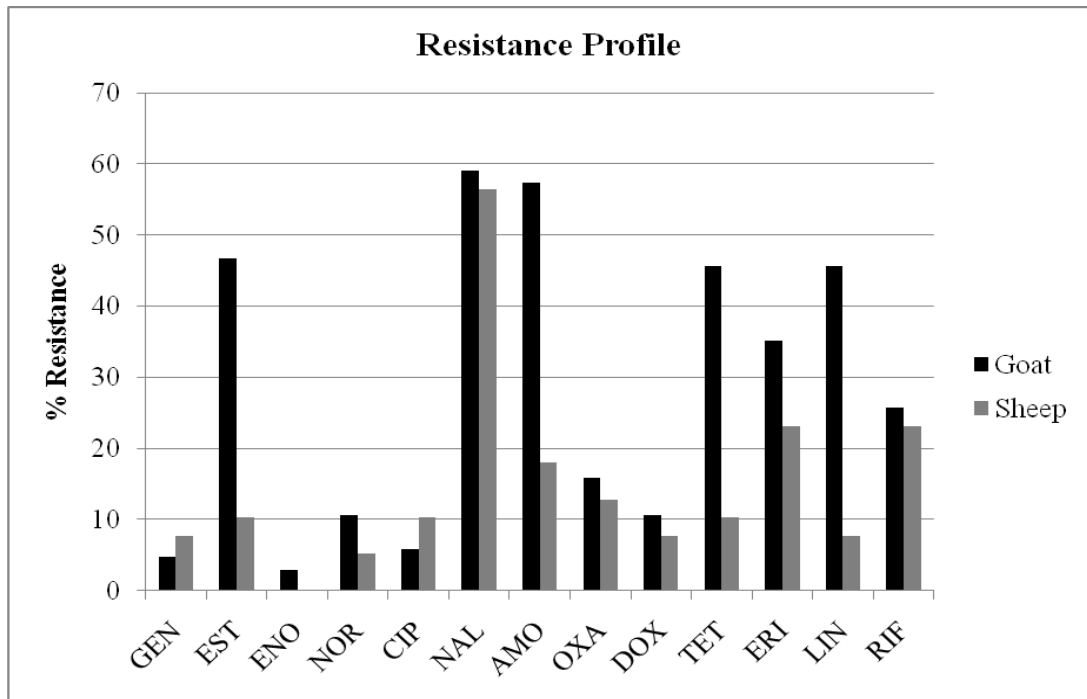


Figure 1 – Perceptual of resistance *Staphylococcus* spp. isolates in disk diffusion test. Where: GEN: gentamycin, EST: estreptomycin, ENO: enrofloxacin, NOR: norfloxacin, CIP: ciprofloxacin, NAL: nalidixic acid, AMO: amoxicillin, OXA: oxacillin, DOX: doxycycline, TET: tetracycline, ERI: eritromycin, LIN: lincomycin and RIF: rifampicin.

Conclusões

- Na caprinocultura leiteira dos estados de Pernambuco e Bahia, dentre os isolados de *Staphylococcus* spp. envolvidos em casos de mastite subclínica há prevalência das espécies *S. epidermidis*, *S. hycus* e *S. intermedius*;
- Os isolados bacterianos obtidos de casos de mastite em pequenos ruminantes apresentam baixo percentual de resistência para a maioria dos grupos de antimicrobianos testados, exceto para ácido nalidíxico e amoxicilina;
- Mais da metade dos isolados avaliados apresentam taxas de multirresistência acima de 0,43, devido ao uso empírico e a falta de assistência técnica em algum momento e podem ser preocupantes no futuro. Da mesma forma o fato de CNS ser potencial transmissor de resistência a outras espécies de *Staphylococcus* spp. também devem ser considerados;
- Não foi encontrado o gene *mecA* entre os isolados avaliados e a prevalência dos genes *erm* (ABC) é baixa;
- O gene *blaZ* é prevalente na população das bactérias estudadas, confirmando a resistência as drogas antimicrobianas do grupo dos β -lactâmicos ;
- Na avaliação para produção de biofilme a técnica molecular (PCR) apresenta maior precisão, assim como a detecção do gene *msrA*, que mostra-se mais acurada do que a triagem para bomba de efluxo.

Referências bibliográficas

- ALVES, F.S.F. **Leite de Cabra e Derivados: As Barreiras Sanitárias**. Embrapa Caprinos e Ovinos. Disponível em: <http://www.capritec.com.br/artigos_embrapa020819b.htm>. Acesso em 09/07/2010.
- BRITO, M.A.V.P.; Brito, J. R. F.; SILVA, M. A. S.; CARMO, R. A. Concentração mínima inibitória de dez antimicrobianos para amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de infecção intramamária bovina. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Juiz de Fora, v. 53, n.5, p.531-537, 2001.
- CONTRERAS, A.; SIERRA, D.; SÁCHEZ, A.; CORRALES, J.C.; MARCO, J.C.; PAAPE, M.J.; GONZALO, C. Mastitis in small ruminants. **Small Ruminant Research**, v.68, p.145-163, 2007.
- CUNHA, A.P., PINHEIRO JÚNIOR, J.W., SILVA, D.R., OLIVEIRA, A.A. da F., SILVA, K.P.C., MOTA, R.A. Perfil antimicrobiano em agentes contagiosos e ambientais de mastite clínica e subclínica de búfalas. **Arquivo do Instituto Biológico**, v.77, n.1, p.17-21, 2006.
- FREITAS, M. F. L.; PINHEIRO JÚNIOR, J. W.; STAMFORD, T. L. M.; RABELO, S. S. de A .; SILVA, D. R. da; SILVEIRA FILHO, V. M. da; SANTOS, F. G. B.; Sena, M. J. de; Mota, R. A. Perfil de Sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus* coagulase positivos isolados de leite de vacas com mastite no agreste do estado de Pernambuco. **Arquivo Instituto Biologia**, v. 72, n. 2, p.171-177, 2005.
- HARTMAN, M.; BOLSANELLO, R.X.; DOMINGUES, P.F.; MELLO JÚNIOR, A.Z.; LANGONI, H. Efeito da mastite sobre a contagem de células somáticas em ovelhas da raça Bergamácia. **Veterinária e Zootecnia**, v.16, n.1, p. 213-220, 2009.
- HOLANDA JÚNIOR, E.V.; ARAÚJO, G.G.L. **O papel dos caprinos e dos ovinos deslanados na agricultura familiar**. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41. 2004. Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: SBZ, 2004. p. 43-54.
- IBGE. Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA. Disponível em <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 26/05/2009.
- KLAAS, I.C.; ENEVOLDSEN, C.; VAARST, M.; HOUEH, H. Systematic clinical examinations for identification of latent udder health types in Danish dairy herds. **Journal of Dairy Science**, v.87, p.1217-1228, 2004.

- MBILU, T.J.N.K. Status of mastitis in lactating goats at Sokoine University of agriculture and neighbouring smallholder farms in Morogoro Municipality, Tanzania. **Livestock Research for Rural Development**, Tanzania. v.19, n.3, 2007. Disponível em <<http://www.cipav.org.co/lrrd/lrrd19/3/mbil19040.htm>>. Acesso em 15/07/2010.
- NEVES, M.C.; ROSSI JÚNIOR, O.D.; ALVES, E.C.C.; LEMOS, M.V.F. Detecção de genes de resistência antimicrobiana em cromossomos e plasmídeos de *Staphylococcus* spp. **Arquivo do Instituto Biológico**, v.74, n.3, p.207-213, 2007.
- NOGUEIRA, D.M.; CHAPAVAL, L.; NEVES, A.L.A.; COSTA, M.M. da. Passos para obtenção do leite de cabra com qualidade. **Comunicado Técnico**, 135. p.1-6. Embrapa Semiárido, Petrolina, 2008.
- PYÖRÄLÄ, S. New strategies to prevent mastitis. **Reproduction in Domestic Animals**, Belfast, v.37, n.4, p.211-216, 2002.
- QUADROS, D. G. Leite de cabra: produção e qualidade. **Pubvet**. v. 2, n. 1, jan. 2008. Disponível em <<http://www.pubvet.com.br/texto.php?id=110>>. Acesso em 19/07/2010.
- SANTOS, L.M.M. **Mastite caprina: etiologia e influência na qualidade do leite**. Monografia de especialização em Higiene e Inspeção de Produtos de Origem Animal, Universidade Castelo Branco, Rio de Janeiro, RJ. 51p. 2009.
- SANTOS, R. A.; MENDONÇA, C. L.; AFONSO, J. A. B.; SIMÃO, L. C. V. Aspectos clínicos e características do leite em ovelhas com mastite induzida experimentalmente com *Staphylococcus aureus*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 1, p. 6-12, 2007.
- SANTOS, C.D.M. ***Staphylococcus* sp. e enterobactérias isoladas de mastite recorrente em oito rebanhos da região de Uberlândia – MG: perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos**. Dissertação de mestrado em Ciências Veterinárias, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG. 51p. 2006.
- SILVA, F.L.R. & ARAÚJO, A. M. Desempenho produtivo em caprinos mestiços no semi-árido do Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, n.4, p.1028-1035, 2000.
- TAPONEN, S., PYÖRÄLÄ, S. 2009. Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis-Not so different from *Staphylococcus aureus*? **Veterinary Microbiology**. 134, 29-36.
- VAUTOR, E., ABADIE, G., GUILBERT, J. M., CHEVALIER, N., PÉPIN, M. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in dairy sheep. **Veterinary Microbiology**, v. 106, n. 3/4, p. 235-239, 2005.

- VAUTOR, E.; ABADIE, G.; GUILBERT, J. M.; HUARD, C.; PÉPIN, M. Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on farms with dairy sheep using pulsed field gel electrophoresis. **Veterinary Microbiology**, v. 96, n. 1, p. 69-79, 2003.
- VIEIRA, L.S.; CAVALCANTE, A.C.R.; XIMENES, L.F. **Epidemiologia e controle das principais parasitoses de caprinos nas regiões semi – áridas do Nordeste**. Sobral: EMBRAPA-CNPC, 50p, 1998.
- WITTE, W. Ecological impact of antibiotic use in animals on different complex microflora: environment. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.14, n.4, p.321-325, 2000.