

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA –  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO HIGIENE VETERINÁRIA E  
PROCESSAMENTO TECNOLÓGICO DE PRODUTOS DE ORIGEM  
ANIMAL

CAMILA SERVA PEREIRA

QUALIDADE DO LEITE DE CABRA *IN NATURA* PELA  
DETECÇÃO DE MICROORGANISMOS,  
SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA, PARÂMETROS  
FÍSICO-QUÍMICOS, CONTAGEM DE CÉLULAS  
SOMÁTICAS, CONTAGEM TOTAL BACTERIANA E  
RESÍDUO ANTIMICROBIANO

Niterói, RJ

2016

CAMILA SERVA PEREIRA

**QUALIDADE DO LEITE DE CABRA *IN NATURA* PELA DETECÇÃO DE  
MICROORGANISMOS, SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA,  
PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS, CONTAGEM DE CÉLULAS  
SOMÁTICAS, CONTAGEM TOTAL BACTERIANA E RESÍDUO  
ANTIMICROBIANO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora. Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal

Orientador: Elmiro Rosendo do Nascimento  
Co-orientador: Virginia Léo de Almeida Pereira

Niterói, RJ

2016

P436q Pereira, Camila Serva

Qualidade do leite de cabra *in natura* pela detecção de microrganismos, susceptibilidade antimicrobiana, parâmetros físico-químicos, contagem de células somáticas, contagem total bacteriana e resíduo antimicrobiano / Camila Serva Pereira; orientador Elmiro Rosendo do Nascimento. - 2016.

102f.

Tese (Doutorado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal)- Universidade Federal Fluminense, 2016.

Orientador: Elmiro Rosendo do Nascimento

1. Leite de cabra. 2. Qualidade do leite.  
3. Mastite. 4. Resistência microbiana a medicamentos. 5.  
Resíduo de antibiótico. I. Título.

CDD 637.127

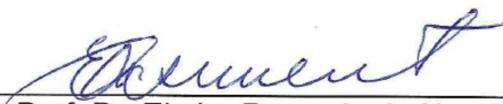
CAMILA SERVA PEREIRA

**Qualidade do leite de cabra in natura pela detecção de microrganismos, susceptibilidade antimicrobiana, parâmetros físicos-químicos, contagem de células somáticas, contagem total bacteriana e resíduo antimicrobiano.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor. Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

Aprovada em 31 de maio de 2016.

BANCA EXAMINADORA



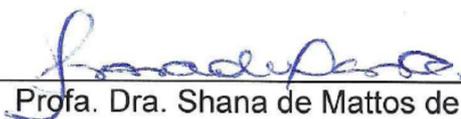
Prof. Dr. Elmiro Rosendo do Nascimento - Orientador - UFF



Profa. Dra. Juliana Ferreira de Almeida - UFF



Profa. Dra. Maria Lúcia Barreto - UFF



Profa. Dra. Shana de Mattos de Oliveira Coelho - UFRRJ



Dra. Rita de Cássia Figueira Silva - PESAGRO

Niterói-RJ  
2016

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais e irmãos, pelo incentivo, carinho e apoio.

Ao meu marido Paulo Lacerda Neto, pelo auxílio, compreensão e companheirismo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Elmiro Rosendo do Nascimento, pelos ensinamentos e suporte despendidos no decorrer da pós-graduação.

A minha co-orientadora, Virgínia Léo de Almeida Pereira, pela atenção, amizade e auxílio em inúmeros momentos desde a época da graduação.

A todos os demais professores e funcionários do Departamento de Saúde Coletiva Veterinária e Saúde Pública (MSV) da UFF, que tenham auxiliado de alguma forma com este trabalho.

Aos professores, Eliane Teixeira Mársico e Marco Antonio Sloboda Cortes, por terem colaborado com a obtenção de dados deste estudo.

À médica veterinária, Helena Magalhães, pelo carinho e colaboração essencial para a finalização dos dados microbiológicos da tese.

A todos os colegas de pós-graduação, em especial aos amigos Lídia Maria Marques dos Santos, Raquel Gouvêa, Leandro Machado, Felipe Faccini, Mariza Diná, Cátia Cardoso e Wanda Meira; e a todos os demais que tenham contribuído para a realização desta pesquisa.

Aos técnicos dos laboratórios de Epidemiologia Molecular e Bacteriologia da UFF, Fernanda Aguiar e Wilker Menezes, pelo fundamental auxílio na realização das análises. E a todos os estagiários e bolsistas destes laboratórios.

À equipe do Laboratório de Bacteriologia Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pela atenção e colaboração na obtenção de dados, em especial a Professora Shana de Mattos e as pós-doutorandas Dayanne de Melo e Cássia da Motta.

Ao Programa de Pós-graduação em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e à FAPERJ (Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro) pelo suporte financeiro.

A todos que direta ou indiretamente cooperaram com a realização deste trabalho.

## RESUMO

A caprinocultura leiteira vem ganhando destaque nos últimos anos impulsionado por incentivos governamentais e privados. Em contrapartida, a mastite acarreta representa grandes perdas econômicas no segmento leiteiro tanto na quantidade como na qualidade do leite produzido. Foi realizado um estudo da mastite subclínica em nove rebanhos de cabras leiteiras localizadas no Estado do Rio de Janeiro, totalizando 140 amostras de leite (uma amostras por animal), com o objetivo de avaliar a qualidade do leite de cabra pelo cultivo microbiológico e reação em cadeia da polimerase (PCR) do leite *in natura* para pesquisa de *Staphylococcus aureus*, contagem de células somáticas (CCS), contagem bacteriana total (CBT), análises físico-química, verificação do perfil de resistência antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus* spp., detecção de genes de resistência a beta-lactâmicos e a presença de resíduos antimicrobianos. Houve crescimento bacteriano em 64 amostras (48%), dentre essas 10 obtiveram isolamento de dois microrganismos associados. Dos 77 isolados encontrados, 58,4% foram identificados como *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN), 11,58% *Staphylococcus* Coagulase Positiva, 14,16% bastonetes gram negativos da família das enterobactérias (incluindo *E. coli* e *Serratia* sp.), 6,49% *Bacillus* spp., 5,19% *Streptococcus* spp. e 3,89% *Enterococcus* spp. A associação de SCN e bastonete gram negativo apresentou o maior número, com 50%, seguido de 20% *Staphylococcus* Coagulase Positiva + *Enterococcus* sp. e 10% SCN + *Bacillus* spp., *Streptococcus* spp. + *Bacillus* spp. e *Streptococcus* spp. + Bastonete Gram Negativo. No teste de difusão em disco realizado com 54 isolados de *Staphylococcus* spp., o antimicrobiano mais efetivo foi o florfenicol (1,7%) e as maiores resistências foram para ampicilina e penicilina (50%), seguida da oxacilina (32,70%), tetraciclina (8,60%), cefoxitina (6,89%), norfloxacin (5%), gentamicina e cefalotina (3,40%). A múltipla resistência a dois ou mais antimicrobianos foi observada em 57,40% dos isolados. Nenhuma amostra de leite obteve positividade para *Staphylococcus aureus* no cultivo e na PCR. A média de CCS de 2.152.000 células/mL está acima do recomendado pela literatura. Não houve associação significativa entre o isolamento bacteriano e os valores obtidos na contagem de células somáticas (t-Student  $p > 0,05$ ). A média de CBT de 842.000 UFC/mL de leite foi acima do preconizado pela legislação. As análises físico-químicas realizadas no leite foram: porcentagens de gordura, proteína e lactose por absorção infravermelha, bem como de sólidos totais, por soma dos valores dos componentes anteriores. A acidez, pela titulação de leite por solução alcalina (NaOH 0,1N), utilizando-se como indicador a fenolftaleína e o resultado expresso em graus Dornic (°D). A determinação de cloretos pelo método mercurométrico e densidade a 15°C em aparelho eletrônico. Alguns rebanhos não atenderam aos padrões físico-químicos exigidos pela legislação. A acidez apresentou diferença significativa quando associada ao isolamento bacteriano ( $p < 0,05$ ). O risco (*odds ratio*) de detecção bacteriana em caso de acidez elevada aumentado em 1,15 vezes quando comparado a amostras com acidez normal. A contribuição de todos os fatores físico-químicos a CBT somou 41,08%, sendo a lactose o fator que mais contribuiu isoladamente ( $p < 0,05$ ). Em dezenove amostras isoladas de mastite caprina subclínica dos mesmos rebanhos estudados, foi realizada a técnica proteômica MALDI-TOF para identificação das espécies; detecção fenotípica de resistência aos beta-lactâmicos pela difusão em disco simples de oxacilina, cefoxitina, penicilina G e amoxicilina + ácido clavulânico, ágar "screen" de oxacilina e microdiluição em caldo (MIC) de cefoxitina, e a detecção de

genes de resistência à oxacilina de *Staphylococcus* spp. através da PCR para amplificação dos genes: *mecA* (MURAKAMI et al. 1991), *mecA* variante (MELO et al. 2014), *mecl* (LENCASTRE; OLIVEIRA 2002), *mecRI* (ROSATO et al. 2003), *mecC* (STEEGER et al. 2012) e *blaZ* (ROSATO et al. 2003). Foram identificadas como *Staphylococcus epidermidis* 47,36%, 15,78% como *Staphylococcus warneri*, 10,52% como *Staphylococcus caprae* e *Staphylococcus aureus* e 5,26% tanto para *Staphylococcus lugdunensis*, como para *Staphylococcus simulans* e *Staphylococcus cohnii*. Os isolados caracterizados pelo MALDI-TOF foram confirmados como *Staphylococcus* spp. pela PCR para o gene 16rRNA. O teste de difusão em disco demonstrou resistência de 58% para penicilina G e 26,31% tanto para cefoxitina como para oxacilina. Todas as amostras foram sensíveis a amoxicilina + ácido clavulânico e ao ágar “screen” de oxacilina. À MIC, 63,15% das amostras foram resistentes a cefoxitina, sendo que 52,63% com MIC  $\geq$  8,0  $\mu$ g/ml e 10,52% com MIC  $\geq$  16  $\mu$ g/ml. Duas amostras de *Staphylococcus epidermidis* apresentaram o gene *mecA* proposto por Murakami et al. (1991). Todos os isolados foram negativos para o gene *mecA* variante (MELO et. al, 2014), *mecl*, *mecRI* *mecC* e *blaZ*. Nenhuma amostra apresentou resíduo acima dos limites máximos permitidos. SCN foi o agente bacteriano isolado com maior frequência e a resistência antimicrobiana dessas cepas frente a ampicilina, penicilina e oxacilina, alertam para alterações do perfil de sensibilidade destes patógenos ao longo dos anos. A elevada taxa de resistência fenotípica acompanhada por uma baixa detecção genotípica nos isolados de *Staphylococcus* spp., pode estar relacionada a alterações nos genes desencadeadas por mutações, fagos, plasmídeos e transposons. Tais achados reforçam a importância deste grupo de microrganismos na etiologia da mastite subclínica em caprinos e abre perspectivas para futuras pesquisas para a investigação da epidemiologia da doença. A CCS não se correlaciona com os resultados do isolamento bacteriano, devendo ser avaliada com cautela em estudos sobre mastite subclínica em cabras. Esse estudo demonstra a importância e a necessidade de um monitoramento constante por parte dos órgãos responsáveis e por instituições de pesquisa quanto a qualidade e a integridade do leite de cabra que é fornecido a população.

**Palavras-chave:** Leite de cabra. Mastite. Resistência Antimicrobiana. Resíduo Antimicrobiano.

## ABSTRACT

Dairy goat is growing in recent years driven by government and private incentives. In contrast, mastitis leads to great economic losses in the dairy segment in both the quantity and quality of milk produced. A study of subclinical mastitis in nine herds of dairy goats in the state of Rio de Janeiro, totaling 140 samples of milk, in order to assess the quality of goat milk by microbiological culture and polymerase chain reaction (PCR) was performed of fresh milk for *Staphylococcus aureus* research, somatic cell count (SCC), total bacterial count (TBC), physico-chemical analysis, check in antimicrobial resistance profile *Staphylococcus* spp., detection of beta-resistance genes lactam and the presence of antimicrobial residues. Bacterial growth in 64 samples (48%), of these 10 were obtained isolating two associated microorganisms. Of the 77 isolates found, 58.4% were identified as coagulase negative *Staphylococcus* (CNS), 11.58% coagulase positive *Staphylococcus*, 14.16% negative rods gram of the Family *Enterobacteriaceae* (including *E. coli* and *Serratia* sp.), 6.49% *Bacillus* spp., *Streptococcus* spp. 5.19%. and 3.89% *Enterococcus* spp. The combination of CNS and gram negative rod had the highest number with 50%, followed by 20% *Staphylococcus* coagulase positive + *Enterococcus* sp. SCN + 10% *Bacillus* spp., *Streptococcus* spp. + *Bacillus* spp. and *Streptococcus* spp. + Gram Negative Bacillus. In the disc diffusion test with 54 *Staphylococcus* spp., more effective antibiotic florfenicol was (1.7%) and the greatest resistance to ampicillin and penicillin were (50%), followed by oxacillin (32.70%), tetracycline (8.60%), cefoxitin (6.89%), norfloxacin (5%), gentamicin and cephalothin (3.40%). Multiple resistance to two or more antibiotics was observed in 57.40% of the isolates. No milk sample obtained positive for *Staphylococcus aureus* in culture and PCR. The SCC average of 2,152,000 cells/mL is above the recommended by the literature. There was no significant association between bacterial isolation and the values obtained in the SCC (Student t  $p > 0.05$ ). The average TBC 842,000 CFU/ml of milk was higher than recommended by law. The physico-chemical analyzes in milk were: percentage of fat, protein and lactose infrared absorption, as well as total solids, by summing the values of the above components. The acidity by titration milk alkaline solution (0.1N NaOH), using phenolphthalein as an indicator and Dornic result expressed in degrees (°D). The determination of chloride by method mercurimetric and density at 15°C in electronics. Some herds did not meet the physical and chemical standards required by law. Acidity significant difference when associated with bacterial isolation ( $p < 0.05$ ). The risk (odds ratio) of bacterial detection in case of high acidity increased by 1.15 times as compared to samples with normal acidity. The contribution of all physicochemical factors TBC amounted to 41.08%, the lactose factor that contributed alone ( $p < 0.05$ ). In nineteen samples isolated from subclinical mastitis goat herds of the same study, proteomics technique MALDI-TOF was performed to identify the species; Phenotypic detection of resistance to beta-lactams by diffusion in simple disk oxacillin, cefoxitin, penicillin G and amoxicillin plus clavulanic acid, agar "screen" oxacillin and microdilution (MIC) of cefoxitin, and detection of resistance genes oxacillin of *Staphylococcus* spp. by PCR amplification of genes: *mecA* (MURAKAMI et al 1991.), *mecA* variant (MELO et al 2014.) *mecI* (LANCASTER; OLIVEIRA 2002), *mecRI* (ROSATO et al., 2003), *mecC* (STEEGER et al. 2012) and *blaZ* (ROSATO et al. 2003). They were identified as *Staphylococcus epidermidis* 47.36% 15.78% as *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus caprae* as 10.52% and 5.26% *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus lugdunensis* so as *Staphylococcus*

*simulans* and *Staphylococcus cohnii*. Isolates characterized by MALDI-TOF were confirmed as *Staphylococcus* spp. by PCR for 16S rRNA gene. The disk diffusion test demonstrated resistance to penicillin G, 58% and 26.31% for both the cefoxitin and for oxacillin. All strains were susceptible to amoxicillin + clavulanic acid and agar "screen" oxacillin. The MIC, 63.15% of the samples were resistant to cefoxitin, and 52.63% with MIC  $\geq$  8.0 g / ml and 10.52% with MIC  $\geq$  16 mg / ml. Two samples of *Staphylococcus epidermidis* *mecA* gene had proposed by Murakami et al. (1991). All isolates were negative for the *mecA* gene variant (MELO et al., 2014), *med*, *mecRI* *mecC* and *blaZ*. No samples showed residue above the maximum allowable limits. CNS was isolated bacterial agent with greater frequency and antimicrobial resistance across these strains to ampicillin, penicillin and oxacillin, warn sensitivity profile of these pathogens changes over the years. The high phenotypic resistance rate accompanied by a low genotypic detection in *Staphylococcus* spp., may be related to alterations in gene triggered by mutation, phage, plasmids and transposons. These findings reinforce the importance of this group of microorganisms in the etiology of subclinical mastitis in goats and opens perspectives for future research to investigate the epidemiology of the disease. The SCC is not correlated with the results of bacteriological isolation, and must be carefully evaluated in studies of subclinical mastitis in goats. This study demonstrates the importance and the need for constant monitoring by the responsible agencies and research institutions and the quality and integrity of goat milk that the population is provided.

**Keywords:** Goat milk. Mastitis. Antimicrobial resistance. Antimicrobial residue.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- BHI - Brain Heart Infusion
- CBT - Contagem Bacteriana Total
- CCD - Cromatografia em Camada Delgada
- CCS - Contagem de Células Somáticas
- CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- CMT - California Mastitis Test
- EMB - Eosin Methylene Blue
- ESD - Extrato Seco Desengordurado
- EST - Extrato Seco Total
- LANAGRO - Laboratório Nacional Agropecuário
- LMR - Limites Máximos de Resíduos
- MAPA - Ministério da Agricultura e Abastecimento
- MERCOSUL - Mercado Comum do Sul
- OMS - Organização Mundial de Saúde
- PAMVET - Programa de Análises de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal
- PCR - Reação em Cadeia da Polimerase (*Polimerase Chain Reaction*)
- PNCRC - Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes
- RIISPOA - Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
- SCN - *Staphylococcus* coagulase negativa
- SCP - *Staphylococcus* coagulase positiva

## SUMÁRIO

**1 INTRODUÇÃO**, p. 13

**2 REVISÃO DE LITERATURA**, p. 16

2.1 PRODUÇÃO E EXPLORAÇÃO DE CAPRINOS LEITEIROS, p. 16

2.2 CARACTERÍSTICAS E ASPECTOS NUTRICIONAIS DO LEITE DE CABRA,  
p. 19

2.3 MASTITE CAPRINA, p. 22

2.4 QUALIDADE DO LEITE DE CABRA, p. 29

2.5 RESISTÊNCIA DE *STAPHYLOCOCCUS* SPP. A BETA-LACTÂMICOS, p. 33

2.6 RESÍDUO ANTIMICROBIANO EM LEITE, p. 36

**3 DESENVOLVIMENTO**, p. 43

3.1 MASTITE POR CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS E ISOLAMENTO BACTERIANO EM CABRAS NEGATIVAS PARA *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*,  
p. 43

3.2 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA, FÍSICO-QUÍMICA E PERFIL DE SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE *STAPHYLOCOCCUS* SPP. DO LEITE DE CABRA COM MASTITE SUBCLÍNICA, p. 55

3.3 CARACTERIZAÇÃO PROTEÔMICA DE *STAPHYLOCOCCUS* SPP. ORIUNDOS DE MASTITE CAPRINA E AVALIAÇÃO FENOGENOTÍPICA DA RESISTÊNCIA AOS BETA-LACTÂMICOS, p. 70

3.4 PESQUISA DE RESÍDUO DE ANTIBIÓTICOS EM LEITE DE CABRA *IN NATURA* PRODUZIDOS NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO PELO MÉTODO DE MULTIRRESÍDUO POR LC-QTOF-MS E LC-MS/MS, p. 78

**4 CONSIDERAÇÕES FINAIS, p. 88**

**5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, p. 89**

## 1 INTRODUÇÃO

No cenário agrícola mundial, é notória a evolução da caprinocultura leiteira. Em determinados países, os sistemas de criação, transformação e distribuição encontram-se em estágio avançado de desenvolvimento. Ao final da década de 80, houve um crescimento significativo da produção mundial de leite de cabra, que atingiu 12.581.522 t em 2005 (FAO, 2007).

No Brasil, a caprinocultura tem importância nos contextos social e do agronegócio. Programas de incentivo e crédito, que dão suporte ao crescimento desta produção, são evidentes, tanto para empreendimentos empresariais, quanto para sistemas familiares de produção de carne, leite e peles (FONSECA; SIMPLÍCIO, 2008).

A procura e, conseqüentemente, o consumo do leite de cabra tem aumentado em razão de três aspectos básicos. A cabra é um animal capaz de se adaptar a condições criatórias variáveis e inóspitas, podendo proporcionar a famílias de baixa renda uma melhoria do nível nutricional da dieta. O segundo aspecto dessa demanda é o interesse de apreciadores de produtos de leite de cabra, especialmente produtos orgânicos, queijos finos e iogurtes. O último aspecto deriva da necessidade das pessoas com alergias ao leite de vaca e outras doenças gastrointestinais alimentares (HAENLEIN, 2004).

No ano 2000, entrou em vigor a legislação federal própria para leite de cabra (Instrução Normativa nº 37), a qual define os procedimentos da produção ao processamento, bem como determina os padrões físico-químicos e microbiológicos estabelecidos pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), para o leite cru, pasteurizado e esterilizado (BRASIL, 2000).

A qualidade do leite está estreitamente vinculada a critérios de manejo higiênicos, desde a sua obtenção na ordenha, no acondicionamento após sua retirada, no transporte, no beneficiamento e na comercialização, para reduzir ao máximo a contaminação microbiana e química e evitar problemas de ordem econômica e de saúde pública (CHAPAVAL; MAGALHÃES, 2011).

A mastite é considerada a doença que acarreta os maiores prejuízos econômicos à produção leiteira, pela redução da quantidade e pelo comprometimento da qualidade do leite produzido, descarte do leite, custos com

medicamentos e assistência veterinária ou até pela perda total da capacidade secretora da glândula mamária. Consiste na inflamação da glândula mamária que ocorre na maioria das vezes, como resposta a uma infecção causada por microrganismos. Caracteriza-se por mudanças físicas, químicas e bacteriológicas no leite e por alterações patológicas no úbere. O reconhecimento precoce unido ao rápido tratamento são medidas importantes para limitar os danos teciduais e as perdas ocasionadas pela doença (RIBEIRO et al., 2003; SHEARER; HARRIS, 2003). Em caprinos, os principais agentes são os *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN), *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp. e Bacilos Gram Negativos, além de *Mycoplasma* spp. (LANGONE, 2006; BEZERRA et al, 2006; ALMEIDA, 2013).

Um dos parâmetros utilizados para avaliar o estado de infecção da glândula mamária em cabras é a contagem de células somáticas (CCS), sobretudo na infecção de caráter subclínico, sendo o cultivo de leite utilizado na identificação do agente etiológico (PEIXOTO et al., 2010). Não há limites máximos oficiais exigidos para a CCS no leite no Brasil, entretanto Paes et al (2003) sugere que valores de CCS acima de 1.000.000 células/mL de leite sirvam de critério para a realização de exames microbiológicos. A Contagem Bacteriana Total (CBT) constitui outra técnica que pode ser empregada para a avaliação da contaminação do leite caprino, sendo indicador de qualidade higiênico-sanitário do leite, expressa em unidades formadoras de colônia por mililitro de leite (UFC/mL), com valor máximo de 500.000 UFC/mL para o leite de cabra cru (BRASIL, 2000).

O tratamento da mastite se dá pelo uso de antimicrobianos de largo espectro, aplicados preferencialmente pela via intramamária, esgotando-se previamente o teto afetado (MACIEL, 2006). Porém, o amplo e indiscriminado uso de antimicrobianos pode conduzir ao aumento de resistência de microrganismos, e bactérias inerentemente resistentes podem tornar-se predominantes em uma população e transferir material genético para bactérias suscetíveis, que então adquirem resistência (QUINN et al.,2005).

Em relação à susceptibilidade *in vitro* dos agentes etiológicos da mastite caprina, tem-se observado a crescente resistência bacteriana aos antimicrobianos convencionais, o que alerta para a necessidade da adoção de protocolos terapêuticos, de preferência respaldados em testes de susceptibilidade antimicrobiana *in vitro* (LANGONI et al., 2006). Estudos com cepas de *Staphylococcus* spp.

isoladas do leite cru de cabras à ação de diferentes antimicrobianos demonstraram maior resistência para antimicrobianos do grupo beta-lactâmico (GARINO JÚNIOR et al., 2011; ALMEIDA et al., 2013; SALINA et al. 2015). Essa resistência ocorre por dois mecanismos distintos: a produção da enzima extracelular beta-lactamase, codificada pelo gene *blaZ*, e a produção de PBP2a ou PBP2', uma proteína ligante de penicilina de baixa afinidade, codificada pelo gene *mecA*. A expressão do gene *mecA* é constitutiva ou induzida por antimicrobianos beta-lactâmicos, como a oxacilina e cefoxitina (LOWY, 2003; KURODA et al., 2001).

Numerosos relatos têm enfatizado a necessidade de uma menor e melhor utilização de agentes antibacterianos, melhorias no controle das infecções e desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos. No entanto, o uso restrito de antibacterianos nem sempre leva à queda na resistência, provavelmente pela adaptação desses microrganismos em relação ao carregamento da resistência (LIVERMORE, 2003).

O uso de antimicrobianos na produção animal tem sido motivo de preocupação de autoridades de diversos países, especialmente quanto aos aspectos da segurança dos alimentos de origem animal para a saúde pública e para a comercialização (BRITO, 2003). A presença de resíduos antimicrobianos no leite é derivada de sua utilização inadequada nas propriedades rurais, o que representa grande preocupação, por representar risco à saúde do consumidor e por interferir na produção dos derivados, determinando prejuízos econômicos (COSTA, 1996; BRITO, 2003; NERO et al., 2004).

Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a qualidade do leite de cabra pelo cultivo microbiológico e PCR do leite *in natura*, contagem de células somáticas, contagem total de bactérias, análise físico-química, verificação do perfil de resistência antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus* spp. e a presença de resíduos antimicrobianos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 PRODUÇÃO E EXPLORAÇÃO DE CAPRINOS LEITEIROS

A atividade de criação de cabras está ligada ao homem desde o início da civilização e foi importante para auxiliar na fixação dos primeiros núcleos de assentamentos, fornecendo leite, carne e pele. Os caprinos foram introduzidos nas Américas pelos primeiros colonizadores europeus, adaptando-se melhor nas áreas tropicais onde estão concentrados atualmente. Esses animais foram trazidos para o Brasil pelos portugueses ocupando primeiramente a faixa litorânea antes de se mudar para a caatinga, onde adquiriram alto nível de rusticidade e resistência às doenças e intempéries, escassez hídrica e alimentar (SILVEIRA, 2008).

A adaptação dos caprinos à ampla variação de condições climáticas e de manejo faz com que eles apresentem maior eficiência produtiva em relação a qualquer outro ruminante doméstico, como bovino, ovino, ou bubalino, estando presente em regiões com condições precárias para o desenvolvimento de outras espécies (QUADROS, 2008).

A cabra é a terceira espécie produtora de leite em volume de produção mundial. Estima-se que em 2011 foram produzidos 17 milhões toneladas de litros de leite de cabra no mundo, o que corresponde a 2% da produção mundial de leite (EMBRAPA, 2011). Os maiores produtores de leite caprino são Índia, Bangladesh e Sudão, porém a maior parte desse leite produzido é voltado para o consumo de subsistência nesses países (ESCAREÑO et al, 2012). O continente asiático foi responsável por 58,7% da produção mundial de leite de cabra, o que representou mais de nove milhões de toneladas. Nas Américas, esse valor não passou de 362 mil toneladas, sendo o Brasil responsável por apenas 0,9% da produção mundial (FAO, 2012). A Europa é o único continente a apresentar organização econômica e importância ao setor da caprinocultura leiteira, possuindo apenas 5,1% do rebanho caprino leiteiro mundial, porém responsável pela produção de 15,6% de leite de cabra (ESCAREÑO et al, 2012).

A análise da evolução da produção mundial de leite de cabra num período recente mostra que o comportamento do mercado do leite apresenta padrão de crescimento muito semelhante ao crescimento do rebanho caprino. Nos últimos

cinco anos, a produção de leite de cabra no mundo teve uma taxa de crescimento de 1,6% ao ano (ressalte-se que a taxa de crescimento do rebanho girou em torno de 1%). Portanto, assim como o rebanho, em 2016 prevalecerá uma tendência de baixo crescimento da produção mundial de leite de cabra. (MAGALHÃES et al., 2016)

A criação de cabras para a produção de leite começou no Brasil na década de 70, quando produtores interessados se reuniram em Belo Horizonte para discutir a atividade e fundaram a primeira associação brasileira dos criadores de cabra leiteira (FONSECA; BRUSCHI, 2009). Atualmente, a caprinocultura leiteira é considerada um setor do agronegócio brasileiro, com uma produção aproximada de 140 mil toneladas/ano, sendo o país com maior produção de leite de cabra da América do Sul (FAO, 2010).

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o rebanho nacional de caprinos em 2014 alcançou 8.851.879 cabeças, considerado o 22º rebanho mundial de caprinos. O Nordeste possui aproximadamente 92% do rebanho caprino do país, porém participa com pouco mais de 26% da produção de leite de cabra e com 17% do total comercializado. De acordo com Cordeiro & Cordeiro (2009), pelo tamanho do rebanho existente e potencial de exploração, o Nordeste brasileiro apresenta ainda um pequeno aproveitamento de seu potencial de produção de leite de cabra e derivados, havendo necessidade de mais programas e incentivos para se alcançar um grande desenvolvimento do setor.

Não apenas a Região Nordeste do Brasil contribui com a produção de leite de cabra. Existem outras bacias leiteiras já sedimentadas nas regiões Sudeste e Sul do País. No Sudeste a expressão produtiva se concentra nos Estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro, e no Sul, o Rio Grande do Sul é o destaque de produção de leite de cabra. Nestes Estados, a maior totalidade do leite produzido tem como destino as usinas de pasteurização e/ou produção de queijos finos para determinada população com maior poder financeiro. Contudo, nestas bacias leiteiras, a exemplo do Nordeste, a produção de leite de cabra tem origem em sistemas de produção do tipo familiar ou por pequenos produtores (HOLANDA JÚNIOR et al., 2008). De acordo com Borges (2003), apesar de dispor de apenas 3,5% do efetivo caprino do Brasil, a Região Sudeste destaca-se pela representatividade de seus estados no agronegócio caprino leiteiro, tanto pela produção comercial (21% do total produzido no país) quanto pela participação no mercado do leite de cabra e seus derivados.

Acrescenta que a produção de leite de cabra na região Sudeste do Brasil caracteriza-se pelo uso de sistemas de produção intensivos confinados, na sua grande totalidade em pequenas áreas próximas das regiões metropolitanas e centros urbanos. Nesses sistemas, animais de raças leiteiras especializadas (Saanen, Alpina e Toggenburg) ou mestiços destas raças são mantidos em áreas restritas ou galpões, sendo toda a alimentação fornecida no cocho (BORGES, 2003).

Em termos de tendência nota-se uma diminuição do rebanho de caprinos no período de 2005 a 2014: analisando-se os últimos dez anos, percebe-se que o rebanho reduziu em aproximadamente 14%. Entretanto, a partir de 2012 o rebanho caprino vem mostrando uma recuperação de 2,4% no efetivo (MAGALHÃES et al., 2016).

No Brasil o leite de cabra vem conquistando crescente mercado, tanto na forma de leite pasteurizado, pasteurizado congelado, como na forma de leite em pó e em embalagens tetrapak tipo longa vida UHT, esterilizado e aromatizado e outros produtos industrializados como queijo (frescal, boursin, moleson, chevrotin), iogurte, sorvetes e cosméticos (CORDEIRO;CORDEIRO, 2009). Tal fato é fundamental para que sejam oferecidos produtos diferenciados no comércio, desmistificando o leite de cabra como produto pouco palatável (COSTA et al., 2009).

Apesar do leite de cabra apresentar características favoráveis aos consumidores e estar em crescente expansão, a caprinocultura leiteira ainda enfrenta vários desafios de produção. A obtenção de leite de cabra com qualidade e segurança depende diretamente da manutenção de condições higiênico-sanitárias adequadas na obtenção da matéria-prima, no seu processamento e comercialização. (RIBEIRO; RIBEIRO 2010).

A exploração de caprinos leiteiros desenvolve-se em quase todos os municípios brasileiros, com o incentivo de ações conjuntas de governos estaduais, instituições de pesquisa e criadores. Entretanto, a sua baixa qualidade do leite produzido e a de seus derivados, comprometem o produto final. A produção e o beneficiamento exigem cuidados higiênico-sanitários e de manejo para reduzir ao máximo a contaminação microbiana e química (ALVES, 2011). Além disso, a produção ainda é baixa quando comparada a de outros países, o que está relacionado à precariedade da tecnologia aplicada, aliada a não utilização de padrões de qualidade para os produtos caprinos (AMARAL et al., 2011).

## 2.2 CARACTERÍSTICAS E ASPECTOS NUTRICIONAIS DO LEITE DE CABRA

O leite de cabra é um alimento de alto valor nutritivo, com os elementos necessários à nutrição humana, como açúcar (lactose), proteínas, gorduras, vitaminas, ferro, cálcio, fósforo e outros minerais (COSTA, 2008). Ocupa lugar de destaque dentre os alimentos de origem animal utilizados na alimentação humana, uma vez que fornece também calorias e aminoácidos essenciais em proporções iguais ou superiores aos recomendados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (GOMES et al., 2004).

Esse apelo é justificado por suas características nutricionais e ainda possui diversas vantagens terapêuticas, podendo ser consumido sem efeitos negativos por pessoas que possuem alergias ou outros problemas gastrointestinais (HAENLEIN, 2004; PARK, 2007; RIBEIRO; RIBEIRO, 2010). Suas proteínas são mais rapidamente digeridas e os aminoácidos são absorvidos com maior eficiência do que aminoácidos do leite de vaca (JENNESS, 1980; JANDAL, 1996).

Pode-se observar uma similaridade do leite de cabra com o leite de vaca em sua composição básica, porém o leite caprino apresenta melhor digestibilidade, maior capacidade tamponante e valores terapêuticos na pediatria, na gastroenterologia e na nutrição humana (ZAMBOM, 2003).

Ao contrário do leite de vaca, que é ligeiramente ácido, o leite de cabra tem natureza alcalina, uma grande vantagem para pessoas com problemas de acidez estomacal. Esta alcalinidade se deve à maior quantidade de proteína e a um arranjo diferente de fosfatos (SAINI; GILL 1991). O leite de cabra possui predomínio de  $\beta$ -caseína e maior quantidade de K-caseína e  $\alpha$ S1-caseína; ainda, o lactosoro apresenta uma menor quantidade de albumina sérica e lactoalbumina, o que representa uma grande vantagem para pessoas alérgicas ao leite de vaca, que é uma condição considerada comum e acomete cerca de 2,5% das crianças durante os três primeiros anos de vida (BUSINCO; BELLANTI, 1993).

Em relação ao tamanho dos glóbulos de gordura do leite de cabra e de vaca, eles se apresentam bem diferentes. Os glóbulos de gordura no leite caprino são caracteristicamente abundantes no diâmetro inferior a 3,5  $\mu$ m e, aproximadamente, 65% apresentam diâmetro de 3,0  $\mu$ m. O menor diâmetro dos glóbulos de gordura, bem como uma melhor distribuição na emulsão lipídica, tem uma influência

significativa sobre a digestibilidade no organismo humano. Por essa razão, o leite caprino tem maior digestibilidade e sofre metabolismo lipídico mais eficiente no trato intestinal humano em comparação com leite bovino. O menor diâmetro, maior número e melhor distribuição dos glóbulos de gordura no leite caprino apresentam também um impacto tecnológico (CHACÓN VILLALOBOS, 2005; PARK et al., 2007).

Outra diferença significativa entre lipídios do leite de cabra e de vaca está na composição dos seus ácidos graxos. O leite caprino possui elevados teores de ácidos graxos de cadeia curta e média, tais como o ácido butírico, capróico, caprílico, cáprico, láurico e mirístico, contendo em média 35% de ácidos graxos de cadeia média, enquanto o leite bovino contém em média apenas 17% desses ácidos graxos. Os ácidos capróico, caprílico e cáprico constituem 20% de todos os ácidos graxos no leite de cabra (HAENLEIN, 2004).

Os ácidos graxos de cadeia curta e de cadeia média, bem como os triacilgliceróis de cadeia média se estabeleceram em tratamentos médicos para uma série de distúrbios clínicos, tais como síndromes de má absorção, desnutrição infantil, alimentação de bebês prematuros, fibrose cística, esteatorreia e cálculos biliares, devido à capacidade exclusiva metabólica desses ácidos graxos de fornecer energia diretamente, ao invés de serem depositados no tecido adiposo bem como a capacidade deles de reduzir o nível de colesterol sérico e de inibir a deposição de colesterol nos vasos sanguíneos. O leite de cabra também possui elevada quantidade de ácidos graxos monoinsaturados e ácidos graxos poliinsaturados, os quais são conhecidos por serem benéficos para a saúde humana, especialmente para as doenças cardiovasculares (ibid).

As proteínas do leite caprino possuem maior digestibilidade quando comparadas ao leite de vaca. A ação da protease do leite de cabra no estômago é mais rápida, devido à sua menor quantidade da fração  $\alpha$ 1-caseína. (HAENLEIN, 2004; PARK, 2006). Essa fração é responsável pela maioria das alergias associadas ao leite de vaca. Por essa razão, na maioria dos casos, pessoas alérgicas ao leite bovino respondem bem ao leite caprino (CHACÓN VILLALOBOS, 2005, HAENLEIN, 2004). Outra característica relacionada aos baixos níveis desta proteína é a produção de coalhos mais fracos e menos compactos que os do leite de vaca, sendo facilmente digeridos no estômago (AMARAL et al., 2011).

O conteúdo mineral do leite de cabra é superior ao do leite bovino, contendo mais cálcio, fósforo, potássio, magnésio e cloro, e menos sódio e enxofre. Devido ao maior teor de potássio e do sódio, o leite de cabra tem um sabor específico ligeiramente salgado (BOŽANIĆ et al., 2002). Além disso, apresenta maior biodisponibilidade de ferro (AMARAL et al., 2011).

O leite de cabra não possui o pigmento  $\beta$ -caroteno conhecido como provitamina A, que origina a cor amarela no leite de vaca, em compensação tem em sua composição teores elevados de vitamina A, evitando-se doenças degenerativas na visão, reprodução, pele e perda de funções orgânicas (ROCHA, 2007). Possui um gosto típico que, dependendo de onde os animais estão instalados e da alimentação que recebem, pode se apresentar mais forte, muitas vezes indesejável. Não apresenta nenhum cheiro típico ou desagradável, mas se o apresentar é devido às más condições de higiene. O mau cheiro, denominado hírcino, é transmitido pelo bode quando este se encontra perto das cabras em lactação, impregnando-as, e podendo transmiti-lo diretamente ao leite (QUADROS, 2008).

Sabe-se que fatores genéticos, fisiológicos, climáticos e principalmente de origem alimentar, podem afetar as características químicas, físicas e as propriedades do leite caprino. Porém, ainda existem lacunas de informações sobre a composição química desse alimento, sobretudo em relação à influência da raça, mestiçagem, ambiente, alimentação e período de lactação (COSTA et al., 2009).

No Brasil, a Instrução Normativa nº 37 (IN37/2000)(BRASIL, 2000) regulamenta as condições de produção e identidade, além dos requisitos mínimos de qualidade do leite de cabra destinado ao consumo humano. Foram estabelecidos como padrões mínimos 2,8% de proteína bruta, 4,3% de lactose, 8,2% de sólidos não gordurosos e 0,7% de cinzas.

O reconhecimento mundial das propriedades nutricionais e funcionais do leite de cabra por médicos, pesquisadores e consumidores em geral, é unânime, o que permite a esse alimento a validação funcional (ROCHA, 2007). Pela sua constituição é considerado uma ótima alternativa de substituição para pessoas com alergia ao leite de vaca e para pessoas em busca de uma alimentação saudável. Além disso, a industrialização do leite de cabra aumenta as opções de fornecimento deste produto, atingindo as necessidades do consumidor o qual está cada vez mais informado, exigente e voltado ao consumo de produtos naturais, nutricionais e de alto valor

agregado. Se todos os elos da cadeia produtiva estiverem em consonância, o produto final estará dentro dos requisitos de segurança alimentar, conquistando do consumidor a confiabilidade e melhor competitividade no mercado (AMARAL et al, 2011).

### 2.3 MASTITE CAPRINA

A mastite é uma enfermidade responsável pelos maiores prejuízos econômicos à produção leiteira, uma vez que causa queda na produção de leite, tanto pela redução da quantidade quanto pelo declínio dos índices qualitativos ou até pela perda de função da glândula mamária acometida (RIBEIRO et al., 2003).

O desencadeamento da mastite está vinculado à complexa tríade: animal (hospedeiro), agente etiológico e meio ambiente. Os fatores determinantes que influenciam na susceptibilidade dessa doença incluem: resistência natural da glândula mamária, estágio de lactação, hereditariedade, idade, infectividade e patogenicidade do agente, ordenha, manejo, clima e nutrição (PRESTES et al., 2002)

Mastite é a denominação do processo inflamatório da glândula mamária. Pode ser de origem tóxica, traumática, alérgica, metabólica e infecciosa, destacando-se as de origem bacteriana. Sua etiologia é complexa e multivariada, o que torna necessária a identificação dos microrganismos que causam a infecção da glândula mamária, tanto para o controle e a prevenção, quanto para o monitoramento dos rebanhos (RIBEIRO et al., 2003). Os patógenos causadores de mastite são classificados em dois grupos diferentes: contagiosos e ambientais. Os contagiosos necessitam do animal para a sobrevivência, com multiplicação na glândula mamária, canal do teto ou sobre a pele. Os patógenos ambientais são oportunistas, estão presentes no ambiente em que o animal vive e a infecção pode ocorrer no período entre ou durante as ordenhas (COSTA, 1998; FREITAS et al., 2005).

Pode ser classificada como clínica ou subclínica (RIBEIRO et al., 2003). A mastite clínica apresenta sinais evidentes como edema, aumento da temperatura, endurecimento e dor na glândula mamária, além da presença de grumos, pus ou qualquer alteração das características do leite (FONSECA; SANTOS, 2000). Na forma subclínica não ocorrem alterações macroscópicas e sim na composição do

leite, portanto não há sinais visíveis de inflamação do úbere (CULLOR et al., 1994; RIBEIRO et al., 2003).

Levantamentos de pesquisa demonstram que a mastite do tipo subclínica predominante nos rebanhos de pequenos ruminantes, cuja a frequência está entre 22 e 75% (LIMA JUNIOR et al., 1995; PEIXOTO et al., 2010). Em contrapartida, a mastite com evidências clínicas apresenta-se em níveis abaixo de 5%, podendo alcançar maiores taxas em determinadas situações (CONTRERAS et al. 2007).

Em pequenos ruminantes, principalmente cabras exploradas para a produção de leite, a mastite é um grande problema por aumentar os custos da produção e pelos riscos à saúde pública. A forma subclínica representa uma preocupação principalmente em regiões onde não se dispõe de pessoal e equipamentos especializados, uma vez que a grande quantidade de células epiteliais e partículas anucleadas presentes no leite interferem significativamente nos testes de rotina utilizados para sua detecção (SILVA et al., 2001).

Os principais microrganismos isolados de casos de mastite subclínica em caprinos no Brasil são os *Staphylococcus* spp. (LANGONI et al., 2006; ALMEIDA et al., 2013). Uma das principais características da mastite diz respeito à diversidade de agentes com potencial patogênico. Dentre estes, destacam-se os SCN, que para outras espécies animais são considerados patógenos menores. Têm-se ainda *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP), *Streptococcus* spp., bacilos gram positivos, *Mycoplasma* spp. e os agentes ambientais, como as enterobactérias (PEIXOTO et al., 2010; DAL POZZO et al., 2011).

Dentre as espécies de SCN prevalentes na espécie caprina, pesquisas demonstram maior ocorrência de *S. caprae*, enquanto que *S. epidermidis* está associada, na maioria das vezes, com elevadas CCS em cabras, não sendo o mesmo fato observado para o *S. caprae* (BERGONIER et al. 2003).

O isolamento de SCN geralmente está associado à ausência de sinais clínicos evidentes. Contudo, podem causar infecções persistentes, as quais resultam em maiores CCS, tendo como principal consequência à diminuição da qualidade do leite. Além disso, o surgimento da resistência antimicrobiana é mais comum entre as espécies de SCN, que também podem causar injúrias ao tecido mamário ocasionando queda da produção de leite (TAPONEN; PYÖRÄLÄ, 2009). Embora os SCN sejam considerados patógenos maiores da mastite em pequenos ruminantes,

os mecanismos de patogenicidade nos quadros subclínicos da enfermidade ainda são desconhecidos (CONTRERAS et al., 2007).

O *S. aureus* destaca-se como agente causador da mastite do tipo contagiosa, sendo seu tratamento difícil, devido à elevada resistência (FAGUNDES; OLIVEIRA, 2004). Esse microrganismo tem papel importante sob o ponto de vista de saúde pública, relacionado-se à toxinfecções alimentares em diversos países. A enterotoxina termoresistente produzida e liberada por esse agente ocasiona a intoxicação estafilocócica e constitui a causa mais frequente de surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) em muitos países. Os sintomas estão associados a náuseas, vômitos, dor abdominal e diarreia, além de dor de cabeça e queda da pressão arterial (BORGES et al., 2008). Vale salientar que essa toxina resiste ao processo de pasteurização por ser termorresistente (BORGES et al., 2008).

Espécies do gênero *Streptococcus* comumente isoladas de úberes infectados são *S. agalactiae*, *S. uberis* e *S. dysgalactiae* (SHEARER; HARRIS, 2003), e dentre os bacilos Gram negativos, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* são prevalentes (CONTRERAS et al., 2001), enquanto *Clostridium perfringens* é descrito na menor parte das ocorrências de mastite em pequenos ruminantes (RIBEIRO et al., 2007).

Outros microrganismos que podem ser encontrados causando mastite em cabras são o *Corynebacterium* spp e *Mycoplasma* spp. As principais espécies do gênero *Mycoplasma* comumente relacionadas com casos de mastite compreendem *M. agalactiae*, *M. mycoides* subsp. *capri*, *M. capricolum*, e *M. putrefaciens* (MADANAT et al., 2001; VILEI et al., 2006).

Para o controle da mastite caprina, é importante que exista um programa voltado para o diagnóstico e monitoramento constante da criação (CHAPAVAL; PIEKARSKI, 2000). Dentre as medidas que compõem um programa básico de controle de mastite merecem destaque: a identificação e o tratamento de todas as cabras no período seco; a identificação e o tratamento imediato dos casos clínicos; a manutenção e o funcionamento adequado do sistema de ordenha; o correto manejo da ordenha com ênfase na desinfecção dos tetos após a ordenha; a separação e o descarte de cabras com mastite crônica; e a correta higienização da área de permanência dos animais. (CHAPAVAL, 2008).

O diagnóstico da mastite é realizado utilizando alguns métodos, tais como: exame clínico, Califórnia Mastite Teste (CMT), CCS e exame microbiológico.

O exame clínico é realizado considerando-se os sinais clínicos, através da inspeção e palpação da glândula mamária, observação de aparecimento súbito de febre, perda de apetite, apatia, dispneia e relutância em se locomover, além das alterações visíveis no úbere, como vermelhidão e sensibilidade ao toque. Contudo, esse método não pode ser utilizado como única ferramenta, devendo estar associada à lactocultura (NUNES et al., 2008). Como a maioria das mastites caprinas é subclínica, ou seja, não é possível diagnosticá-la pelo exame clínico, há necessidade da realização de outros testes.

O CMT é um dos testes mais aplicados e práticos para o diagnóstico da mastite subclínica, devendo ser realizado antes da ordenha, logo após o descarte dos primeiros jatos de leite. Seu princípio baseia-se na estimativa da contagem de células somáticas do leite. Para tal, utiliza-se um detergente aniônico neutro que atua rompendo a membrana das células somáticas e libera o material genético, apresentando alta viscosidade. Há formação de um gel que tem a sua consistência graduada em escores aritméticos, sendo 0 a 3 para as reações negativas (sem reação entre o reagente e o leite), 1+ (fracamente positiva), 2+ (positiva) e 3+ (fortemente positiva). Sua desvantagem é estimar o conteúdo de células de forma subjetiva, o que exige do operador discernimento na leitura e interpretação dos resultados. (BRITO et al., 2009).

Devido à fisiologia da glândula mamária da espécie caprina e para evitar resultados falsos positivos, o CMT deve ser utilizado como teste de triagem. Dessa forma, outros testes diagnósticos, como o exame microbiológico, devem estar associados com o CMT para avaliar a saúde da glândula mamária (SILVA et al., 2001; BEZERRA et al., 2006).

Até recentemente, a identificação bacteriana se baseou principalmente nos demorados métodos fenotípicos convencionais, sistemas comerciais ou automatizados que frequentemente não distinguem a expressão variada de algumas características dos *Staphylococcus* e técnicas baseadas em sequenciamento de genes específicos, como a PCR (COUTO et al., 2001; KONTOS et al., 2003; CAIERÃO et al., 2010). Nos últimos anos o sistema baseado na ionização de material amostral co-cristalizado (composição proteica de células bacterianas)

conhecido como MALDI-TOF MS (*Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-light mass spectrometry*) tem emergido como uma rápida alternativa de identificação bacteriana (MURRAY, 2012). Os íons formados por feixes de laser curtos são acelerados e seu tempo de voo medido em um tubo de voo à vácuo, resultando em um espectro de massa bacteriano (CROXATTO et al., 2012). Contudo, o paradoxo entre o fato de que os sistemas automatizados podem não detectar pequenas diferenças nos SCN, discriminadas pela metodologia convencional, pode não ser solucionado ou atenuado por este sistema, pois seu princípio é baseado no perfil de proteínas específicas, bastante similar a um método de identificação molecular como o sequenciamento do rDNA 16S (SANTOS et al., 2012).

O exame microbiológico do leite é considerado o teste padrão ouro para o diagnóstico das infecções intramamárias, no entanto, a CCS constitui a base das técnicas de diagnóstico indireto das mastites em todas as espécies de ruminantes leiteiros (MOTA, 2008).

A CCS na secreção láctea é um método que tem sido muito utilizado nos últimos anos como referência da saúde do úbere e da qualidade microbiológica do leite caprino, sendo base para programas de sanidade de rebanhos e como fator para remuneração extra ao produtor que comercializa o leite caprino com baixa CCS. Esse exame pode ser realizado em equipamentos automatizados, tanto por contadores de partículas, quanto através de contadores baseados em citometria de fluxo, como o “Somacount” ou o “Fossomatic” (GOMES et al., 2004), possibilitando a análise de grande número de amostras e a redução do custo. A citometria de fluxo baseia-se no princípio da contagem de DNA do núcleo de células coradas, refletindo fluorescência em exposição a um raio laser (VIGUIER et al, 2009). Outro método de contagem é obtido pelo exame microscópico de lâminas coradas, mas é laborioso, caro, e não permite automação (BRITO et al., 2009).

O leite de cabra apresenta altos teores de células somáticas, ocasionada pela descamação do epitélio alveolar devido a processos fisiológicos. Essas células são encontradas no leite e se originam do sangue e da glândula mamária dos animais. A maioria destas células passa do sangue para a cisterna da glândula mamária em resposta a um estímulo e uma pequena proporção desprende-se da glândula à medida que envelhecem. Essas últimas são conhecidas como células epiteliais. As células que se originam do sangue, células brancas ou leucócitos, possuem a

capacidade de defender o animal de agressões externas, causadas por microrganismos, traumas e substâncias químicas (SOUZA et al., 2007).

As células somáticas presentes no leite compreendem as células epiteliais dos alvéolos (2 a 20% do total), sendo as demais (80 a 98%) conhecidas como células de defesa (leucócitos, principalmente neutrófilos, linfócitos e macrófagos). As células de defesa estão geralmente presentes em pequeno número, mas em presença de inflamação podem alcançar contagens de milhões/mL de leite. A taxa de mastite dos rebanhos pode ser estimada com base na CCS, de acordo com estudos realizados em vários países (BRITO et al., 2009).

A cabra se diferencia dos demais ruminantes domésticos em virtude de seu particular tipo de secreção láctea, predominantemente apócrina, nesse caso, ocorre desprendimento da porção distal das células epiteliais alveolares no lúmen sob a forma de partículas citoplasmáticas de tamanhos variáveis e com morfologia semelhante a leucócitos. Isso pode induzir a erros de interpretação durante a realização de técnicas de avaliação da celularidade do leite de animais dessa espécie (MADUREIRA et al., 2010). Essas partículas são anucleadas em sua maioria (PAAPE; CAPUCO, 1996) e correspondem a 35% dos elementos celulares observados no leite de cabras (SIERRA et al., 1999). Tais partículas estão ausentes no leite de vaca (GONZALO, 1995), o que aumenta aparentemente a concentração de leucócitos no leite de fêmeas caprinas, quando são utilizados os métodos tradicionais de contagens celulares para o leite de vacas (SILVA et al. 1996). Este fato salienta a importância da padronização e adoção de técnicas de contagens celulares específicas para caprinos.

Vários fatores podem influenciar a CCS, mas, especialmente a presença de infecções intramamárias, tornando-se um indicador bastante confiável de sanidade da glândula mamária. Porém, em cabras, a maior parte das variações da CCS (mais de 90%) não é devida a infecções intramamárias, sendo que os fatores que mais contribuem para a alteração da contagem, na ausência de infecção, são: estágio de lactação, mês do ano, manejo, número de partos, número de lactações de cada animal, produção de leite e principalmente pelo estado de infecção em que se encontra a glândula mamária (WILSON et al., 1995; MARTH; STEELE, 2001). Nas fases finais de lactação e nas fêmeas com maior número de parições, a CCS apresenta-se mais elevada (SOUZA et al., 2009; KOOP et al., 2011). Estudos estão

sendo realizados ao longo de anos para estabelecer um padrão de CCS em cabras não infectadas, porém muitos fatores interferem na interpretação dos resultados, como: número de lactações, estágio de lactação, época do ano, manejo e tipo de ordenha (ANDRADE, 2001).

A alta CCS no leite reduz a qualidade e o rendimento dos produtos lácteos, assim como a vida de prateleira. O aumento na CCS do leite está relacionado com alterações nos componentes do leite, como redução dos teores de lactose, gordura, caseína, cálcio e fósforo, aumento da albumina sérica e ácidos graxos livre de cadeia curta, e incremento da atividade proteolítica e lipolítica no leite. Além disso, possui atividade enzimática elevada, resultando em maior proteólise e lipólise, que são processos importantes de deterioração do leite cru durante o armazenamento. A lipólise é espontânea, quando causada por enzimas naturais no leite (lipases), ou induzida, quando causada por enzimas lipolíticas originadas de células somáticas ou bactérias (GARGOURI et al., 2013).

Apesar da importância da CCS no leite, a Instrução Normativa nº 37 de 31/10/2000 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) específica sobre leite de cabra, não estabelece um valor crítico determinante da CCS, sendo importante o estudo da determinação de valores médios que estabeleçam um parâmetro adequado (BRASIL, 2000). Observa-se que quando o número destas células no leite encontra-se elevado, o processo de filtragem e síntese é modificado, levando a alterações na composição, causando sérios prejuízos à indústria de laticínios (PIRISI et al., 2007). Além disso, a globalização dos mercados indica que medidas regulamentares neste sentido são iminentes. No entanto, para que essas medidas sejam adequadas e justas com o setor de caprinocultura leiteira, é necessário que estudos sobre o comportamento deste parâmetro em relação aos rebanhos nacionais sejam realizados para a determinação de limites que estimulem o setor a produzir matéria-prima de boa qualidade (MAGALHÃES, 2005).

Segundo Zeng (1996), não é rara a ocorrência de cabras com contagens superiores a 1.000.000 células/mL e, essas altas contagens acentuam-se ao final da lactação, mesmo com ausência de infecções intramamárias. Chapaval (2008) considera saudáveis valores menores que 1.000 CCS/mL, até 2.000 infecção fraca e acima de 1.500.000 como sinal de infecção. Neves et al. (2010), trabalhando com

cabras leiteiras no semiárido da Paraíba, verificou uma média de CCS em amostras positivas no exame microbiológico de  $1,49 \times 10^6$  células/mL. Porém, a CCS no leite de vacas livres de infecção intramamária é, em geral, inferior a 200.000 células/mL de leite e no leite de cabras não infectadas, inferior a 400.000 células/mL (NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 1999; ARCURI et al., 2004). Essas diferenças quanto aos valores de CCS ocorrem principalmente pela grande quantidade de componente apócrino na secreção do leite de cabras.

Trabalhos verificaram que a contagem de células somáticas aumenta com o avançar da lactação (GOMES et al., 2004). Esse fato também foi observado nas primeiras semanas pós-parto (PARK; HUMPHREY, 1986), mas houve diminuição da CCS durante o período de máxima produção de leite, voltando a aumentar até o final da lactação (MADUREIRA et al., 2010).

#### 2.4 QUALIDADE DO LEITE DE CABRA

O leite de cabra vem conquistando consumidores mundialmente por ser um alimento rico em vitaminas A e D e fósforo, possuir uma maior quantidade de cálcio e menos colesterol, além de apresentar partículas de gordura menores que o leite de vaca, propiciando melhor digestibilidade. Ainda é indicado na alimentação de pessoas alérgicas ao leite de vaca, por possuir pequenas quantidades de caseína, e não apresentar a  $\beta$ -lactoglobulina (CHAPAVAL; MAGALHÃES, 2009).

A qualidade do leite é necessária para o crescimento do mercado e produção de derivados, sendo estas condições definidas por parâmetros de composição química, características físico-químicas e higiene. A presença e os teores de proteína, gordura, lactose, sais minerais e vitaminas determinam a qualidade da composição que, por sua vez, é influenciada pela alimentação, manejo, genética e raça do animal. Fatores ligados a cada animal, como o período de lactação, o escore corporal ou situações de estresse também são importantes quanto à qualidade composicional (BRITO et al., 2009). Práticas adequadas de higiene, manipulação e manejo, desde a obtenção do leite até sua comercialização, são de fundamental importância para garantir qualidade e segurança alimentar ao mercado consumidor (MAGALHÃES, 2005).

Um dos parâmetros utilizados para avaliar a qualidade microbiológica do leite é a CBT (BAVA et al., 2009). O valor da CBT acima dos limites tolerados pela legislação é indicativo de deficiência na limpeza e higienização dos equipamentos de ordenha, do sistema de refrigeração, das tetas e também da presença de mastite. A CBT está relacionada com a composição do leite, principalmente nas concentrações de gordura, proteína, lactose e sólidos totais (BUENO et al., 2008), e que resultam em alterações nos produtos fabricados pela indústria. Em leites com elevada CBT, a fermentação da lactose por bactérias produz ácido láctico, causando a acidez, a qual ainda é um dos problemas enfrentados pelos laticínios. A produção de enzimas extracelulares, como lipases e proteases de origem microbiana, alteram o sabor e o odor, levando à perda de consistência na formação do coágulo para fabricação do queijo e à gelatinização do leite longa-vida (FONSECA; SANTOS, 2001).

Algumas causas prováveis de redução da qualidade do leite são as infecções intramamárias, os resíduos (cama, solo, esterco e barro) que ficam aderidos ao úbere, tetos e equipamento de ordenha (ARCURI et al., 2006) e as falhas no pré e pós-*dipping* associadas ao uso inadequado de desinfetantes (CAVALCANTI et al., 2010; LACERDA et al., 2010). Além dessas, a higienização inadequada das superfícies de contato e a temperatura inapropriada de resfriamento tornam os equipamentos de ordenha e resfriamento veiculadores de bactérias no leite, proporcionando ambiente favorável para a formação de biofilmes e aumento da CBT.

A avaliação das características físico-químicas do leite é de fundamental importância para verificar o seu estado de conservação, e conseqüentemente, a qualidade do leite. Também é utilizado para considerar a possibilidade da ocorrência de fraudes econômicas e estabelecer base para pagamento (AGNESE et al., 2002). Dentre as análises físico-químicas pode-se citar: densidade, gordura, acidez, crioscopia, extrato seco total (EST), extrato seco desengordurado (ESD), lactose, proteína, pH e condutividade.

De acordo com a IN37/2000, a densidade a 15°C do leite de cabra pode variar de 1.028 a 1.034 (BRASIL, 2000), podendo ser influenciada pela estação do ano, estado fisiológico e a raça do animal. A densidade é o peso específico do leite e o seu resultado depende da concentração de elementos em solução e da porcentagem de gordura. Esse teste é utilizado para detectar adulteração do leite,

uma vez que a adição de água causa diminuição da densidade, enquanto a retirada de gordura e a adição de amido resultam em aumento da densidade (FONSECA; SANTOS, 2007). Também pode ocorrer variação do seu valor de acordo com o tempo decorrido após a ordenha, pois quanto mais frio, maior a densidade. Esse processo acontece devido à solidificação da gordura, hidratação das proteínas e perdas de CO<sup>2</sup>. A homogeneização é outro fator que interfere nessa análise (FAGUNDES, 1997).

Existem causas de variações normais da densidade, não afetando a qualidade, como por exemplo, a composição do leite em relação ao teor de gordura, valor proteico e a temperatura no momento da determinação (AGNESE et al., 2002).

Alguns fatores como o estágio de lactação, fatores nutricionais e raça influenciam na concentração de gordura, sendo o constituinte do leite que possui maior variação. Contudo, a raça é um fator limitante, tanto que a legislação brasileira estabelece “teor original” de gordura para o leite de cabra integral, no entanto são admitidos valores inferiores a 2,9% mediante comprovação de que o teor médio de gordura de um determinado rebanho não atinge esse nível (BRASIL, 2000; OLIVEIRA et al., 2005). Pesquisas demonstram que os teores de gordura e proteína são os principais constituintes que sofrem influência do perfil racial. Ferreira e Queiroga (2003) trabalhando com quatro genótipos (Anglo Nubiano, Parda Alpina, British Alpine e Saanen) encontraram valores médios de gordura, proteínas, sólidos totais e minerais onde estes sofreram influência significativa com as raças estudadas, o que não aconteceu com os teores de lactose sendo a raça Anglo Nubiana a que apresentou os maiores valores.

Segundo Siqueira (2007), o tipo de alimentação talvez seja um dos principais fatores que influenciam a quantidade de gordura, pois o consumo adequado de volumoso também garante um teor normal de gordura no leite, uma vez que com a fermentação da fibra no rúmen são produzidos os ácidos acético e butírico, dos quais é formado no úbere 50 % da gordura no leite.

A acidez do leite deve-se à presença de caseínas, fosfatos, albumina, dióxido de carbono e citratos (PEREIRA et al., 2001). A IN-37/2000 estabelece para o leite de cabra valores mínimos e máximos de 13 e 18<sup>o</sup>D (°Dornic), respectivamente (BRASIL, 2000). No momento da ordenha, a acidez pode oscilar entre 12 e 14<sup>o</sup>D, podendo variar em função do período de lactação (LUQUET, 1991). Jenness (1980)

ressalva que o leite de cabras apresenta-se mais ácido que o de vaca, devido às diferenças entre os grupos carboxílicos das duas espécies, podendo o leite de cabra variar de 11 a 18<sup>o</sup>D. Segundo Queiroga (2004), este índice também é utilizado como indicador do estado de conservação do leite em função da relação entre disponibilidade de lactose e produção de ácido láctico por ação microbiana que acarreta no aumento da acidez e diminuição no teor de lactose.

A crioscopia indica a temperatura de congelamento do leite. Essa medição do ponto de congelamento é usada como forma de detectar fraude por adição de água. O ponto de congelamento é determinado, principalmente, pelos elementos solúveis do leite, em especial a lactose e os minerais. (SANTOS; FONSECA, 2007). O leite de cabra pode apresentar ponto de congelamento entre -0,550 °H a -0,585 °H (Hortvet) (BRASIL, 2000).

O índice crioscópico, portanto, representa um importante atributo qualitativo do leite “in natura” e um determinador da autenticidade do leite de consumo. A água, além de diluir os componentes naturais do leite, pode representar grande risco de contaminação do mesmo, segundo as condições em que foi obtida para a adição. O ponto de congelamento do leite é uma propriedade física que apresenta pequenas variações de acordo com o período de lactação, estação do ano, clima, alimentação, raça animal, doenças dos animais e processos de pasteurização (lenta ou rápida) ou esterilização e UHT, estado de conservação da matéria-prima, entre outros (TRONCO, 1997).

O EST é representado pela gordura, açúcar, proteínas e sais minerais, sendo um parâmetro estratégico do ponto de vista produtivo, uma vez que apresenta influência direta sobre o rendimento dos produtos derivados lácteos (COSTA et al., 2008). Os teores de EST não foram estabelecidos pela legislação brasileira para o leite caprino. O ESD no leite de cabra deve ser no mínimo de 8,2% (BRASIL, 2000).

Queiroga et al. (2007) verificaram que com o avanço do período de lactação, ocorre naturalmente diminuição na quantidade de leite produzido, o que possibilita o aumento relativo de constituintes como gordura e proteína. Isso pode ser justificado em parte pelo efeito da diluição, uma vez que o teor total de sólidos varia em função do volume diário de leite produzido.

O teor de lactose é influenciado pelos diferentes níveis de concentrado da dieta, estando diretamente relacionado à regulação da pressão osmótica, de modo

que maior produção de lactose determina maior produção de leite (QUEIROGA et al., 2007). A lactose é considerada o componente mais lábil diante da ação microbiana, pois é um bom substrato para as bactérias, que a transformam em ácido láctico, acidificando o leite (ORDÓÑEZ, 2005). É o constituinte sólido predominante e menos variável (FONSECA & SANTOS, 2007). A quantidade de lactose no leite de cabra deve ser no mínimo de 4,3% (BRASIL, 2000).

Assim como a gordura, o teor protéico varia com a espécie, e é influenciado por raça, estágio de lactação, alimentação, clima, número de partos, época do ano, e estado de saúde do úbere (MENDES et al., 2009). A quantidade de proteína total do leite de cabra deve ser no mínimo de 2,8% (BRASIL, 2000).

Acerca do pH, o leite proveniente de animais com mastite apresentam comportamento alcalino. Park et al. (2007), descreveram que dentre as características físico-químicas do leite, as alterações mais pronunciadas durante a mastite ocorrem em termos de pH e condutividade elétrica. A condutividade elétrica apresenta-se aumentada no leite oriundo de animais com mastite em função da elevação na concentração de íons Na e Cl. (PEREIRA et al., 2001; FONSECA; SANTOS, 2007).

A qualidade do leite produzido no Brasil merece atenção por parte de toda a cadeia produtiva do leite, pois ainda apresenta problemas como alta CBT, alta CCS e baixos teores de sólidos. A demanda por produtos de origem animal de qualidade torna-se cada vez mais visada pelo mercado consumidor gerando a busca pela produção e processamento de alimentos mais elaborados e com certificação de qualidade garantida. Tal fato não é diferente para o leite caprino, o qual necessita da aplicação de métodos de produção e beneficiamento diferenciados para que sejam oferecidos produtos de qualidade ao consumidor (RAYNAL-LJUTOVAC et al., 2008).

## 2.5 RESISTÊNCIA DE *STAPHYLOCOCCUS* SPP. A BETA-LACTÂMICOS

Embora mais de 100 espécies de microrganismos tenham sido descritos em processos infecciosos da glândula mamária de animais, o gênero *Staphylococcus* é considerado o principal agente causal de mastite em animais de produção (QUINN et al., 2005; TAPONEN; PYÖRÄLÄ, 2009) e assume grande preocupação pelos profissionais de saúde em virtude da emergência de microrganismos resistentes

aos antimicrobiano, dentre os quais se destaca *S. aureus* resistente à metilina (MRSA - Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) (RICH et al., 2005).

A importância de *S. aureus* metilina ou oxacilina resistente aumentou a partir da década de 80, sendo considerado, atualmente, o maior problema clínico e epidemiológico em infecções hospitalares (PERESI et al., 2006). Segundo Chambers (2001), a metilina foi preterida para uso em testes laboratoriais de resistência porque a oxacilina é mais estável ao armazenamento e melhor para identificar as cepas heterorresistentes, embora se mantenha o termo MRSA por razões históricas.

Diversos estudos que abordaram a suscetibilidade a antimicrobianos de patógenos da mastite caprina no Brasil apontam para um aumento crescente no padrão de resistência, principalmente aos beta-lactâmicos no tratamento das infecções estafilocócicas (LANGONI et al., 2006; GARINO JÚNIOR et al. 2011; FRANÇA et al., 2012, SALINA et al., 2015). A resistência bacteriana pode ser transferida por diversos mecanismos, podendo estabelecer-se de modo intra e interespecífico, entre microrganismos saprófitas e patogênicos, como também da microbiota animal para humana e vice-versa (AARESTRUP et al., 2001). O conhecimento de padrões de resistência aos antimicrobianos é fundamental para o desenvolvimento de métodos preventivos efetivos para o controle da doença e para a elaboração de estratégias de tratamento quando necessário (SABOUR et al., 2004).

Garino Júnior et al. (2011) verificaram que amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas de mastite caprina no semiárido paraibano apresentaram maiores índices de resistência à penicilina e à ampicilina (66,67% e 63,89%, respectivamente). Em um estudo realizado no Sudeste do Brasil, Almeida et al. (2013) obtiveram índices de resistência para os mesmo antimicrobianos de 56% para SCN. A elevada prevalência de amostras com resistência à penicilina e à ampicilina, pode estar associado ao uso frequente ou mesmo subdosagens desses beta-lactâmicos na terapia da mastite e de outras enfermidades no rebanho, evidenciando a incidência de estirpes resistentes a esse antimicrobiano.

A resistência estafilocócica aos antimicrobianos beta-lactâmicos deve-se principalmente a dois mecanismos: a produção da enzima extracelular beta-lactamase, codificada pelo gene *blaZ*, e a produção de PBP2a ou PBP2', uma

proteína modificada ligante de penicilina de baixa afinidade, codificada pelo gene *mecA*. O gene *blaZ* geralmente está alocado em plasmídeos, podendo também ser cromossomal, conferindo uma resistência constitutiva ou regulada pela presença do antimicrobiano, através de dois genes adjacentes, *blaI* e *blaR1*, onde o primeiro é um repressor da transcrição de *blaZ*, e o segundo, um anti-repressor (KURODA et al., 2001; LOWY, 2003). O gene *mecA* foi clonado e sequenciado pela primeira vez em 1987 (ITO et al., 2001) e está amplamente distribuído entre cepas de *Staphylococcus* coagulase positivos e negativos. Sua expressão é constitutiva ou induzida por antimicrobiano beta-lactâmicos, como a oxacilina e cefoxitina (LOWY, 2003). O gene *mecA* está inserido no cromossomo estafilocócico através de um elemento genético móvel, denominado cassete estafilocócico cromossômico *mec* (SCC*mec*). O SCC*mec* é composto por diversos elementos genéticos essenciais: o complexo *mec*, composto pela ilha de patogenicidade *IS431*, os genes *mecA* e seus reguladores *mecI* e *mecR1*, e o complexo *ccr* (Cassete Chromosome Recombinases), caracterizado pela presença de genes que codificam recombinases. Em todos os tipos de SCC*mec*, a sequência do gene *mecA* é altamente conservada em cepas de *Staphylococcus aureus* e SCN (WELLER 2000, MA et al. 2002). Hiramatsu et al. (2001) identificaram o elemento regulador *mecR1-mecI*, que tem atividade repressora e anti-repressora, respectivamente, sobre o gene *mecA*.

Entretanto, a expressão fenotípica da resistência à oxacilina é extremamente variável e dependente da expressão do gene *mecA*. Essa variabilidade é reconhecida como heterorresistência fenotípica, e se caracteriza pelo fato de que toda população bacteriana heterogeneamente resistente, assim como todas as células, carregam o gene *mecA*, marcador genotípico da resistência, porém nem todas expressam fenotipicamente sua resistência da mesma forma (CAUWELIER et al., 2004). Um fenótipo menos frequente é a resistência homogênea, onde toda a população de células é altamente resistente. Os mecanismos reguladores da expressão da resistência são complexos e ainda não totalmente conhecidos (MARANGONI, 1997).

O CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI, 2008), padronizou o uso do disco de cefoxitina, uma cefalosporina de segunda geração, para detecção do gene *mecA* por ser um forte indutor de seu sistema regulatório.

Estudos têm relatado maior eficácia em testes de difusão em disco com cefoxitina correlacionado com a presença do gene *mecA*, em relação ao uso da oxacilina (DANCER, 2001). A cefoxitina induz a produção de PBP2a e têm provavelmente uma afinidade elevada para PBP2 estafilocócica (MURAKAMI et al; 1991).

Em consequência a esses fatores, trabalhos de pesquisas reportaram a dificuldade na avaliação do perfil de suscetibilidade de *S. aureus* à oxacilina. Historicamente, os isolados eram distinguidos através de métodos fenotípicos, incluindo testes de suscetibilidade a antimicrobianos e fagotipagem. Ambos os métodos possuem limitações, como isolados não relatados geneticamente que comumente apresentavam o mesmo perfil de suscetibilidade e, muitos *S. aureus* que não eram identificados pela fagotipagem (THORNSBERRY; MCDUGAL, 1983). A técnica da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) tem ganhado destaque, baseada na informação da sequência de DNA, para detecção de cepas de MRSA através dos genes de resistência (MURAKAMI et al., 1991). O método de PCR apresenta alta sensibilidade e especificidade além de ser independente das condições físicas e químicas das culturas bacterianas.

Em trabalho realizado com pequenos ruminantes no Brasil, França et al. (2012) relataram que 15,8% dos isolados de *Staphylococcus* spp. provenientes de mastite caprina subclínica apresentaram resistência fenotípica a oxacilina, mas nenhum foi positivo para o gene *mecA* (Murakami). Entretanto, 40,2% desses mesmos isolados continham o gene *blaZ*. Peixoto et al. (2013) detectaram a resistência à oxacilina no teste de difusão em discos em 54,5% isolados de *Staphylococcus* spp. oriundos de leite caprino de animais com mastite subclínica no Estado da Bahia. Porém, nenhuma amplificação do gene *mecA* foi observada nos isolados. Nesse mesmo trabalho, 33,3% isolados foram positivos para o gene *blaZ*, sendo que quatro desses foram resistentes aos beta-lactâmicos testados. Estudos que investigam a caracterização fenogenotípica da resistência antimicrobiana em isolados de *Staphylococcus* spp. de mastite caprina são escassos, entretanto esse assunto é vastamente pesquisado nas mastites bovinas.

A grande diversidade dos agentes responsáveis pela mastite caprina e a crescente resistência antimicrobiana dos microrganismos isolados de infecções mamárias alertam para a necessidade da instituição de protocolos terapêuticos respaldados em testes de susceptibilidade microbiana *in vitro* (DE LA CRUZ et al.,

1994). Além disso, a realização do diagnóstico precoce das mastites em caprinos e seu tratamento baseado no perfil de sensibilidade microbiana aumentam a possibilidade de êxito no tratamento de mastites, evitando-se a ocorrência de casos crônicos e a seleção de microrganismos multirresistentes.

## 2.6 RESÍDUO ANTIMICROBIANO EM LEITE

É crescente a preocupação da sociedade mundial com a qualidade e a segurança alimentar. O interesse da população por produtos mais seguros têm como consequência cuidados mais rigorosos por parte das indústrias de processamento de alimentos. Para tanto o setor industrial está direcionando seus esforços nas etapas de produção. Devido a gama de riscos que o alimento está exposto até chegar ao consumidor, as indústrias estão trabalhando para minimizar estes perigos.

Segundo o IBGE, o rebanho nacional de caprinos em 2014 foi estimado em mais de 8 milhões de cabeças. O leite caprino tem sido recomendado para crianças, pessoas idosas e convalescentes, devido ao alto valor nutricional, boa digestibilidade e baixo potencial alergênico. Estas recomendações evidenciam a necessidade de um monitoramento dos resíduos de antimicrobianos, assim como o desenvolvimento de métodos eficazes para a determinação deste resíduo na matriz.

Uma das medidas de fortalecimento da cadeia produtiva leiteira corresponde ao monitoramento da qualidade do leite produzido e a pesquisa de resíduos de antimicrobianos no leite representa uma das ferramentas utilizadas, pois a presença desses inibidores bacterianos resulta em uma grande preocupação tanto para a indústria por provocar prejuízos econômicos, como para a saúde pública, pelo risco de provocar reações alérgicas, choques anafiláticos, má formação fetal, além da indução à resistência bacteriana (BRASIL, 1991/1992).

O processo de globalização e a participação do Brasil em blocos econômicos internacionais trazem a necessidade de o país cumprir com as exigências de qualidade dos mercados e respeitar diversos órgãos de fiscalização. Assim o MAPA, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e demais organizações estaduais e municipais têm um papel social muito importante na segurança alimentar. O MAPA, através do RIISPOA (Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal), regulamentado pelo Decreto nº 30.691 de

29 de março de 1952, que propõe as diretrizes para as normas de inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal, onde se inclui o leite. Com base no RIISPOA, os estabelecimentos industriais são responsáveis pela qualidade do produto, o que envolve toda a cadeia produtiva, desde a chegada da matéria-prima (leite) proveniente dos produtores rurais, passando pelo transporte, pelo processamento tecnológico, pelas boas práticas de fabricação no laticínio e pela expedição do produto acabado. Quando o produto segue as orientações e as exigências do RIISPOA, assim os parâmetros de qualidade estabelecidos pelo MAPA e pela ANVISA pode-se dizer que terá sua qualidade garantida (BRASIL, 1952).

Estes parâmetros de qualidade são definidos por normas específicas para o leite, assim a IN nº 62 de 29 de dezembro de 2011 do MAPA aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel, aplicável somente ao leite de vaca. Nesta legislação há o detalhamento sobre as avaliações da matéria-prima como Contagem Padrão em Placas, Contagem de Células Somáticas, Pesquisa de Resíduos de Antibióticos, Determinação do Índice Crioscópico, Determinação do Teor de Sólidos Totais e Não-Gordurosos, Determinação da Densidade Relativa, Determinação da Acidez Titulável, Determinação do Teor de Gordura e Medição da Temperatura do Leite Cru Refrigerado os quais são parâmetros de qualidade para o leite, esta mesma Instrução Normativa traz a periodicidade que estas análises devem ser realizadas para que se tenha um padrão de qualidade de forma contínua (BRASIL, 2011). Corroborando com a qualidade para os produtos de origem animal, o MAPA define os métodos analíticos oficiais físico-químicos, para o controle de leite e produtos lácteos através da IN nº 68, de 12 de dezembro de 2006 e determina que as análises sejam realizadas em laboratórios credenciados, padronizando assim as condições de avaliação do leite (BRASIL, 2006).

Como essa preocupação com alimentos seguros e de qualidade preservada vem crescendo nos dias atuais, a ANVISA atua colaborando com as ações do MAPA através do Programa de Análises de Resíduos de Medicamentos Veterinários em

Alimentos de Origem Animal (PAMVET). Este programa, de âmbito nacional, realiza o monitoramento de resíduos químicos no leite exposto ao consumo humano, com objetivo que avaliar o risco do uso de medicamentos veterinários (antimicrobianos e antiparasitários) em animais produtores de alimentos (ANVISA, 2009). Desta forma o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC), ferramenta do MAPA no Gerenciamento de Risco, e o PAMVET, instrumento da ANVISA, vão ao encontro da qualidade e segurança para a produção dos alimentos, especialmente de origem animal. Apesar de toda essa atividade conjunta entre MAPA e ANVISA para coibir a produção e a comercialização de alimentos impróprios para o consumo, há uma tolerância quanto à presença de resíduos de antimicrobianos nos alimentos. Desta forma há a definição dos Limites Máximos de Resíduos (LMR), do Ministério da Saúde através da ANVISA (BRASIL, 2003), harmonizados pelo Mercosul (Mercado Comum do Sul). O LMR é a concentração máxima de resíduos resultante da utilização de um medicamento veterinário, que pode ser expresso em mg/kg, mg/mL, µg/kg ou µg/L de alimento, que se pode aceitar. Este limite baseia-se no tipo e quantidade de resíduos que não apresentam risco de toxicidade para a saúde do homem, considerando-se a Ingestão Diária Aceitável. Para aqueles medicamentos veterinários cujos valores de LMR não estão estabelecidos no Mercosul, utilizaram-se os valores preconizados pelo *Codex Alimentarius* e na ausência destes, aqueles estabelecidos pela União Européia (ANVISA, 2009).

As organizações internacionais envolvidas com a saúde pública, como o Comitê para Aditivos Alimentares da FAO/WHO (JECFA) e o FDA dos Estados Unidos, estabelecem as diretrizes para o LMR ou Limite de Tolerância definidos como a concentração máxima de resíduo resultante do uso de um medicamento veterinário, expresso em parte por milhão (ppm) ou parte por bilhão (ppb), que é legalmente permitido, ou reconhecido, como aceitável no alimento e é estabelecido para cada antimicrobiano e sulfonamida aprovados para uso em animal produtor de alimento, sendo o valor de limite máximo de resíduo correlacionável à Ingestão Diária Aceitável obtida a partir de ensaios de experimentação animal avaliando-se a toxicidade, teratogenicidade, e carcinogenicidade desses aditivos não intencionais (MITCHELL et al., 1998).

O controle de resíduos de medicamentos veterinários, portanto, representa uma importante medida para assegurar proteção ao consumidor. No Brasil, a

Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011, do MAPA, exige a pesquisa periódica de resíduos de antibióticos em leite, que não devem ser superiores aos Limites Máximos de Resíduos (LMRs) previstos para cada grupo químico específico. De acordo com a Lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999, é atribuição da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) a regulamentação, o controle e a fiscalização de alimentos, no que se refere a limites de resíduos de medicamentos veterinários. Os LMRs de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal harmonizados no âmbito do Mercado Comum do Sul (MERCOSUL) pela Resolução Grupo Mercado Comum (GMC) nº 54, de 29 de setembro de 2000, foram internalizados no Brasil pelo MAPA através da Instrução Normativa nº 12, de 10 de abril de 2001. Estas legislações citam que no caso de substâncias proibidas ou não autorizadas, uma vez que não é possível estabelecer os LMRs, são adotados níveis de ação, baseados no estado da arte das metodologias analíticas empregadas para a avaliação da conformidade dos produtos.

Existem vários métodos de análises utilizados na detecção e/ou quantificação de resíduos e contaminantes em alimentos, que podem ser divididos em métodos de triagem e de confirmação. Os métodos de triagem podem detectar a presença da substância ou classe de substâncias no nível de interesse e incluem principalmente os bioensaios, enquanto os métodos de confirmação proporcionam informações completas ou complementares para identificação e, se necessário, quantificação do analito. A técnica mais utilizada visando à segunda alternativa é a cromatografia líquida de alta eficiência (SHENCK; CALLERY, 1998).

Os métodos para detecção de resíduos de antimicrobianos em alimentos baseiam-se em três princípios básicos: o efeito direto em um microrganismo teste; o reconhecimento da forma tridimensional molecular, utilizado em técnicas imunológicas e o uso das características físico-químicas dos antimicrobianos, que fundamentam técnicas cromatográficas e/ou espectrométricas (PETZ, 1996). Dentre as desvantagens das técnicas microbiológicas, destacam-se: baixa seletividade na identificação do antimicrobiano; restritos limites de detecção para muitos compostos; demora na obtenção dos resultados e incidência de resultados falsos positivos (MARTIN et al., 1996; NEUBAUER, 1998; MCINTOSH et al., 2002). Já as técnicas imunológicas não são seletivas o bastante para a identificação inequívoca de um composto, necessitando métodos físico-químicos de confirmação. Entretanto,

permitem que muitas amostras sejam analisadas em pouco tempo (PETZ, 1996; THACKER et al., 1996). Os métodos físico-químicos, como os que empregam a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), possuem maior sensibilidade para detectar resíduos de antimicrobianos em alimentos de origem animal (FLETOURIS et al., 1992; CARSON, 1993). Estes métodos requerem sempre algum tipo de extração e, ou, desproteção prévia, dependendo da matriz e resíduo a ser pesquisado, além de instrumentação complexa e pessoal treinado (MINEO et al., 1992; MOATS et al., 1995; BOISON; KENG, 1998). No entanto, a capacidade desses métodos em identificar seletivamente e quantificar níveis de resíduos na ordem de ng/mL ou ng/g tem garantido seu uso, principalmente para a confirmação de amostras positivas em métodos de triagem (MOATS et al., 1995; MITCHEL et al., 1998).

A cromatografia líquida também é conhecida como “afinidade cromatográfica”, e está rapidamente se tornando o método de separação escolhido por áreas tais como a ciência farmacêutica e a da biotecnologia. De acordo com a *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) a cromatografia líquida atua por meio de “interação biológica”, sendo capaz de separar e analisar analíticos específicos dentro de uma amostra (COLINS et al., 1997). No Brasil, os métodos oficiais para determinação de resíduos de antimicrobianos em leite são os métodos físico-químicos de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), que são mais precisos, porém têm custo mais elevado, são mais demorados e necessitam de equipamentos especializados e pessoal treinado. Esses testes devem ser realizados por laboratórios credenciados pelo MAPA como os Laboratórios de Referência Animal (Laboratório Nacional Agropecuário - LANAGRO) localizados em diversos estados do país.

Em uma recente revisão sobre resíduos de antimicrobianos nos leites de vaca comercializados no Brasil, Trombete et al. (2014) compilaram dados dos últimos anos de publicações. O trabalho trouxe resultados de pesquisas realizadas na última década os quais, em sua grande maioria 86,6%, foram avaliações qualitativas quanto à presença de antimicrobianos em leite cru, leite pasteurizado e leite UHT. Os trabalhos listados na revisão trouxeram resultados positivos em todos os estudos, variando entre 0,66% e 65,0% a quantidade de amostras positivas por estudo. Cada trabalho realizado teve suas características individuais quanto ao

método utilizado, mas apenas 13,3% das análises utilizou a técnica de cromatografia para quantificar os analitos em estudo. Apesar das poucas análises quantitativas, àquelas que foram realizadas utilizaram-se da CLAE com arranjo de diodos. Apesar de ser uma técnica bem específica, o custo elevado da cromatografia inviabiliza o seu uso na rotina do controle de qualidade de alimentos para pesquisa de antimicrobianos nos laboratórios.

Em trabalho realizado por Brandão et al. (2015) na Bahia para pesquisa de resíduo antimicrobiano em leite caprino pela técnica microbiológica foi detectado 46,6% das amostras positivas para resíduo acima dos limites máximos de resíduo. Nardelli (2008), pesquisando a presença de resíduos no leite de cabra no nordeste brasileiro, pela técnica qualitativa “Delvoteste SP”, detectou resíduos antimicrobianos em 14,16% do leite. Santos (2005), avaliou pelo teste enzimático, 60 amostras de leite de cabra obtidas de seis mini-usinas do Cariri Paraibano, destas 31,6% apresentaram-se positivas para antimicrobiano do grupo beta-lactâmicos. Silva et al., (2005) pesquisou pelo mesmo método do trabalho anterior, resíduo de antibiótico do grupo beta-lactâmicos na região do Cariri paraibano e observou que 17,70% das amostras continha resíduo de antimicrobiano.

Com base em outras pesquisas realizadas em diversas regiões do Brasil, e até em territórios internacionais, a qualidade do leite ainda é inferior ao preconizado pelos órgãos regulatórios. Desta forma, é de grande interesse da sociedade que se aperfeiçoem e se fortaleçam os programas de controle e garantia da qualidade para que se possam produzir e comercializar produtos de excelência. No Brasil, o programa de monitoramento de resíduos no leite não engloba a espécie caprina. Devido a grande importância social, sanitária e econômica, a qualidade química do leite deve ser monitorada e a implantação desse tipo de programa englobando o leite caprino é de suma importância. Além disso, deve haver concomitantemente, campanhas para educação dos produtores e funcionários, como também, capacitação técnica para a produção de um leite de cabra de qualidade e seguro ao consumidor.

### 3 DESENVOLVIMENTO

#### 3.1 MASTITE POR CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS E ISOLAMENTO BACTERIANO EM CABRAS NEGATIVAS PARA *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Trabalho aceito na Revista Brasileira de Medicina Veterinária

Mastite por Contagem de Células Somáticas e Isolamento Bacteriano em cabras negativas para *Staphylococcus aureus*

Camila Serva Pereira <sup>1+</sup>, Lídia Maria Marques dos Santos <sup>2</sup>, Juliana Ferreira de Almeida <sup>3</sup>, Virginia Léo de Almeida Pereira <sup>3</sup>, Elmiro Rosendo do Nascimento <sup>3</sup>

**ABSTRACT.** Pereira C.S., Santos L.M.M., Almeida J.F., Pereira V.L.A. & Nascimento E.R. [**Mastitis Detected Through Somatic Cell Count and Bacterial isolation in negative goats for *Staphylococcus aureus***] Mastite por Contagem de Células Somáticas e Isolamento Bacteriano em cabras negativas para *Staphylococcus aureus*. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 00(0):00-00, 2000. Programa de Pós-Graduação em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de P.O.A., Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense (UFF), Rua Vital Brasil Filho, 64, Vital Brazil, Niterói, RJ, 24.230-340, Brasil. Email: [camilaserva2@gmail.com](mailto:camilaserva2@gmail.com).

A subclinical mastitis study was conducted in nine dairy goat herds in the Rio de Janeiro state to determine the occurrence of infection, detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction, evaluate microbiological and cellular profiles of the milk and associate the influence of somatic cell count (SCC) to bacterial isolation. A total of 133 raw milk sample were collected for microbiological culture, *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction and SCC. There was bacterial growth in 64 samples (48%), among those 10 obtained isolation of two microorganisms associated. Seventy-seven isolates were found distributed in the following way: 45 (58,4%) coagulase-negative *Staphylococcus*, 9 (11,58%) coagulase-positive *Staphylococcus* e gram negative bacilli of the Enterobacteriaceae family, 5 (6,49%) *Bacillus* spp., 4 (5,19%) *Streptococcus* spp., 3 (3,89%) *Enterococcus* spp. e 1 (1,29%) *E. coli* e *Serratia* sp. The association of coagulase-negative *Staphylococcus* and Gram negative Bacilli had the largest number, with 50%, followed by 20% coagulase positive *Staphylococcus* + *Enterococcus* sp. and 10% coagulase-negative *Staphylococcus* + *Bacillus* spp., *Streptococcus* spp. + *Bacillus* spp. and *Streptococcus* spp. + Gram Negative Bacilli.

No milk sample obtained positive for *Staphylococcus aureus* in culture and PCR. Mean SCC was 2.152.000 cells/mL of milk. There was no significant association between bacterial isolation and the values obtained in somatic cell count (t-Student  $p > 0,05$ ). Statistical difference was observed in SCC average of the properties studied ( $p < 0,05$ ). We conclude that Coagulase Negative Staphylococcus was isolated bacterial group with greater frequency and SCC does not correlate with the results of bacterial isolation and must be carefully evaluated in studies of subclinical mastitis in goats.

**KEYWORDS:** Goat milk, mastitis, microbiological, somatic cell count.

**RESUMO.** Foi realizado um estudo da mastite subclínica em nove rebanhos de cabras leiteiras localizadas no Estado do Rio de Janeiro com o objetivo de investigar a ocorrência da infecção, detecção de *Staphylococcus aureus* pela reação em cadeia da polimerase, avaliar o perfil microbiológico e celular do leite e associar a influência da contagem de células somáticas (CCS) ao isolamento bacteriano. Foram coletadas 133 amostras de leite de cabra *in natura* para a realização da análise bacteriológica, Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para *Staphylococcus aureus* e CCS. Houve crescimento bacteriano em 64 amostras (48%), dentre essas 10 obtiveram isolamento de dois microrganismos associados. Dos 77 isolados encontrados, 45 (58,4%) foram identificados como *Staphylococcus* coagulase negativa, 9 (11,58%) *Staphylococcus* Coagulase Positiva e bastonetes gram negativos da família das enterobactérias, 5 (6,49%) *Bacillus* spp., 4 (5,19%) *Streptococcus* spp., 3 (3,89%) *Enterococcus* spp. e 1 (1,29%) *E. coli* e *Serratia* sp. A associação de *Staphylococcus* Coagulase Negativa e Bastonete Gram Negativo apresentou o maior número, com 50%, seguido de 20% *Staphylococcus* Coagulase Positiva + *Enterococcus* sp. e 10% *Staphylococcus* Coagulase Negativa + *Bacillus* spp., *Streptococcus* spp. + *Bacillus* spp. e *Streptococcus* spp. + Bastonete Gram Negativo. Nenhuma amostra de leite obteve positividade para *Staphylococcus aureus* no cultivo e na PCR. A média de CCS foi de 2.152.000 células/mL. Não houve associação significativa entre o isolamento bacteriano e os valores obtidos na contagem de células somáticas (t-Student  $p > 0,05$ ). Foi observada diferença estatística na média de CCS entre as propriedades estudadas ( $p < 0,05$ ). Concluí-se que o *Staphylococcus* Coagulase Negativa foi o grupo bacteriano isolado com maior frequência e a CCS não se correlaciona com os resultados do isolamento bacteriano, devendo ser avaliada com cautela em estudos sobre mastite subclínica em cabras.

**PALAVRAS-CHAVE:** Leite de cabra, mastite, microbiológico, contagem de células somáticas.

## INTRODUÇÃO

A caprinocultura leiteira representa atividade de elevado impacto sócio-econômico para produtores rurais. Além disso, o leite de cabra tem sido bastante utilizado como alternativa para alimentação de crianças e adultos sensíveis ou alérgicos ao leite de vaca. Tradicionalmente, a criação de caprinos é característica das

regiões Nordeste e Sudeste do país. Apesar de a região sudeste dispor de apenas 4% do efetivo caprino no Brasil, destaca-se pela representatividade de seus estados no agronegócio caprino leiteiro. (Borges 2006).

A mastite definida como inflamação da glândula mamária (Silva & Silva 1987), determina alterações físicas, químicas, microbiológicas e na celularidade do leite, bem como leva a efeitos patológicos no tecido glandular. (Megersa et al. 2010; Mungatana et al. 2011). Essa doença acarreta grandes perdas econômicas ao segmento leiteiro, seja pela redução da quantidade, como também pelo comprometimento da qualidade do leite produzido.

Embora a mastite clínica seja responsável por perdas expressivas em pequenos ruminantes, a mastite subclínica assume elevada relevância econômica em decorrência dos prejuízos na produção e da alta ocorrência. Levantamentos de pesquisa demonstram que nos rebanhos de pequenos ruminantes a mastite é predominantemente do tipo subclínica, cuja prevalência estimada está entre 5-30% (Contreras et al. 2007). Os *Staphylococcus* coagulase negativa são considerados os principais microrganismos envolvidos nesse tipo de infecção intramamária (Bergonier et al. 2003, Aulrich & Barth 2008, Neves et al. 2010, Almeida 2013). Os outros patógenos também relacionados a esse quadro são: os *Staphylococcus* coagulase positiva, *Streptococcus* spp., *Mycoplasma* spp. e os agentes ambientais, como as enterobactérias (Peixoto et al. 2010; Dal Pozzo et al. 2011).

A contagem de células somáticas é um dos parâmetros utilizados para avaliar o estado de infecção da glândula mamária e a qualidade do leite produzido (Aulrich & Barth 2008). No Brasil, não há limites máximos oficiais exigidos para a CCS no leite caprino, sugerindo-se que valores de CCS acima de 1.000.000 células/mL de leite sirvam de critério para a realização de exames microbiológicos (Paes et al. 2003).

O objetivo desse estudo foi investigar a ocorrência de patógenos causadores de mastite, detecção de *Staphylococcus aureus* pela reação em cadeia da polimerase e associar a influência da contagem de células somáticas ao isolamento bacteriano oriundo de rebanhos caprinos localizados no Estado do Rio de Janeiro.

## MATERIAL E MÉTODO

Foram coletados leite de 133 cabras das raças Saanen e Parda alpina em diferentes estágios de lactação de nove rebanhos leiteiros, identificados de A a I, localizados nos seguintes municípios do Estado do Rio de Janeiro: Seropédica, Niterói, Friburgo, Teresópolis, Paraíba do Sul, São Gonçalo, Engenheiro Paulo de Frontin, Tanguá e Valença.

A seleção dos rebanhos analisados foi feita por conveniência (amostragem não probabilística), porém em cada rebanho os animais foram selecionados ao acaso.

As frequências obtidas pelos diferentes métodos de diagnóstico foram avaliadas estatisticamente pelo teste de Kruskal-Wallis, Dunn, regressão logística simples e t-student ( $P < 0,05$ ).

Projeto aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Fluminense com protocolo número 593.

### Isolamento Bacteriano

Das amostras de leite coletadas assepticamente conforme instruções do “Nacional Mastitis Council” (1999), uma parte foi transferida para frascos estéreis devidamente identificados e transportados em caixa isotérmica com gelo para o Laboratório de Bacteriologia da Universidade Federal Fluminense, Niterói/RJ, a fim de serem processados para o cultivo em um período de até 24 horas após a coleta.

As amostras de leite foram semeadas em ágar sangue enriquecido com 5% de sangue de ovino e em ágar EMB (“Eosin Methylene Blue”), seguido de incubação a 37°C, realizando-se leituras após 24 e 48 horas. Nos cultivos contendo mais de cinco colônias com uma única morfologia, procedeu-se a avaliação de características de crescimento (tamanho e coloração das colônias, bem como produção de hemólise, coloração de Gram e identificação dos isolados a partir de provas bioquímicas (National... 1999; McDougall et al. 2001).

### **Contagem de Células Somáticas (CCS)**

Coletou-se aproximadamente 40 mL de leite por cabra para a CCS. Este foi dispensando em frasco padronizado com o conservante bronopol<sup>®</sup>, acondicionado em caixa isotérmica com gelo e encaminhado ao Laboratório de Qualidade do Leite da Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora/MG. Para tal análise foi utilizado o método de citometria de fluxo, em aparelho Somacount 300 - Bentley Instruments EUA<sup>®</sup>.

### **Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**

A extração de ácido desoxirribonucleico (DNA) de cada amostra de leite foi realizada pelo método de fenol/clorofórmio/ álcool isoamílico, baseada em Gregory et al. (2009). Após a extração, o DNA foi concentrado em álcool etílico, centrifugado, e o sedimento ressuspendido em tampão Tris-EDTA pH 8,3 (Sambrook et al. 1989) e estocado a - 20°C.

As amplificações dos segmentos específicos do espaço intergênico 16S a 23S do rRNA da espécie *Staphylococcus aureus* foi realizada com iniciadores descritos por Forsman et al. (1997). Os iniciadores são: STAA-AuI - TCT TCA GAA GAT GCG GAA TA e STAA-AuII - TAA GTC AAA CGT TAA CAT ACG, para a reprodução de amplicons de 420 pb.

As reações de amplificação do DNA ocorreram em termociclador PTC-100 (PELTIER-EFFECT CYCLING-MJ Research, Inc.) com programação: 94°C por 3 minutos; 40 ciclos com desnaturação a 94°C por 1 minuto, pareamento a 61°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minutos. E por fim, um ciclo final de extensão de 72°C por 10 minutos. Cada tubo de reação contem: Tampão Phoneutria, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 30 pmol de cada iniciador, 200 pM de dNTPs, 1,0 U de Taq polimerase e 100 ng de DNA, com volume final da reação de 20 µL.

Como controle positivo da reação em cadeia da polimerase (PCR) foi utilizada a cepa de *S. aureus* ATCC 13150 da coleção de micro-organismos de referência em vigilância sanitária (CMRVS) da Fundação Oswaldo Cruz, e como controle negativo, água para PCR.

Os produtos obtidos na PCR, juntamente com o marcador molecular, foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corados com brometo de etídio e visualizados em transiluminador de luz ultravioleta.

## RESULTADOS

Das 133 amostras de leite, 64 (48%) apresentaram crescimento bacteriano. Dentre essas, foram obtidos 77 isolados, sendo mais frequente *Staphylococcus* Coagulase Negativa, 58,4% (45/77), seguido de *Staphylococcus* Coagulase Positiva e bastonetes gram negativos da família das Enterobactérias, 11,58% (9/77); *Bacillus* spp., 6,49 % (5/77), *Streptococcus* spp., 5,19% (4/77), *Enterococcus* spp., 3,89% (3/77), e *E. coli* e *Serratia* sp., 1,29% (1/77).

Ao analisar as propriedades isoladamente, observou-se que a I apresentou a maior frequência (73,33%) de crescimento bacteriano, com o maior número de amostras com isolamento de *Staphylococcus* coagulase positiva (5) e 6 amostras com *Staphylococcus* coagulase negativa. Ainda foram identificados 1 amostra com *Staphylococcus* coagulase positiva nas propriedades B e F, e 2 amostras na D. As demais, com exceção das propriedades C e D, que não obtiveram crescimento bacteriano, apresentaram isolamento de *Staphylococcus* coagulase negativa (Tabela 1).

Nenhuma amostra de leite obteve positividade para *Staphylococcus aureus* no cultivo e na PCR.

Foram identificadas dez amostras com crescimento bacteriano de dois microrganismos diferentes, dos quais a associação de *Staphylococcus* Coagulase Negativa e Bastonete Gram Negativo apresentou o maior número, com 50%. Os outros microrganismos encontrados associados foram: 2 amostras com *Staphylococcus* Coagulase Positiva + *Enterococcus* sp. (20%) e 1 amostra com *Staphylococcus* Coagulase Negativa + *Bacillus* spp. (10%), *Streptococcus* spp. + *Bacillus* spp. (10%) e *Streptococcus* spp. + Bastonete Gram Negativo (10%) (Tabela 2).

A CCS média foi de 2.152.000 células/mL de leite, sendo que 49,62% (66/133) das cabras apresentaram CCS acima de 1.000.000 células/mL de leite. Não houve diferença estatística ( $P > 0,05$ ) entre a CCS média de animais negativos e positivos no isolamento, de, respectivamente, 2.113 e 2.189 mil células/mL. Comparando os resultados da CCS média por isolamento: um tipo bacteriano, dois tipos bacterianos e nenhum isolamento, 2.238, 1.912 e 2.113 mil células/mL, respectivamente, também não foi observado diferença estatística ( $P > 0,05$ ). Houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre a CCS média das propriedades pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e Dunn (Índice de confiança 95%) (Tabela 3).

## DISCUSSÃO

O isolamento de *Staphylococcus* coagulase negativa (SNC) em 33,83% das amostras corrobora com outros estudos sobre a etiologia da mastite caprina no Brasil (Langoni et al. 2006, Mota 2008, Schmidt et al. 2009, Peixoto et al. 2010, Oliveira et al. 2011), onde esses agentes foram os mais frequentemente encontrados na glândula mamária dos caprinos (Contreras et al., 2007; Gottardi et al., 2008; Almeida et al. 2013) e estão associados a mastite subclínica em cabras (Neves 2010). O caráter oportunista dos SCN está relacionado com deficiências no sistema de ordenha e no asseio pessoal do ordenhador (Meireles et al. 1999, Contreras et al. 2001). Essas bactérias apresentam importância epidemiológica, pois podem causar mastite

subclínica durante toda a lactação ou mesmo no período seco (Poutrel et al. 1997), tornando os animais infectados fontes de infecção em potencial no rebanho. Some-se a isso a importância econômica desses agentes, que causam prejuízos aos produtores principalmente devido à redução na produção de leite (Leitner et al. 2004). Outro fato importante são os *Staphylococcus* coagulase negativa também serem apontados como potencialmente enterotoxigênicos, representando perigo para a segurança dos alimentos (Gottardi et al. 2008).

A frequência de 11,58% observada para *Staphylococcus* coagulase positiva está de acordo com outras publicações que classificam esse grupo de microrganismo como o segundo mais isolado em mastites caprinas (Langoni et al 2006, Peixoto et al 2012). Uma pesquisa sobre mastite caprina realizada no Iran encontrou 12,17% de *Staphylococcus* coagulase positiva nos isolados de leite caprino (Ebrahimi et al. 2010), sendo este resultado similar ao encontrado no presente estudo.

Segundo Corrales et al. (1997), *Streptococcus* spp. não constituem um grupo de bactérias prevalentes em criatórios caprinos, estando associados com 5-10% das mastites, o que está de acordo com os 5,19% obtidos neste estudo. Peixoto et al (2012) encontrou *Streptococcus* spp. em 2,34% dos isolados em trabalho realizado no sertão da Bahia. Em relação aos bastonetes Gram positivos, *Bacillus* spp. estão raramente associados com mastites caprinas (Contreras et al. 2001), muito embora trabalho realizado na Croácia tenha isolado 2% desse microrganismo em amostras de leite caprino (Kostelić et al. 2009) O presente estudo encontrou 6,49% de *Bacillus* spp., podendo ser proveniente de contaminação ambiental.

Neste trabalho, foram isolados bastonetes gram negativos (11,58%) pertencentes à família Enterobacteriaceae. Peixoto et al. (2010) encontraram esses microrganismos em 3,9% dos isolados de leite caprino. As enterobactérias são consideradas importantes agentes das mastites ambientais (Prestes et al. 2002), estando relacionada com condições de contaminação ambiental e com a utilização de utensílios mal higienizados durante a ordenha.

Não foi identificada a presença de *Staphylococcus aureus* pelo cultivo e pela PCR, embora esse seja considerado um dos agentes isolados com mais frequência em casos de mastite caprina (Neves et al. 2010, Peixoto et al. 2012, Almeida et al. 2013). Alguns trabalhos evidenciam a presença desse microrganismo em quadros mais severos de mastite clínica (Ameh & Tari 2000), o que não foi observado nos animais dos rebanhos estudados.

Não houve diferença estatística ( $P > 0,05$ ) entre a CCS de animais positivos e negativos para o isolamento bacteriológico neste estudo, estando de acordo com trabalhos previamente publicados (Santos et al. 2004, Villanova et al. 2008, Correa et al. 2010, Neves et al. 2010, Almeida et al. 2013). Verificou-se também a ausência de diferença estatística entre a CCS média dos isolados com um tipo bacteriano, dois tipos bacterianos e nenhum isolamento. Porém, foi constatada diferença estatística ( $P < 0,05$ ) entre a CCS média dos rebanhos estudados. Diante desses resultados, deve-se avaliar com cautela a viabilidade dos testes que quantificam a celularidade no leite caprino para o monitoramento da saúde do úbere, uma vez que a quantidade de células somáticas é diretamente influenciada por fatores fisiológicos, como o processo de secreção do tipo apócrina, o estágio da lactação, a época do ano e o tipo de ordenha (Neves et al. 2010). Devido a essas diferenças na glândula mamária em

cabras é comum encontrar um grande percentual de amostras de leite negativas ao exame bacteriológico com CCS superiores a 1.000.000 céls/ml (Wilson et al. 1995). Dessa forma, resultados positivos no isolamento bacteriano devem ser analisados cuidadosamente, pois a mera presença de bactérias no leite não significa obrigatoriamente mastite. Para tanto, uma complementação ao isolamento seria a utilização da Contagem Total de Bactérias (CTB), capaz de avaliar de forma mais fidedigna a presença ou não de infecção mamária.

Neste estudo, a CCS média foi de 2.152.000 células/mL de leite, ultrapassando o valor máximo recomendado por ZENG (1996). Entretanto, está próximo dos 2.000.000 células/mL de leite propostos por ROTA et al. (1994) como o limite de células fisiologicamente admissíveis no leite caprino. No Brasil, não há limites máximos oficiais exigidos para a CCS no leite caprino e, em contrapartida, a globalização dos mercados indica que medidas regulamentares nesse sentido são necessárias (Brasil 2000). Desse modo, a CCS ainda não está bem estabelecida no diagnóstico da mastite caprina, sugerindo-se que valores de CCS acima de 1.000.000 células/mL de leite sirvam de critério para a realização de exames microbiológicos (Paes et al. 2003).

### CONCLUSÃO

*Staphylococcus* Coagulase Negativa foi o agente bacteriano isolado com maior frequência nas amostras de leite, confirmando ser este o principal grupo de microrganismos isolados de úberes caprinos.

A CCS não se correlaciona com os resultados do isolamento bacteriano, devendo ser avaliada com cautela em estudos sobre mastite subclínica em cabras.

### REFERÊNCIAS

- Almeida J.F., Aquino M.H.C, Magalhães H., Nascimento E.R., Pereira V.L.A., Ferreira T., Barreto M.L. Principais alterações no leite por agentes causadores de mastite no rebanho caprino dos estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro. *Arquivos do Instituto Biológico*, 80:13-18, 2013.
- Ameh M.J.A. & Tari I.S.. Observations on the prevalence of caprine mastitis in relation to predisposing factors in Maiduguri. *Small Rumin. Res.* 35:1-5, 2000.
- Aulrich K. and Kerstin B. Intramammary infections caused by coagulase-negative staphylococci and the effect on somatic cell counts in dairy goats. *Agriculture and Forestry Research*, 58:59-64, 2008.
- Bergonier D., Crémoux R., Rupp R., Langriffoul G., Berthelot X. Mastitis of dairy small ruminants. *Veterinary Research*, 34:689-716, 2003.
- Borges C.H.P. Custos de produção do leite de cabra na região sudeste do Brasil. 2006. Disponível em: <<http://www.farmpoint.com.br/radares-tecnic>

os/gerenciamento/custos-de-producao-do-leite-de-cabra-na-regiao-sudeste-do-brasil-5n.aspx>. Acesso em: agosto 2015.

- Brasil. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 37 de 31 de outubro de 2000. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite de Cabra. Diário Oficial da União, Brasília, 8 de novembro de 2000.
- Contreras A. Etiología de la infección intramamaria caprina em relación con los programas de control. In: XXVI Jornada Científica de la SEOC. Sevilla, 71-83, 2001.
- Contreras A., Sierra D., Sánchez A., Corrales J.C., Marco J.C., Paape M.J., Gonzalo C. Mastitis in small ruminants. *Small Ruminant Research*, 68:145-153, 2007.
- Corrales J.C., Contreras A., Sánchez A., Luengo C., Marco J.C. Etiología y diagnóstico microbiológico de las mamitis caprinas. *Ovis*, (53): 33-65, 1997.
- Correa C.M., Michaelsen R., Ribeiro M.E.R., Pinto A.T., Zanela M.B. & Schmidt V. Composição do leite e diagnóstico de mastite em caprinos. *Acta Scientiae Veterinariae*, 38:273-278, 2010.
- Dal Pozzo M., Viegas J., Santurio D.F., Rossato L., Soares I.S., Alves S.H., Costa M. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a *Staphylococcus* spp. isolados de mastite caprina. *Ciência Rural*, 41:667-672, 2011.
- Ebrahimi A., Shams N., Shahrokh S., Mirshokraei P. Characteristics of Staphylococci isolated from mastitic goat milk in Iranian dairy herds. *Veterinary World*, (5): 205-208, 2010.
- Forsman P., Timisjarvi A.T., Allatossava T. Identification of staphylococcal and streptococcal causes of bovine mastitis using 16s-23s rRNA spacer regions. *Microbiology*, 143:3491-3500, 1997.
- Gottardi C.P.T., Muricy R.F.; Cardoso M.; Schmidt V. Qualidade higiênica de leite caprino por contagem de coliformes e estafilococos. *Ciência Rural*, 3:743-748, 2008.
- Gregory L., Lara M.C C.S.H., Villalobos E.M.C., Hasegawa M.Y., Castro R.S., Rodrigues J.N.M., Araújo J., Keller L.W., Durigon E.L. Detecção do vírus da Artrite Encefalite Caprina em amostras de leite de cabras pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Nested-PCR. *ARS Veterinária*, 25:142-146, 2009.
- Kostelić A, Cergolj M, Tariba B, Rupić V, Benić M, Gantner V, Štoković I. Prevalence and aetiology of subclinical mastites in goat. *Ital.J.Anim.Sci.*, 8:134-136, 2009.

- Langoni H.; Domingues P.F., Baldini S. Mastite caprina: seus agentes e sensibilidade frente a antimicrobianos. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, 13:51-54, 2006.
- Leitner G., Merin U. & Silanikove N. Changes in milk composition as affected by subclinical mastitis in goats. *J. Dairy Sci.* 87:1719-1726, 2004.
- Mcdougall S., Murgough P., Pankey W., Delaney C., Barlow J., Scruton D. Relationship among somatic cell count, California mastitis test, impedance and bacteriological status of milk in goats and sheep in early lactation. *Small Ruminant Research*, 40:245-254, 2001.
- Meireles I.R., Gottschalk S., Da silva A.V., Cabral K.G., Langoni H. Monitoramento microbiológico e avaliação de provas diagnósticas na mastite caprina. *Napgama*, 6:17-19, 1999.
- Megersa B.; Tadesse C.; ABUNNA, F. Occurrence of mastitis and associated risk factors in lactating goats under pastoral management in Borana, Southern Ethiopia. *Tropical Animal Health and Production*, v.42, p.1249- 1255, 2010.
- Mota R.A. Aspectos epidemiológicos, diagnóstico e controle das mastites em caprinos e ovinos. *Tecnologia & Ciência Agropecuária*, 2:57-61, 2008.
- Mungatana N.K., Ngure R.M., Shitandi A., Onyiego B., Mutuma M. Effect of experimental *Staphylococcus aureus* mastitis on compositional quality of goat milk. *International Journal of Dairy Technology*, 64:360-364, 2011.
- National mastitis council - NMC. *Laboratory Handbook on Bovine Mastitis*. USA: Nacional Mastitis Council, Inc, 1999. 222p.
- Neves P.B., Medeiros E. S., Sá V. V., Camboim E. K.A., Garino F., Mota R. A., Azevedo S. S. Perfil microbiológico, celular e fatores de risco associados à mastite subclínica em cabras no semiárido da Paraíba. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 30:379-384, 2010.
- Oliveira C.J.B., Hisrich E.R., Moura J.F.P., Givisiez P.E.N., Costa R.G., Gerbreys W.A. On farm risk factors associated with goat milk quality in Northeast Brazil. *Small Ruminant Research*, 98:64-69, 2011.
- Paes P.R.O., Lopes S.T.A., Lopes R.S., Kohayagawa A., Takahira R.K., Langoni H.. Effects of administration of vitamin E on mammary health and milk cell counts of first parturition goats experimentally challenged with *Staphylococcus aureus*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 55(1):15-20, 2003.
- Peixoto, R.M., Mota R. A., Costa M. M.. Mastite em pequenos ruminantes no Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 30:54-762, 2010.

- Peixoto R.M., França C.A., Júnior A.F.S., Veschi J.L.A., Costa M.M. Etiologia e perfil de sensibilidade antimicrobiana dos isolados bacterianos da mastite em pequenos ruminantes e concordância de técnicas empregadas no diagnóstico. *Pesq. Vet. Bras.*, 30(9):735-740, 2010.
- Peixoto R.M., Amanso E.S., Cavalcante M.B, Azevedo S.S., Pinheiro Junior J.W., Mota R.A., Costa M.M. Fatores de risco para mastite infecciosa em cabras leiteiras criadas no Estado da Bahia. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, 79(1):101-105, 2012.
- Poutrel B., De Crémoux R., Ducelliez M., Verneau D.. Control of intramammary infections in goats: impact on somatic cell counts. *J. Anim. Sci.* 75:566-570, 1997.
- Prestes D.S., Filappi A., Cecim M.. Susceptibilidade à mastite: fatores que a influenciam: uma revisão. *Revta FZVA*, 9(1):118-132, 2002.
- Rota A.M., Rojas A., Martín L., Rodríguez P.; Tovar J. J. Uso de la prueba de califórnia para detección de mamitis en el ganado caprino. *Avances en Alimentacion y Mejora Animal*, 2:67-69, 1994.
- Sambrook J.; Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2th.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. v.2, Cap.14.
- Santos A.R., Scherer S., Schmidt V. Contagem de células somáticas e "California Mastitis Test" como método diagnóstico da mamite em caprinos. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, 3:50-55, 2004.
- Silva M.U.D. & Silva A.E.D. Doenças mais freqüentes observadas nos caprinos do Nordeste. Embrapa, Brasília. 1987.
- Schmidt V., Pinto A.T.; Scheneider R.N., Silva F.F.P., Mello F.A. Caracterização da mastite subclínica em caprinos produzidos em sistema orgânico no Rio Grande do Sul. *Pesquisa veterinária Brasileira*, 29(9):774-778, 2009.
- Vilanova M., Gonçalves M., Osório M.T.M., Esteves R., Schmidt V. Aspectos sanitários do úbere e composição química do leite de cabras Saanen. *Acta Scientiae Veterinariae*, 36:235-240, 2008.
- Wilson D.J., Stewart K.N. & Sears P.N. Effects of stage of lactation, production, parity and season on somatic cell counts in infected and uninfected dairy goats. *Small Rum. Res.* 16(2):165-169, 1995.
- Zeng, S.S. Comparisons of goat milk standards with cow milk standards of analyses somatic cell count, fat, and protein in goat milk. *Small Ruminant Research*, 21:221-225, 1996.

Tabela 1. Frequência de crescimento bacteriano e etiologia em amostras de leite de cabra em lactação de nove propriedades de municípios do Estado do Rio de Janeiro.

| Propriedade | Nº de amostras | Etiologia                                |  |        | Crescimento Bacteriano |       |
|-------------|----------------|--|--|--------|------------------------|-------|
|             |                | <i>Staphylococcus</i> Coagulase Negativa | <i>Staphylococcus</i> Coagulase Positiva | Outros | Nº de amostras         | %     |
| A           | 14             | 6  | 0  | 3      | 9                      | 64,28 |
| B           | 15             | 7  | 1  | 1      | 8                      | 53,33 |
| C           | 15             | 0  | 0  | 0      | 0                      | 0     |
| D           | 14             | 6  | 2  | 5      | 8                      | 57,14 |
| E           | 20             | 6  | 0  | 5      | 8                      | 40    |
| F           | 20             | 9  | 1  | 6      | 14                     | 70    |
| G           | 13             | 5  | 0  | 1      | 5                      | 38    |
| H           | 7              | 0  | 0  | 0      | 0                      | 0     |
| I           | 15             | 6  | 5  | 2      | 11                     | 73,33 |
| Total       | 133            | 45                                       | 9  | 23     | 64                     | 48    |

Tabela 2. Número de microrganismos isolados em associação de amostras de leite de cabras em lactação de nove propriedades de municípios do Estado do Rio de Janeiro.

| Microrganismo  | Número | %   |
|--|--------|-----|
| <i>Staphylococcus</i> Coagulase Negativa + Bastonete Gram Negativo | 5      | 50  |
| <i>Staphylococcus</i> Coagulase Positiva + <i>Enterococcus</i> sp. | 2      | 20  |
| <i>Staphylococcus</i> Coagulase Negativa + <i>Bacillus</i> spp.    | 1      | 10  |
| <i>Streptococcus</i> spp. + <i>Bacillus</i> spp.                   | 1      | 10  |
| <i>Streptococcus</i> spp. + Bastonete Gram Negativo                | 1      | 10  |
| Total  | 10     | 100 |

Tabela 3. Diferenças das médias de CCS das propriedades pelo Kruskal-Wallis e Dunn ( $P < 0,05$ ).

| Propriedade | CCS  |       |
|-------------|------|-------|
| A           | 1930 | a,b   |
| B           | 3421 | a     |
| C           | 2675 | a,b   |
| D           | 1841 | a,b,c |
| E           | 1375 | b     |

|   |      |       |
|---|------|-------|
| F | 2248 | a,b   |
| G | 347  | b,c   |
| H | 5258 | a,b   |
| I | 1337 | a,b,c |

*abcde* Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ ).

### 3.2 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA, FÍSICO-QUÍMICA E PERFIL DE SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE *STAPHYLOCOCCUS* SPP. DO LEITE DE CABRA COM MASTITE SUBCLÍNICA

Enviado para o periódico Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.

Análise microbiológica, físico-química e perfil de sensibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus* spp. do leite de cabra com mastite subclínica

Microbiologic, physicochemical analysis and antimicrobial sensibility profile of *Staphylococcus* spp. from milk of goat with subclinical mastitis

Camila Serva Pereira<sup>1\*</sup>, Lídia Maria Marques dos Santos<sup>1</sup>, Helena Magalhães<sup>2</sup>, Juliana Ferreira de Almeida<sup>1</sup>, Virginia Leo de Almeida Pereira<sup>1</sup>, Elmiro Rosendo do Nascimento<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal Fluminense - Rua Vital Brasil Filho, 64, CEP:24.230-340. Niterói, RJ.

\*E-mail: [camilaserva2@gmail.com](mailto:camilaserva2@gmail.com)

<sup>2</sup>Pesagro-Rio, Centro Estadual de Pesquisa em Sanidade Animal Geraldo Manhães, Niterói, RJ, Brasil.

#### RESUMO

A mastite ocasiona sérios prejuízos econômicos ao segmento leiteiro e representa risco iminente à saúde pública. O uso indiscriminado de antimicrobianos no tratamento dos animais pode desencadear a seleção de microrganismos multirresistentes. O presente estudo teve por objetivo estabelecer a Contagem Total de Bactérias (CTB) e identificar as principais bactérias causadoras de mastite caprina, relacionando-as com os parâmetros físico-químicos do leite *in natura*, como também determinar o perfil de sensibilidade de isolados de estafilococos provenientes do leite de cabras em rebanhos caprinos do Estado do Rio de Janeiro. Foram

coletadas 133 amostras de leite provenientes de nove propriedades leiteiras caprinas para a realização do exame bacteriológico, teste de sensibilidade aos antimicrobianos, CTB e análises físico-químicas. Foi constatada uma maior frequência de *Staphylococcus* spp., sendo observado ainda, isolados de bacilos gram negativos, *Bacillus* spp., *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Escherichia coli* e *Serratia* spp. O antimicrobiano mais efetivo foi o florfenicol (98,30% sensibilidade) e as maiores resistências foram para ampicilina e penicilina (50,00%). A múltipla resistência a dois ou mais antimicrobianos foi observada em 57,40% dos isolados. Houve diferença significativa entre as frequências de isolamento por rebanho. Alguns rebanhos não atenderam aos padrões físico-químicos exigidos pela legislação e a média de CTB de 842.000 UFC/mL de leite foi acima do preconizado. A acidez apresentou diferença significativa quando associada ao isolamento bacteriano ( $p < 0,05$ ). O risco (*odds ratio*) de detecção bacteriana em caso de acidez elevada aumentado em 1,15 vezes quando comparado a amostras com acidez normal. A contribuição de todos os fatores físico-químicos a CTB somou 41,08%, sendo a lactose o fator que mais contribuiu isoladamente ( $p < 0,05$ ).

Palavras-chave: Leite de cabra, Análise Físico-Química, Resistência Antimicrobiana, Contagem Total de Bactérias, Mastite.

#### ABSTRACT

Mastitis causes serious economic losses to the dairy industry and represents an imminent risk to public health. The indiscriminate use of antimicrobials in the treatment of animals can trigger the selection of multiresistant microorganisms. This study aimed to establish the Total Bacterial Count (TBC) and identify key-causing bacteria goat mastitis, relating them with the physical-chemical parameters of fresh milk, as well as determine the staphylococcal isolates sensitivity profile from the goats' milk goat herds of the State of Rio de Janeiro. Were collected 133 milk samples from nine goat dairy farms to carry out the bacteriological examination, sensitivity testing to antimicrobials, total bacterial counts and physical-chemical analysis. A higher frequency was observed *Staphylococcus* spp., being observed also isolated from gram negative bacilli, *Bacillus* spp., *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Escherichia coli* and *Serratia* spp. The most effective antimicrobial was florfenicol (sensitivity 98.30%) and the highest resistances were ampicillin and penicillin (50.00%). Multiple resistance two or more antimicrobials was observed in 57.40% of the isolates. There were significant differences between the frequencies of isolation for sheep. Some herds did not meet the physical and chemical standards required by legislation and the average TBC 842 000 CFU /

ml of milk was above the recommended. The acidity significant difference when associated with bacterial isolation ( $p < 0.05$ ). The risk (*odds ratio*) of bacterial detection in case of high acidity increased by 1.15 times as compared to samples with normal acidity. The contribution of all the physical and chemical factors TBC amounted to 41.08%, the lactose factor that contributed alone ( $p < 0.05$ ).

Keywords: Goat milk, Physical Chemistry Analysis, Antimicrobial Resistance, Total Bacterial Count, Mastitis.

### Introdução

A caprinocultura leiteira tem representado um segmento importante de mercado no Brasil, tendo em vista as características físico-químicas e nutricionais do leite caprino, e a maior seletividade dos consumidores, que buscam cada vez mais por produtos saudáveis e de qualidade comprovada (Andrade *et al.*, 2012).

No entanto, um dos entraves à produção leiteira caprina é a ocorrência de mastite, que se caracteriza por processo inflamatório da glândula mamária, representando uma das enfermidades mais comuns nesse segmento. Atribui-se a ela perdas na produção e, conseqüentemente, prejuízos econômicos ao produtor e à indústria (Contreras *et al.*, 2007). As principais bactérias envolvidas na mastite caprina são os *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp., *Mycoplasma* spp. e agentes ambientais como enterobactérias (Peixoto *et al.*, 2010; Dal Pozzo *et al.*, 2011).

A contagem total de bactérias (CTB) é um indicador de qualidade higiênico-sanitário do leite, com limite permitido de 500.000 UFC/mL para o leite de cabra cru (BRASIL, 2000). O valor de CTB elevado é indicativo de deficiência na limpeza e higienização dos equipamentos de ordenha, do sistema de refrigeração, das tetas e também da presença de mastite (Bueno *et al.*, 2008).

No leite de animais com mastite são observadas mudanças significativas em sua composição como a redução do teor de lactose, caseína, nível de Ca, K e Fe e aumento de Na e Cl. Essas alterações influenciam no rendimento industrial e no valor nutritivo dos produtos lácteos, sobretudo queijos e iogurte (Mungatana *et al.*, 2011).

Em relação à susceptibilidade *in vitro* dos agentes etiológicos da mastite caprina, tem-se observado a crescente resistência bacteriana aos antimicrobianos convencionais, o que

alerta para a necessidade da adoção de protocolos terapêuticos, de preferência respaldados em testes de susceptibilidade antimicrobiana *in vitro* (Langoni *et al.*, 2006).

Os objetivos desse trabalho foi estabelecer a CTB e identificar as principais bactérias causadoras de mastite caprina, relacionando-as com os parâmetros físico-químicos do leite *in natura*. Adicionalmente foi determinado o perfil de sensibilidade de isolados de estafilococos provenientes do leite das cabras investigadas em rebanhos caprinos do Estado do Rio de Janeiro.

#### Material e Método

O presente trabalho obteve aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Fluminense com protocolo número 593.

Foram coletadas 133 amostras de leite de cabras provenientes de nove criatórios de caprinos leiteiros localizadas no Estado do Rio de Janeiro dos seguintes municípios: Seropédica, Niterói, Friburgo, Teresópolis, Paraíba do Sul, São Gonçalo, Engenheiro Paulo de Frontin, Tanguá e Valença.

A seleção dos rebanhos analisados foi feita por amostragem não probabilística e todos os animais em lactação de cada rebanho foram selecionados. A comparação das frequências de isolamento por rebanho foi estabelecida pelo teste de Qui-quadrado. Para análise da CTB foi feita a transformação dos valores para  $\log_{10}$ . A CTB foi comparada entre as propriedades e comparada as variâncias pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. A CTB foi associada às variáveis físico-químicas por regressão linear múltipla e passo a passo (*Stepwise*). O isolamento bacteriano (presença ou ausência) foi associado às mesmas variáveis pelo método de regressão logística simples. Todas as análises foram realizadas com intervalo de confiança (IC) de 95% ( $p < 0,05$ ) e utilizando o *software* BioEstat 5.0 (Ayres *et al.*, 2007).

A CTB foi realizada em uma amostragem de leite de 71 cabras provenientes de cinco propriedades leiteiras dos seguintes municípios: Friburgo, Paraíba do Sul, São Gonçalo, Engenheiro Paulo de Frontin e Tanguá. O leite coletado foi dispensado em frasco padronizado contendo pastilha de conservante azidiol<sup>®</sup>, acondicionado em caixa isotérmica com gelo e encaminhado ao Laboratório de Qualidade do Leite da Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora/MG. Para tal análise foi utilizado o método de citometria de fluxo, em aparelho Bactocount IBC - Bentley Instruments EUA<sup>®</sup>.

Para o exame microbiológico, as amostra de leite foram semeadas em ágar sangue ovino (5%) desfibrinado e ágar eosina azul de metileno (Merck<sup>®</sup>) seguido de incubação em condições de aerobiose, a 37° C realizando-se leitura após 24 e 48h. Procedeu-se a avaliação

de características de crescimento (tamanho e coloração das colônias, bem como produção de hemólise), coloração de Gram e identificação dos isolados a partir de provas bioquímicas (Koneman *et al.* 2008).

As cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas foram submetidas ao teste de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* pelo método de difusão em disco (Bauer *et al.* 1966). A escolha dos antimicrobianos foi feita a partir de informações dos fármacos mais utilizados nas propriedades para o tratamento da mastite e algumas classes de interesse (Langoni *et al.*, 2006; Garino Junior *et al.*, 2011). Foram testados: penicilina (10 UI), ampicilina (10 mcg), cefalotina (30 mcg), cefoxitina (30mcg), gentamicina (10 mcg), norfloxacina (10mcg), oxacilina (1mcg), tetraciclina (30 mcg) e florfenicol (30mcg). A interpretação dos halos de inibição foi conforme o preconizado pelo *Clinical Laboratory Standart Institute* (CLSI, 2013).

A análise físico-química de componentes do leite foi realizada pelo equipamento eletrônico Bentley 2000 (*Bentley Instruments USA*), o qual determina as porcentagens de gordura, proteína e lactose por absorção infravermelha, bem como de sólidos totais, por soma dos valores dos componentes anteriores. A acidez foi determinada pela titulação de 10 mL de leite por uma solução alcalina de concentração conhecida (NaOH 0,1N), utilizando-se como indicador a fenolftaleína e o resultado expresso em graus Dornic (°D). A determinação de cloretos foi realizada pelo método mercurométrico. A densidade a 15°C foi realizada em aparelho eletrônico modelo “Density DMA 48 Density Meter AP PAAP”, conforme instruções do manual do aparelho (Brasil, 2003).

### Resultados e Discussão

Das nove propriedades visitadas, oito foram positivas na lactocultura. A frequência de animais positivos para o exame microbiológico do leite foi de 48% (64/133).

*Staphylococcus* coagulase negativa (SCN) foram os microrganismos mais frequentes encontrados no presente estudo (Tab. 1), corroborando com os resultados de Salina *et al.* (2015) e Almeida *et al.* (2013) que identificaram, respectivamente, 51,2% e 45,7% de SCN em trabalho com mastite caprina na região sudeste do Brasil.

Tabela 1. Frequências absoluta e relativa de bactérias isoladas do leite de cabra

| Bactérias Isoladas                       | FA | FR    |
|--|----|-------|
| <i>Staphylococcus</i> Coagulase Negativa | 45 | 58,40 |
| <i>Staphylococcus</i> Coagulase Positiva | 9  | 11,58 |
| Bacilos Gram Negativos                   | 9  | 14,16 |
| <i>Bacillus</i> spp.                     | 5  | 6,49  |
| <i>Streptococcus</i> spp.                | 4  | 5,19  |

|                          |    |      |
|--------------------------|----|------|
| <i>Enterococcus</i> spp. | 3  | 3,89 |
| Total                    | 77 | 100  |

FA=Frequência absoluta; FR = Frequência relativa

Neste trabalho também foram isolados bacilos gram negativos (14,16%) pertencentes à família Enterobacteriaceae, incluindo *E. coli* e *Serratia* spp. O isolamento de microrganismos da família Enterobacteriaceae associada à mastite clínica é um achado comum, sendo consideradas importantes agentes das mastites ambientais (Prestes *et al.* 2002). Outra bactéria isolada foi o *Bacillus* spp. (6,49%), que está raramente associada à mastite, podendo ser proveniente de contaminação ambiental (Contreras *et al.* 2007).

A resistência antimicrobiana para as 54 cepas de *Staphylococcus* spp. foi de 50% (29/54) para ampicilina e penicilina, 32,70% (19/54) para oxacilina, 8,60% (5/54) para tetraciclina, 6,89% (4/54) para cefoxitina, 5% (3/54) para norfloxacin, 3,40% (2/54) para gentamicina e cefalotina e 1,7% (1/54) para florfenicol. Resultados similares foram obtidos por Garino Júnior *et al.* (2011) com maiores índices de resistência para penicilina (66,67%) e ampicilina (63,89%) em amostras de *Staphylococcus* spp. isolados de leite caprino provenientes da Paraíba. Almeida *et al.* (2013) obtiveram índices de resistência para os mesmo antimicrobianos de 56% para SCN. A elevada prevalência de amostras com resistência simultânea à penicilina e à ampicilina, pode estar associado ao uso frequente ou mesmo subdosagens desses beta-lactâmicos na terapia da mastite e de outras enfermidades no rebanho, evidenciando a incidência de estirpes produtoras de beta-lactamase.

Observou-se no presente estudo alta taxa de resistência a oxacilina (32,40%) quando comparado a outros trabalhos similares (Peixoto *et al.*, 2010; Garino Junior *et al.*, 2011; Salina *et al.*, 2015). A oxacilina é um beta-lactâmico semi-sintético derivada da penicilina e a resistência desse antimicrobiano às estirpes de estafilococos deve-se principalmente a dois mecanismos: a produção da enzima extracelular beta-lactamase, codificada pelo gene *blaZ*, e a produção de PBP2a ou PBP2', uma proteína ligante de penicilina de baixa afinidade, codificada pelo gene *mecA* (Cauwelier *et al.*, 2004), sendo considerado, atualmente, o maior problema clínico e epidemiológico em infecções humanas hospitalares (Atique *et al.*, 2012).

Foi verificada a presença de múltipla resistência nas amostras de *Staphylococcus* spp. no presente estudo, onde o padrão mais frequente foi a resistência a dois antimicrobianos (45,16%), seguida pela resistência a três antimicrobianos (41,93%). Dois isolados de *Staphylococcus* (6,45%) apresentaram resistência a quatro e a seis antimicrobianos. Esse achado representa um motivo de preocupação, uma vez que muitos antimicrobianos disponíveis no mercado não teriam efeito sobre tais microrganismos, fato que poderia

acarretar enorme dificuldade no tratamento dos animais doentes e, conseqüentemente, agravar as perdas econômicas. Garino Júnior *et al.* (2011) detectaram múltipla resistência a três antimicrobianos em 28,57% das 42 amostras de *Staphylococcus spp.* avaliadas. Os mesmos autores encontraram uma amostra resistente a sete diferentes antimicrobianos. Esse fato demonstra que a múltipla resistência é um evento comum em isolados de mastite caprina e, principalmente, resistência simultânea à penicilina e à ampicilina.

Alguns rebanhos não atenderam aos padrões exigidos para acidez (C, D, E, H), gordura (G, H), proteína (D, G), densidade (D, E), lactose (C, D, F, H), e sólidos não gordurosos (C, D, H, I) (Tab.2) estabelecidos pela legislação (Brasil, 2000).

Tabela 2. Valores médios dos parâmetros físico-químicos do leite de cabra por rebanho.

| Rebanhos | Média dos Parâmetros Físico-Químicos |        |        |        |        |                      |        |      |
|----------|--------------------------------------|--------|--------|--------|--------|----------------------|--------|------|
|          | GOR(%)                               | PRO(%) | LAC(%) | EST(%) | ESD(%) | ACI( <sup>0</sup> D) | DEN    | CLO  |
| A        | 4,36                                 | 3,35   | 4,30   | 13,00  | 8,64   | 18                   | 1,0296 | 0,14 |
| B        | 5,61                                 | 3,40   | 4,39   | 14,32  | 8,71   | 14                   | 1,0292 | 0,12 |
| C        | 3,58                                 | 2,98   | 4,11   | 11,53  | 7,94   | 12                   | 1,0284 | 0,11 |
| D        | 3,68                                 | 2,54   | 4,23   | 11,32  | 7,63   | 11                   | 1,0269 | 0,09 |
| E        | 3,23                                 | 3,03   | 4,38   | 11,48  | 8,25   | 8                    | 1,0223 | 0,06 |
| F        | 3,39                                 | 3,41   | 4,21   | 11,09  | 9,14   | 13                   | 1,0306 | 0,15 |
| G        | 2,28                                 | 2,74   | 4,51   | 10,68  | 8,40   | 13                   | 1,0318 | 0,11 |
| H        | 2,38                                 | 2,81   | 3,94   | 9,91   | 7,53   | 11                   | 1,0313 | 0,12 |
| I        | 3,01                                 | 2,80   | 4,21   | 10,93  | 7,92   | 14                   | 1,0304 | 0,09 |
| Geral    | 3,50                                 | 3,01   | 4,25   | 11,58  | 8,24   | 13                   | 1,0289 | 0,12 |

GOR – Gordura /PRO – Proteína /LAC – Lactose/ EST – Extrato Seco/ ESD – Extrato Seco Desengordurado/ACI - Acidez/ DEN – Densidade/CLO - Cloreto

A média geral do teor de gordura foi de 3,50%, estando de acordo com a legislação vigente (Brasil, 2000). Porém, dois rebanhos apresentaram teor de gordura abaixo de 2,9% (Tab. 2). Estudos realizados por Queiroga *et al* (2007) e Almeida *et al* (2013) encontraram valores médios desse mesmo parâmetro de 2,70% e 2,60%, respectivamente. Alguns fatores como o estágio de lactação, fatores nutricionais e raça influenciam na concentração de gordura, sendo o constituinte do leite que possui maior variação. Contudo, a raça é um fator limitante, tanto que a legislação brasileira estabelece “teor original” de gordura para o leite de cabra integral, no entanto são admitidos valores inferiores a 2,90% mediante comprovação de que o teor médio de gordura de um determinado rebanho não atinge esse nível (Oliveira *et al.*, 2005; Brasil, 2000).

O teor proteico variou de 2,54 a 3,41%, com valor médio de 3,01%, sendo que dois rebanhos apresentaram valor abaixo do estabelecido pelo Brasil (2000) (Tab. 2). Lora *et al.*

(2006) e Almeida *et al.* (2013) reportaram valores médios de 3,27% e 2,44%, respectivamente. Assim como a gordura, o teor proteico varia com a espécie, e é influenciado por raça, estágio de lactação, alimentação, clima, número de partos, época do ano, e estado de saúde do úbere (Mendes *et al.*, 2009).

A lactose apresentou teor médio de 4,25%, revelando índice de reprovação de quatro rebanhos (Brasil, 2000) (Tab. 2). A lactose também é influenciada pelos diferentes níveis de concentrado da dieta, estando diretamente relacionado à regulação da pressão osmótica, de modo que maior produção de lactose determina maior produção de leite (Queiroga *et al.*, 2007).

As análises de Estrato Seco Total (EST) apresentaram valor médio de 11,58% (Tab. 2). Os teores de EST não foram estabelecidos pela legislação brasileira para o leite caprino. Sendo assim, esse parâmetro pode ser comparado com Almeida *et al.* (2013) que encontraram valor de EST médio de 10,98%. Santos *et al.* (2012) obtiveram valor médio de 12,18%, em leite pasteurizado comercializados no Estado do Ceará. O EST é representado pela gordura, açúcar, proteínas e sais minerais, sendo um parâmetro estratégico do ponto de vista produtivo, uma vez que apresenta influência direta sobre o rendimento dos produtos derivados lácteos (Costa *et al.*, 2008).

Com relação ao Estrato Seco Desengordurado (ESD), nota-se que duas amostras estavam em desacordo com o estabelecido pela legislação (Brasil, 2000). O ESD apresentou valor médio de 8,24% (Tab. 2). Queiroga *et al.* (2007) verificaram que com o avanço do período de lactação, ocorre naturalmente diminuição na quantidade de leite produzido, o que possibilita o aumento relativo de constituintes como gordura e proteína. Isso pode ser justificado em parte pelo efeito da diluição, uma vez que o teor total de sólidos varia em função do volume diário de leite produzido.

Pode-se observar que dois rebanhos apresentaram valores de densidade abaixo do limite estabelecido pela legislação vigente (Brasil, 2000). A densidade média foi de 1,0289 g/mL (Tab. 2). A densidade do leite está relacionada principalmente com a concentração de elementos dissolvidos em suspensão (ESD) e com a proporção de gordura, e deve oscilar com a variação desses componentes (Oliveira *et al.*, 2005).

O valor médio geral de 13<sup>o</sup>D obtido para o parâmetro acidez titulável atende aos valores estabelecidos pela legislação brasileira (Brasil, 2000). No entanto, três rebanhos apresentaram valores abaixo do preconizado (Tab. 2). Oliveira *et al.* (2005) e Pereira *et al.* (2005) encontraram acidez média de 14<sup>o</sup>D e 16<sup>o</sup>D, respectivamente, sendo esses valores

acima do obtido no presente estudo. A acidez do leite deve-se à presença de caseínas, fosfatos, albumina, dióxido de carbono e citratos (Pereira *et al.*, 2001). Segundo Queiroga *et al.* (2007), este índice também é utilizado como indicador do estado de conservação do leite em função da relação entre disponibilidade de lactose e produção de ácido láctico por ação microbiana que acarreta no aumento da acidez e diminuição no teor de lactose.

O índice de cloreto médio encontrado foi de 0,12% (Tab. 2). O cloreto é outro parâmetro que não foi determinado pela legislação brasileira para leite caprino, sendo os resultados comparados ao encontrado por Almeida *et al.* (2013) que obtiveram média de cloreto de 0,25%. Tonin e Nadem (2002) ao analisarem a influência do estágio de lactação sobre o teor de cloretos do leite caprino, verificaram valores crescentes na concentração desse íon nas amostras colhidas do início até o final do período de lactação.

Houve diferença significativa entre as frequências de isolamento por rebanho pelo teste do Qui-quadrado ( $p < 0,05$ ), sendo a maior frequência para o rebanho I (82,30%), seguido dos rebanhos F (70%), D (66,60%), A (64,20%), B (53,30%), G (38,40%), E (35%), C (13%) e H (0%).

A CTB média encontrada foi de 842.000 UFC/mL de leite, com variação de 11.000 a 2070.000 UFC/mL de leite, sendo que 26,76% (19/71) das amostras apresentaram resultados acima do preconizado pela legislação (500.000 UFC/mL de leite). Houve diferença significativa entre variância de CTB por propriedade ( $p < 0,05$ ) pelo teste de variância e entre médias pelo teste de Kruskal-Wallis e pelo de teste de Dunn. As diferenças significativas encontradas foram entre os rebanhos F (478.0000) e I (186.0000), G (857.5000) e I (186.0000) e H (854.0000) e I (186.0000).

Estudo realizado por Aguiar *et al.* (2013) encontrou 47% das amostras de leite de cabra com CTB acima do permitido pela legislação. A saúde da glândula mamária, a higiene de ordenha, o ambiente em que o animal fica alojado e os procedimentos de limpeza do equipamento de ordenha são fatores que afetam diretamente a contaminação microbiana do leite cru e a CTB. (Guerreiro *et al.*, 2005). Embora haja poucos estudos quanto à utilização da CTB como parâmetro de avaliação da qualidade do leite de cabra, os resultados obtidos nesse trabalho sugerem que esse método pode ser utilizado com maior frequência.

Os valores dos parâmetros físico-químicos e de CTB do leite dos rebanhos estudados foram analisados pela regressão linear múltipla, observando-se associação entre as variáveis dos parâmetros físico-químicos e CTB ( $p < 0,05$ ) explicado pela equação de regressão: CTB =

- 56490.6246 – 1178964 (GOR) + 1989.0100 (PRO) – 6900185 (LAC) -1001688 (EST) - 194.1672 (ESD) - 148.8141 (ACI) + 57483.0047 (DEN) + 6020.0836 (CLO).

Pela análise de regressão linear passo a passo (*Stepwise*) dos parâmetros físico-químicos e de CTB foram obtidos os valores conforme Tabela 3. A combinação com a utilização de todos os parâmetros físico-químicos apresentou melhor Coeficiente de Determinação (R<sup>2</sup>). Sendo assim, com a eliminação de três parâmetros, o R<sup>2</sup> diminuiu de 41,08% para somente 40,44%. As variáveis que mais atuaram no valor de CTB foram gordura, proteína, lactose, acidez e cloreto. Isoladamente, a lactose obteve maior influência na CTB, com 24,86%, sendo esta variável preditora do valor de CTB.

Tabela 3. Análise de Regressão Linear Passo a Passo (*Stepwise*) entre CTB e Parâmetros Físico-Químicos.

| Variáveis                       | R      | R <sup>2</sup> | Varição R <sup>2</sup> | p-valor |
|---------------------------------|--------|----------------|------------------------|---------|
| GOR/PRO/LAC/EST/ESD/ACI/DEN/CLO | 0.6409 | 41.08%         | 41.08%                 | 0.0001  |
| GOR/PRO/LAC/EST/ESD/ACI/CLO     | 0.6364 | 40.50%         | -0.58%                 | 0.0001  |
| GOR/PRO/LAC/ESD/ACI/CLO         | 0.6364 | 40.50%         | 0.00%                  | 0.0000  |
| GOR/PRO/LAC/ACI/CLO             | 0.6359 | 40.44%         | -0.06%                 | 0.0000  |
| PRO/LAC/ACI/CLO                 | 0.626  | 39.18%         | -1.26%                 | 0.0000  |
| PRO/LAC/CLO                     | 0.6153 | 37.85%         | -1.33%                 | 0.0000  |
| PRO/LAC                         | 0.6129 | 37.56%         | -0.29%                 | 0.0000  |
| LAC                             | 0.4986 | 24.86%         | -12.70%                | 0.0001  |

GOR – Gordura /PRO – Proteína /LAC – Lactose/ EST – Extrato Seco Total/ ESD – Extrato Seco Desengordurado /DEN – Densidade /CLO-Cloreto/R<sup>2</sup> – Coeficiente de Determinação /R – Coeficiente de Correlação

Esse resultado corrobora com o encontrado por Bueno *et al* (2008) em estudo realizado com leite de vaca, onde foi constatado que a CTB está relacionada com a composição do leite, principalmente nas concentrações de gordura, proteína, lactose e sólidos totais. Em leites com elevada CTB, a fermentação da lactose por bactérias produz ácido láctico, causando a acidez, a qual ainda é um dos problemas enfrentados pelos laticínios.

Da associação entre isolamento bacteriano (ISOB) (ausência ou presença) e as variáveis físico-químicas (Tab. 3) somente houve significância para acidez titulável (p<0,05). A equação de regressão encontrada foi:  $\text{Logit Pi} = (\text{ISOB}) - 18702 + (0,1472 \times \text{ACI})$ , com *odds ratio* de 1,15 (IC = 1,04 a 1,29 e p = 0,0077).

A acidez elevada é preditora do isolamento bacteriano, sendo o risco (*odds ratio*) de detecção bacteriana em caso de acidez elevada aumentado em 1,15 vezes quando comparado a amostras com acidez normal.

### Conclusão

SCN foram os microrganismos mais isolados em mastite caprina e a resistência *in vitro* dessas cepas frente a antimicrobianos como a ampicilina, a penicilina e a oxacilina, alertam para a limitação no uso desses antimicrobianos no tratamento da mastite caprina na região e o uso desses fármacos em medicina veterinária.

De acordo com os resultados obtidos e segundo a legislação vigente brasileira, alguns rebanhos não atenderam aos padrões físico-químicos exigidos e a CTB média obtida está acima do preconizado. Foi constatado que a acidez do leite é influenciada pelo isolamento bacteriano e a lactose foi a variável que mais afetou o valor de CTB.

Esses resultados vêm ratificar a necessidade de práticas de higiene, tanto na ordenha como na produção, a fim de que a população possa consumir seguramente tal alimento. Desta forma, fica clara a importância da implantação de sistemas de produção animal seguros, sobretudo no prisma higiênico-sanitário, contribuindo, assim, para a Saúde Pública, a Saúde Ambiental e a Segurança Alimentar.

### Referências

AGUIAR, V.M.P.; SOUZA, V.; BENEVIDES, S.D; MORORÓ, A.M. Determinação da Contagem de Células Somáticas, Contagem Bacteriana Total e presença de *Staphylococcus* spp. em amostras de leite de cabra produzidas no município de Afonso Bezerra –RN. In: VIII Congresso Nordeste de Produção Animal, 2013, Fortaleza. *Anais...* Fortaleza: [s.n.] 2013. (Resumo).

ALMEIDA, J.F.; AQUINO, M.H.C; MAGALHÃES, H. *et al.* Principais alterações no leite por agentes causadores de mastite no rebanho caprino dos estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro. *Arquivos do Instituto Biológico*, n.80, p.13-18, 2013.

ANDRADE, N.P.C.; PEIXOTO, R.M.; NOGUEIRA, D.M. *et al.* Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de *Staphylococcus* spp coagulase negativa de um rebanho leiteiro caprino em Santa Maria da Boa Vista – PE. *Medicina Veterinária*, n.6, p.1-6, 2012.

ATIQUÉ, T.S.C.; LIMA, T.A.M.; SOUZA, V.A. *et al.* Sensibilidade a meticilina/oxacilina de *Staphylococcus aureus* isolados da mucosa nasal de alunos do centro universitário de Rio Preto. *Revista Brasileira de Farmácia*, v.93, n.3, p. 347-352, 2012.

AYRES, M.; AYRES, J.R.M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.S. BioEstat 5.0-Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas: Sociedade Civil Mamirauá, Belém. CNPq, Brasília. 2007. 290p.

BAUER, A.W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. *American Journal of Clinical Pathology*, v. 45, n. 4, p. 493-496, 1966.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 37 de 31 de outubro de 2000. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite de Cabra. Brasília, D.F., 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 22 de 14 de Abril de 2003. Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos para controle de leite e produtos lácteos. Diário Oficial da União, Brasília, 2 de maio de 2003. Seção I, p.3.

BUENO, V.F.F.; MESQUITA, A.J.; OLIVEIRA, A.N. *et al.* Contagem bacteriana total do leite: relação com a composição centesimal e período do ano no Estado de Goiás. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v.15, n.1, p.40-44, 2008.

CAUWELIER, B. Evaluation of a disk diffusion method with cefoxitin (30µg) for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *European Journal Microbiology Infectious Disease*, v.23, p.389-392, 2004.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From animals; Approved Standard.4th.VET01-A4. 33(7), 2013. 94p.

CONTRERAS, A.; SIERRA, D.; SÁNCHEZ, A. *et al.* Mastitis in small ruminants. *Small Ruminant Research*, v.68, p.145-153, 2007.

COSTA, R.G.; MESQUITA, I.V.U.; QUEIROGA, R.C.R.E. *et al.* Características químicas e sensoriais do leite de cabras Moxotó alimentadas com silagem de maniçoba. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.37, n.4, p.694-702, 2008.

DAL POZZO, M.; VIEGAS, J.; SANTURIO, D.F. *et al.* Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a *Staphylococcus* spp. isolados de mastite caprina. *Ciência Rural*, v.41, p.667-672, 2011.

GARINO, J.R.F.; CAMBOIM, E.K.A.; DAS NEVES, P.B. *et al.* Suscetibilidade a antimicrobianos e produção de betalactamase em amostras de *Staphylococcus* isolados de mastite caprina no semiárido paraibano. *Arquivo Instituto Biológico*, v.78, p.103-7, 2011.

GUERREIRO, P.K.; MACHADO, M.R.F.; BRAGA, G.C. *et al.* Qualidade microbiológica de leite em função de técnicas profiláticas no manejo de produção. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 29, n. 1, p. 216-222, 2005.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M. *et al.* Diagnóstico Microbiológico. 6.ed. Rio de Janeiro, Editora MEDS, 2008.1565p

LANGONI, H.; DOMINGUES, P.F.; BALDINI, S. Mastite caprina: seus agentes e sensibilidade frente a antimicrobianos. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v.13, n.1, p.51-54, 2006.

LORA, S.C.P.; PRUDÊNCIO, E.S.; BENEDET, H.D. Avaliação sensorial de sorvetes elaborados com leite de cabra. *Ciências Agrárias*, v.27, n.2, p.221-230, 2006.

MENDES, C.G.; SILVA, J.B.A.; ABRANTES, M.R. Caracterização organoléptica, físico-química, e microbiológica do leite de cabra: uma revisão. *Acta Veterinaria Brasilica*, v.3, n.1, p.5-12, 2009.

MUNGATANA, N.K.; NGURE, R.M.; SHITANDI, A. *et al.* Effect of experimental *Staphylococcus aureus* mastitis on compositional quality of goat milk. *International Journal of Dairy Technology*, v.64, p-360-364, 2011.

OLIVEIRA, M.A.; FÁVARO, R.M.D.; OKADA, M.M. *et al.* Qualidade físico-química e microbiológica do leite de cabra pasteurizado e Ultra Alta Temperatura, comercializado na região de Ribeirão Preto-SP. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v.64, n.1, p.104-109, 2005.

PEREIRA, R.A.G.; QUEIROGA, R.C.R.E.; VIANNA, R.P.T.; OLIVEIRA, M.E.G. Qualidade química e física do leite de cabra distribuído no Programa Social “Pacto Novo Cariri” no Estado da Paraíba. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v.64, n.2, p.205-211, 2005.

PEREIRA, D.B.C.; SILVA, P.H.F.; COSTA JÚNIOR, L.C.G.; OLIVEIRA, L. L. Físico-química do leite e derivados: métodos analíticos. 2.ed. Juiz de Fora: Editora EPAMIG, 2001. 234p.

PEIXOTO, R.M.; FRANÇA, C.A.; SOUZA JÚNIOR, A.F. *et al.* Etiologia e perfil de sensibilidade antimicrobiana dos isolados bacterianos da mastite em pequenos ruminantes e concordância de técnicas empregadas no diagnóstico. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.30, n.9, p.735-740, 2010.

PRESTES, D.S.; FILAPP, I.A.; CECIM M.. Susceptibilidade à mastite: fatores que a influenciam: uma revisão. *Revista FZVA*, v.9, n.1, p.118-132, 2002.

QUEIROGA, R.C.R.E.; COSTA, R.G.; BISCONTINI, T.M.B. *et al.* Influência do manejo do rebanho, das condições higiênicas da ordenha e da fase de lactação na composição química do leite de cabras Saanen. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.36, p.430-437, 2007.

SALINA A., MACHADO G.P., GUIMARÃES F.F., LANGONI H. Sensibilidade microbiana de *Staphylococcus* spp. isolados de leite de cabras com mastite subclínica. *Veterinária e Zootecnia*, v.22, n.2, p. 288-294, 2015.

SANTOS, D.C.; MARTINS, J.N.; OLIVEIRA, E.N.A.; FALCÃO L. V. Caracterização de leite caprino comercializado na região do vale do Jaguaribe, Ceará. *Revista Verde*, v. 7, n. 2, p 289-295, 2012.

TONIN, F.B.; NADER FILHO, A. Influência do estágio de lactação, hora e número de ordenhas sobre o teor de cloretos no leite caprino. *Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.54 n.1, 2002.

### 3.3 CARACTERIZAÇÃO PROTEÔMICA DE *STAPHYLOCOCCUS* SPP. ORIUNDOS DE MASTITE CAPRINA E AVALIAÇÃO FENOGENOTÍPICA DA RESISTÊNCIA AOS BETA-LACTÂMICOS.

Enviado para o periódico Pesquisa Brasileira Veterinária.

#### **Caracterização Proteômica de *Staphylococcus* spp. oriundos de mastite caprina e avaliação fenogenotípica da resistência aos beta-lactâmicos**

Camila S. Pereira<sup>1\*</sup>, Lídia M.M. dos Santos<sup>1</sup>, Dayanne A. de Melo<sup>2</sup>, Cássia C. da Motta<sup>2</sup>, Shana M.O. Coelho<sup>2</sup>,  
Virginia L.A. Pereira<sup>1</sup>, Miliane M.S. de Souza<sup>2</sup>, Elmiro R. do Nascimento<sup>1</sup>

**ABSTRACT.-** Pereira C.S., Santos L.M.M., Melo D.A., Motta C.C., Coelho S.M.O., Pereira V.L.A., Souza M.M.S., Nascimento E.R. 2016. [**Proteomics Characterization of *Staphylococcus* spp. coming from goat mastitis and fenogenotípica assessment of resistance to beta-lactamics**] Caracterização Proteômica de *Staphylococcus* spp. oriundos de mastite caprina e avaliação fenogenotípica da resistência aos beta-lactâmicos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(00):00-00. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Pública, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Rua Dr. Vital Brazil Filho, 64, Vital Brazil, Niterói, RJ 24230-340, Brasil. E-mail: [camilaserva2@gmail.com](mailto:camilaserva2@gmail.com)

Mastitis occupies a prominent place among the diseases that affect the dairy herd, due to economic problems and public health. *Staphylococcus* spp. are infectious agents more involved in the etiology of caprine mastitis, especially coagulase-negative *Staphylococcus*. Nineteen samples isolated from subclinical mastitis goat, were characterized by proteomics technique MALDI-TOF MS, and 47.36% (9/19) identified as *Staphylococcus epidermidis*, 15.78% (3/19) as *Staphylococcus warneri*, 10.52% (2/19) as *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus caprae* and 5.26% (1/19) for both *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus simulans* and as *Staphylococcus cohnii*. All isolates characterized by MALDI-TOF were subjected to polymerase chain reaction (PCR) for the 16S rRNA gene of *Staphylococcus* spp. to confirm the gender. After determining the species were carried out tests for phenotypic detection of resistance to beta-lactamics: simple disk diffusion oxacillin, cefoxitin, penicillin G and amoxicillin + clavulanic acid, agar "screen" oxacillin and microdilution (MIC) cefoxitin. The disk diffusion test showed strength of 58% (11/19) for penicillin G, 26.31% (5/19) to cefoxitin and 26.31% (5/19) for oxacillin. All strains were susceptible to amoxicillin + clavulanic acid and agar "screen" oxacillin. In the MIC, 63.15% (12/19) of the samples were cefoxitin resistant (MIC > 4.0 g / ml). Then isolates were subjected to detection of the *mecA* resistance genes (Murakami et al. 1991; Melo et al. 2014) and regulators (*mecl* and *mecRI*), *mecC* and *blaZ*. Two samples of *Staphylococcus epidermidis* had the *mecA* gene proposed by Murakami et al. All isolates were negative for the *mecA* gene variant (Melo et al., 2014), *mecl*, *mecRI*, *mecC* and *blaZ*. The high phenotypic resistance rate accompanied by a low genotype detection in *Staphylococcus* spp., may be related to changes triggered by changes in the genes, phages, plasmids and transposons. These findings reinforce the importance of this group of microorganisms in the etiology of subclinical mastitis in goats and opens perspectives for future research to investigate the epidemiology of the disease.

INDEX TERMS: Goat mastitis, resistance beta-lactamics, *Staphylococcus* spp.

**RESUMO.-** A mastite ocupa lugar de destaque entre as doenças que acometem o rebanho leiteiro, em virtude de problemas econômicos e de saúde pública. *Staphylococcus* spp são os agentes infecciosos mais envolvidos na etiologia das mastites caprinas, principalmente *Staphylococcus* coagulase negativo.

Dezenove amostras isoladas de mastite caprina subclínica, foram caracterizadas pela técnica proteômica MALDI-TOF MS, sendo 47,36% (9/19) identificadas como *Staphylococcus epidermidis*, 15,78% (3/19) como *Staphylococcus warneri*, 10,52% (2/19) como *Staphylococcus caprae* e *Staphylococcus aureus* e 5,26% (1/19) tanto para *Staphylococcus lugdunensis*, como para *Staphylococcus simulans* e *Staphylococcus cohnii*. Todos os isolados caracterizados pelo MALDI-TOF, foram submetidos a reação em cadeia da polimerase (PCR) para o gene 16rRNA de *Staphylococcus* spp. para a confirmação do gênero. Após a determinação da espécie foram realizadas as provas para a detecção fenotípica de resistência aos beta-lactâmicos: difusão em disco simples de oxacilina, cefoxitina, penicilina G e amoxicilina + ácido clavulânico, ágar “screen” de oxacilina e microdiluição em caldo (MIC) de cefoxitina. O teste de difusão em disco demonstrou resistência de 58% (11/19) para penicilina G, 26,31% (5/19) para cefoxitina e 26,31% (5/19) para oxacilina. Todas as amostras foram sensíveis a amoxicilina + ácido clavulânico e ao ágar “screen” de oxacilina. À MIC, 63,15% (12/19) das amostras foram resistentes a cefoxitina (MIC > 4,0 µg/ml). Em seguida os isolados foram submetidos a detecção dos genes de resistência *mecA* (MURAKAMI et al, 1991; MELO et al, 2014) e seus reguladores (*mecI* e *mecRI*), *mecC* e *blaZ*. Duas amostras de *Staphylococcus epidermidis* apresentaram o gene *mecA* proposto por MURAKAMI e colaboradores. Todos os isolados foram negativos para o gene *mecA* variante (MELO et al, 2014), *mecI*, *mecRI*, *mecC* e *blaZ*. A elevada taxa de resistência fenotípica acompanhada por uma baixa detecção genotípica nos isolados de *Staphylococcus* spp., pode estar relacionada a alterações nos genes desencadeadas por mutações, fagos, plasmídeos e transposons. Tais achados reforçam a importância deste grupo de microrganismos na etiologia da mastite subclínica em caprinos e abre perspectivas para futuras pesquisas para a investigação da epidemiologia da doença.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Mastite caprina, resistência a beta-lactâmicos, *Staphylococcus* spp.

## INTRODUÇÃO

A mastite é o processo inflamatório da glândula mamária considerada uma das principais doenças que acometem os rebanhos de caprinos leiteiros, associada a perdas na produção e prejuízos econômicos ao produtor e à indústria (Almeida et al., 2013). Bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. estão entre os principais agentes etiológicos da mastite caprina e são frequentemente resistentes aos antimicrobianos, em especial aos beta-lactâmicos, limitando assim, a escolha do antimicrobiano para o tratamento das infecções causadas por este agente (Garino Júnior et al 2011, Almeida et al. 2013).

Mudanças recentes na taxonomia de algumas espécies do gênero *Staphylococcus* tornou a diferenciação das espécies mais dificultosa, principalmente em Medicina Veterinária. Deste modo, o uso de marcadores moleculares associados ao diagnóstico fenotípico, possibilita uma caracterização mais confiável e precisa (Motta et al. 2014).

A análise proteômica por espectrometria de massa MALDI-TOF vem ganhando espaço, impulsionada por vantagens como custo-benefício, resultados rápidos e precisos (Bannoehr & Guardabassi 2012), permitindo a identificação de diferentes microrganismos ao nível de espécies, com uma quantidade mínima de amostra, baixo custo, níveis insignificantes de resíduos químicos e biológicos gerados e tempo para obtenção de resultados extraordinariamente curto (Cherkaoui et al. 2010, Alatoon et al. 2011, Carbonnelle et al. 2011).

A resistência estafilocócica aos antimicrobianos beta-lactâmicos deve-se principalmente a dois mecanismos: a produção da enzima extracelular beta-lactamase, codificada pelo gene *blaZ*, e a produção de PBP2a ou PBP2', uma proteína ligante de penicilina de baixa afinidade, codificada pelo gene *mecA*. O gene *blaZ* geralmente está alocado em plasmídeos, podendo também ser cromossomal (Kuroda et al. 2001, Lowy 2003). O gene *mecA* está inserido num elemento genético móvel, denominado cassete estafilocócico cromossômico *mec* (SCC*mec*), composto por diversos elementos genéticos essenciais: o complexo *mec*, composto pela ilha de patogenicidade *IS431*, os genes *mecA* e seus reguladores *mecI* e *mecR1*, e o complexo *ccr* (Cassete Chromosome Recombinases), caracterizado pela presença de genes que codificam recombinases (Weller 2000, Ma et al. 2002).

São escassos os estudos conduzidos para a investigação do perfil de sensibilidade e verificação de genes de resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos em *Staphylococcus* spp. isolados de mastite caprina. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo caracterizar os isolados através da técnica de MALDI-TOF e identificar o perfil fenogenotípico de resistência aos beta-lactâmicos em amostras de *Staphylococcus* spp. oriundas de leite de cabras com mastite subclínica provenientes de rebanhos leiteiros do Estado de Rio de Janeiro.

## MATERIAL E MÉTODOS

De um total de 140 amostras de leite caprino (uma amostra por animal) foram obtidos 19 isolados de *Staphylococcus* spp., caracterizando casos de mastite caprina subclínica, que foram estocadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  em caldo Brain Heart Infusion (BHI) adicionado de glicerol a 10%.

**Identificação por MALDI-TOF MS.** Os isolados foram avaliados pela técnica do Tempo de Vôo de Ionização/Desorção por Laser Assistida por Matriz (MALDI-TOF). Para o preparo das amostras, os isolados foram cultivados em ágar BHI a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. Cada cultura bacteriana foi transferida para a microplaca (96 MSP, Bruker - Billerica, EUA) e, ao sedimento bacteriano, foi adicionada uma solução de lise (ácido fórmico 70%, Sigma-Aldrich®) em quantidade suficiente para cobri-lo. Em seguida,  $1\ \mu\text{L}$  de solução da matriz (ácido alfa-ciano-4-hidroxi-cinâmico diluído em acetonitrila 50% e ácido trifluoracético 2,5%, Sigma-Aldrich®) foi utilizado para cobrir o extrato bacteriano, para finalmente ser processado. Os espectros de cada amostra foram gerados em um espectrômetro de massa (MALDI-TOF LT Microflex Bruker, Bruker®) equipado com laser de 337 nm de nitrogênio no modo linear controlado pelo programa FlexControl 3.3 (Bruker®). Os espectros foram coletados na faixa de massas entre 2.000-20.000 m/s e, posteriormente, analisados pelo programa MALDI Biotyper 2.0 (Bruker®), com as configurações padronizadas para identificação bacteriana. O programa confrontou os espectros da amostra desconhecida com amostras de referência em um banco de dados. Os resultados obtidos variaram em uma escala que vai de zero a três, sendo que quanto maior o valor, mais confiável é a identificação. Neste trabalho, foram considerados como uma identificação aceitável aquelas que apresentaram valores iguais ou superiores a dois.

**Caracterização genotípica das espécies de *Staphylococcus* spp.** As análises genotípicas foram realizadas no Laboratório de Bacteriologia Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Os 19 isolados estudados foram repicados em ágar BHI, e submetidos a extração de DNA para análises genotípicas.

Para extração do DNA total, cada isolado foi cultivado em 5 ml de caldo BHI a temperatura ambiente por 12-16 horas a 150 rpm. Em seguida  $1,5\ \text{ml}$  da cultura foi transferida para microtubos de  $1,5\ \text{ml}$  e centrifugado por 5 minutos a  $1239g$  e o sobrenadante foi descartado, com repetição de três vezes. As células foram ressuspensas em  $600\ \mu\text{L}$  de solução de extração (TrisHCl 200 mM pH 8,0; EDTA 25 mM pH 8,0; SDS 1%, NaCl 25 mM) e agitadas em Vortex, seguidas de incubação a  $65^{\circ}\text{C}$  por 30 min. Após o tempo estipulado, os tubos foram resfriados a temperatura ambiente e foi adicionado  $600\ \mu\text{L}$  de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico[1-1(24:1)], seguido de uma homogeneização por 2 minutos e centrifugação a  $14549g$  por 10 minutos. A fase superior foi transferida para um novo microtubo (aproximadamente  $400\ \mu\text{L}$ ) e adicionado 2 volumes de etanol 100 % gelado, seguido de incubação a  $20^{\circ}\text{C}$  por 2 ou 12 horas para a precipitação do DNA. Posteriormente, os microtubos foram centrifugados a  $14549g$  por 30 minutos, sendo o sobrenadante descartado e o sedimento lavado com etanol 70 % (aproximadamente  $500\ \mu\text{L}$ ). Depois de seco a temperatura ambiente em uma capela de exaustão, os sedimentos foram ressuspensos em  $30\ \mu\text{L}$  de água ultrapura e armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Para quantificação do DNA total extraído, as amostras foram aplicadas com  $1\ \mu\text{L}$  de SYBR Green (INVITROGEN) diluído no gel de agarose 0,8 % e submetidas à eletroforese. Em seguida, o gel foi revelado com SYBR Green (INVITROGEN) pelo sistema de captura de imagem L-PIX EX (Loccus Biotecnologia). A estimativa da concentração de DNA foi feita por comparação com o padrão de intensidade de banda do marcador Lambda ( $\lambda$ ) (Promega®), nas concentrações de 25 e 50 ng. A qualidade foi determinada pela ausência de rastro ao longo do gel.

As concentrações utilizadas em todas as reações de PCR foram Tampão 1X (10 mM Tris-HCl; 50 mM KCl, e 0,1% Triton X-100, 2,0 mM de  $\text{MgCl}_2$ ; pH 9,0),  $0,3\ \mu\text{M}$  de cada primer, 0,2 mM de dNTP (FERMENTAS), 1 U de Dream Taq™ Green DNA Polimerase (FERMENTAS) e água mili-Q para completar um volume total de reação de  $20\ \mu\text{L}$ , e cerca de 20 ng de DNA total.

Os fragmentos foram avaliados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, contendo corante SYBR Green (INVITROGEN) e visualizados diluído, possibilitando a visualização pelo sistema de captura de imagem L-PIX EX (Loccus Biotecnologia).

A caracterização genotípica foi realizada pela amplificação utilizando *primers* específicos para o gênero *Staphylococcus* (Zhang et al. 2004) (Quadro 1).

**Quadro 1. Primers empregados para identificação de espécies de *Staphylococcus* spp.**

| Gene/Tamanho do fragmento | Espécie | Sequência dos primers (5'-3') | Ciclo* |
|---------------------------|---------|-------------------------------|--------|
|---------------------------|---------|-------------------------------|--------|

|                     |                               |  |   |
|---------------------|-------------------------------|--|---|
| 16S rRNA<br>(756pb) | <i>Staphylococcus</i><br>spp. | AAC TCT GTT ATT AGG GAA GAA CA<br>CCA CCT TCC TCC GGT TTG TCA CC | 1 |
|---------------------|-------------------------------|--|---|

\* 1. (94 °C 40 s, 64° C 1 min., 72 °C 1 min 12 s) x 30.

**Deteção fenotípica da resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos.** Os testes de detecção fenotípica da resistência foram executados conforme os padrões estabelecidos pelo *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI, 2013).

A técnica de difusão em disco simples foi realizada com os seguintes antimicrobianos: Cefoxitina, Oxacilina, Penicilina G e Amoxicilina + Ácido Clavulânico.

Para a realização do Ágar “Screen”, os isolados de *Staphylococcus* spp. foram semeados na superfície do meio de cultura acrescido a uma concentração final de 6 µg/mL de oxacilina e após 24 horas de incubação a 37 °C, qualquer colônia crescida foi considerada resistente (CLSI 2013).

Foi realizado o método de microdiluição em caldo (MIC) utilizando o antimicrobiano cefoxitina, para determinar a resistência a oxacilina mediada pelo gene *mecA* (CLSI 2013).

**Deteção de genes de resistência à oxacilina de *Staphylococcus* spp.** Foi realizada a técnica de PCR para amplificação dos genes: *mecA* (Murakami et al. 1991), *mecA* variante (Melo et al. 2014), *mecI* (Lencastre & Oliveira 2002), *mecRI* (Rosato et al. 2003), *mecC* (Steegeer et al. 2012) e *blaZ* (Rosato et al. 2003) (Quadro 2).

#### **Quadro 2. Primers empregados para a amplificação dos genes de resistência**

| Gene/Tamanho do fragmento          | Sequência dos primers(5'-3')                                       | Ciclo* |
|------------------------------------|--|--------|
| <i>mecA</i> (Murakami)<br>(533 pb) | AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C<br>AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C     | 1      |
| <i>mecA</i> (Melo)<br>(809 pb)     | CAG GCA TGC AGA AAA ATC AA<br>TTG AGT CGA ACC AGG TGA TG           | 2      |
| <i>mecI</i><br>(209 pb)            | ATC AAG ACT TGC ATT CAG GC<br>GCG GTT TCA ATT CAC TTG TC           | 3      |
| <i>mecRI</i><br>(234 pb)           | CCA AAC CCG ACA ACT AC<br>CGT GTC AGA TAC ATT TCG                  | 4      |
| <i>mecC</i><br>(138 pb)            | GAA AAA AAG GCT TAG AAC GCC TC<br>GAA GAT CTT TTC CGT TTT CAG C    | 5      |
| <i>mecC</i><br>(718 pb)            | GAA AAA AAG GCT TAG AAC GCC TC<br>CCT GAA TC[W] GCT AAT AAT ATT TC | 6      |
| <i>blaZ</i><br>(861 pb)            | TAC AAC TGT AAT ATC GGA GG<br>CAT TAC ACT CTT GGC GGT TT           | 7      |

\*1. (94 °C 1 min, 55 °C 1 min., 72 °C 1 min) x 30 e 72 °C 10min; 2. 95 °C 5 min (94 °C 1 min, 50 °C 1 min, 72 °C 1 min) x 30 e 72 °C 10 min. 3. 94 °C 4 min ( 94 °C 30 seg, 53 °C for 30 seg, 72 °C for 1 min) x 30 e 72 °C 4 min. 4. 95 °C 2 min. (95 °C 1 min, 53 °C 1 min., 72 °C 1 min) x 30 e 72 °C 7 min.; 5. 94 °C 15 min (94 °C 30 seg, 59 °C 1 min, 72 °C 1 min)x 30 e 72 °C 10 min 6. 94 °C 15 min (94 °C 30 seg, 50 °C 1 min, 72 °C 1 min)x 35 e 72 °C 10 min 7. 94°C 5min. (94°C 30s, 58°C 30s, 72°C 30s) x 35 e 72°C 5min.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

A técnica de MALDI-TOF identificou 47,36% (9/19) como *Staphylococcus epidermidis*, 15,78% (3/19) como *Staphylococcus warneri*, 10,52% (2/19) como *Staphylococcus caprae* e *Staphylococcus aureus* e 5,26% (1/19) tanto para *Staphylococcus lugdunensis*, como *Staphylococcus simulans* e *Staphylococcus cohnii* (Tabela 1). Esse resultado corrobora com diversos estudos sobre a etiologia da mastite caprina no Brasil que apontam para o *Staphylococcus coagulase negativa* como os microrganismos mais frequentes (Langoni et al. 2006, Peixoto et al. 2010, Almeida et al. 2013, Cavalcante et al. 2013). As 19 amostras amplificaram o gene 16S rRNA para *Staphylococcus* spp.

Os testes fenotípicos de detecção de resistência aos beta-lactâmicos demonstraram que 58% (11/19) dos isolados foram resistentes a penicilina G e 26,31% (5/19) tanto para a cefoxitina como para a oxacilina. Nenhum isolado apresentou resistência ao antimicrobiano amoxicilina + ácido clavulânico. Todas as amostras foram sensíveis a oxacilina no Ágar "Screen". A elevada frequência de amostras com resistência à penicilina pode estar associada ao uso frequente ou mesmo subdosagens desse beta-lactâmico na terapia da mastite e de outras enfermidades de rebanhos caprino (Garino Júnior et al. 2011, Almeida et al. 2013).

Constatou-se que a associação de um antimicrobiano betalactâmico e de um inibidor de beta-lactamase (amoxicilina+ácido clavulânico) foi mais eficaz, com 100% de sensibilidade. Em casos clínicos humanos, a utilização de inibidor da beta-lactamase é uma alternativa para bactérias resistentes a beta-lactâmicos (Gentilini et al. 2002), porém no sistema de produção animal, por esse antimicrobiano ter custo elevado, provavelmente inviabiliza sua utilização como alternativa no tratamento de animais doentes.

**Quadro 3. Perfil fenogenotípico de resistência aos beta-lactâmicos dos isolados de *Staphylococcus* spp identificados pelo MALDI-TOF.**

| Identificação MALDI-TOF           | CFO | OXA | PEN | AMC | MIC CFO * | <i>mecA</i> (Murakami) |
|-----------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----------|------------------------|
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | S   | S   | R   | S   | S         | -                      |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | S   | S   | R   | S   | R ≥ 16,0  | +                      |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | S   | S   | R   | S   | S         | -                      |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | S   | S   | R   | S   | S         | -                      |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | S   | S   | R   | S   | S         | -                      |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | S   | R   | R   | S   | S         | -                      |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | R   | R   | R   | S   | R ≥ 8,0   | -                      |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | S   | S   | R   | S   | R ≥ 8,0   | -                      |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | S   | R   | R   | S   | R ≥ 8,0   | +                      |
| <i>Staphylococcus warneri</i>     | R   | R   | S   | S   | R ≥ 8,0   | -                      |
| <i>Staphylococcus warneri</i>     | S   | S   | S   | S   | R ≥ 8,0   | -                      |
| <i>Staphylococcus warneri</i>     | S   | S   | S   | S   | R ≥ 8,0   | -                      |
| <i>Staphylococcus simulans</i>    | S   | S   | S   | S   | R ≥ 8,0   | -                      |
| <i>Staphylococcus caprae</i>      | S   | S   | S   | S   | S         | -                      |
| <i>Staphylococcus caprae</i>      | S   | S   | S   | S   | S         | -                      |
| <i>Staphylococcus cohnii</i>      | R   | S   | R   | S   | R ≥ 16,0  | -                      |
| <i>Staphylococcus lugdunensis</i> | S   | S   | S   | S   | R ≥ 8,0   | -                      |
| <i>Staphylococcus aureus</i>      | R   | S   | S   | S   | R ≥ 8,0   | -                      |
| <i>Staphylococcus aureus</i>      | R   | R   | R   | S   | R ≥ 8,0   | -                      |

CFO - cefoxitina; OXA - oxacilina; PEN – penicilina G; AMC - amoxicilina com ácido clavulânico; MIC CFO - microdiluição em caldo com cefoxitina. R- resistente; S- sensível. \* µg/ml

À MIC, 63,15% (12/19) das amostras foram resistentes a cefoxitina, sendo que 52,63% (10/19) com MIC ≥ 8,0 µg/ml e 10,52% (2/19) com MIC ≥ 16 µg/ml (Quadro 3). No MIC, o mesmo isolado de *Staphylococcus epidermidis* que apresentou resistência a cefoxitina, produziu resistência também a oxacilina e penicilina G no teste de difusão em disco, além da positividade para o gene *mecA*. Porém, no

restante dos isolados que apresentaram resistência nesse teste, o gene *mecA* não foi detectado. Este fato pode ser justificado pela perda do gene e pela utilização de outra forma de resistência.

Van Griethuysen et al. (2005) realizaram um estudo onde ficou demonstrada a perda do gene *mecA* em isolados mantidos sob congelamento. Neste estudo, os isolados foram mantidos nesta condição até o momento da análise molecular. Este resultado indica que, apesar da alta especificidade, e da técnica de caracterização genotípica molecular ser considerada definitiva para comprovação da presença do gene, a sensibilidade da mesma pode variar com a forma e tempo de conservação das amostras.

A resistência fenotípica à oxacilina é extremamente variável e dependente da expressão do gene *mecA*. Essa variabilidade é reconhecida como heterorresistência fenotípica, e se caracteriza pelo fato de que toda população bacteriana heterogeneamente resistente, carrega o gene *mecA*, marcador genotípico da resistência, porém nem todas expressam fenotipicamente sua resistência da mesma forma (Cauwelier et al. 2004).

Dois isolados de *Staphylococcus epidermidis* foram positivos para o gene *mecA* proposto por Murakami et al. (1991) (Quadro 3). Todos os isolados estudados foram negativos para o gene *mecA* proposto por Melo et al. (2014), que caracterizou uma variante do gene *mecA* em isolados de mastite bovina. Não foram observados isolados positivos para os reguladores *mecI* e *mecRI*, o homólogo do gene *mecA*, *mecC* e para o gene *blaZ*.

Em estudos realizados com isolados de *Staphylococcus* spp. provenientes de mastite caprina subclínica no Brasil por França et al. (2012) e Peixoto et al. (2013) foram observadas resistência a oxacilina de 15,8% e 54,5%, respectivamente, no teste de difusão de discos, mas em nenhum deles foi positivo para o gene *mecA*. Entretanto, 40,2% e 33,3%, respectivamente, desses mesmos isolados continham o gene *blaZ*.

A identificação do gene *mecA* em dois isolados de *Staphylococcus* spp. reforça a sua importância epidemiológica e significância na mastite caprina, uma vez que estas estirpes tendem a dificultar o tratamento, mesmo quando são agentes etiológicos secundários, aumentando a tendência à cronificação da enfermidade e possibilidades de disseminação entre os animais. Além disso, o carregamento de genes de resistência antimicrobiana por esses microrganismos em ambiente de produção leiteira representa um risco potencial para sanidade animal e saúde pública, tanto pela transferência genética interespecífica, incluindo para *Staphylococcus aureus*, como pela transmissão direta de patógenos resistentes para os humanos.

Outras classes de PBPs (por exemplo, PBP3 e PBP4) podem estar relacionadas a resistência aos beta-lactâmicos. Memmi et al. (2008) reportam ser a PBP4 o elemento chave para a resistência aos beta-lactâmicos em cepas *S. aureus* resistentes a metilina adquiridas na comunidade (CA-MRSA) e que a PBP2a, produto do gene *mecA*, não é determinante para a resistência a oxacilina.

A elevada taxa de resistência fenotípica acompanhada por uma baixa detecção genotípica nos isolados de *Staphylococcus* spp., pode estar relacionada a alterações nos genes desencadeadas por mutações, fagos, plasmídeos e transposons. Desta forma, a multiplicidade de fatores associados à resistência aos beta-lactâmicos requer uma investigação minuciosa. A detecção de diferentes marcadores genéticos de resistência, bem como o estudo da regulação da expressão gênica do sistema *mec*, permitem aprofundar a compreensão do real valor de sua detecção na predição da resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos, conforme preconizado pelo CLSI.

## CONCLUSÃO

O presente estudo confirmou a prevalência de *Staphylococcus* spp. nos casos de mastite caprina. Dentre os *Staphylococcus* coagulase negativa, a maior frequência encontrada foi para o *Staphylococcus epidermidis* (47,36%).

Os isolados de *Staphylococcus* spp. apresentaram elevada resistência à penicilina, sendo a associação beta-lactâmico e inibidor de beta-lactamase o antimicrobiano mais efetivo (100% sensibilidade), possivelmente pelo uso restrito na terapêutica veterinária.

A presença do gene *mecA* foi detectada em dois isolados, que também apresentaram características de resistência. Tais achados reforçam a importância deste grupo de microrganismos na etiologia da mastite subclínica em caprinos e abre perspectivas para futuras pesquisas para a investigação da epidemiologia da doença.

## REFERÊNCIA

Alatoom A.A., Cunningham S. A., Ihde S.M.; Mandrekar J. & Patel R. 2011. Comparison of direct colony method versus extraction method for identification of gram-positive cocci by use of Bruker Biotyper

- Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*. 49: 2868–2873.
- Almeida J.F, Aquino M.H.C., Magalhães H., Nascimento E.R., Pereira V.L.A., Ferreira T. & Barreto M.L. 2013. Principais alterações no leite por agentes causadores de mastite no rebanho caprino dos estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro. *Arq. Inst. Biol.* 80(1):13-18.
- Bannoehr J. & Guardabassi L. 2012. *Staphylococcus pseudintermedius* in the dog: taxonomy, diagnostics, ecology, epidemiology and pathogenicity. *Veterinary Dermatology*. 23:253-e52.
- Carbonnelle E., Mesquita C., Bille E., day N., Dauphin B., Beretti J. L., Ferroni A., Gutmann L. & Nassif X. 2011. MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clinical Biochemistry*. 44:104–109.
- Cauwelier B., Gordts B., Descheemaeker P. & Van Landuyt H. 2004. Evaluation of a disk diffusion method with cefoxitin (30µg) for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *European Journal Microbiology Infectious Disease*. 23:389-392.
- Cavalcante M.P., Alzamora Filho F., Almeida M.G.Á.R., Silva N.S., Barros C.G.G. & Silva M.C.A. 2013. Bactérias envolvidas nas mastites subclínicas cabra da região de salvador, Bahia. *Arq. Inst. Biol., São Paulo*. 80(1):19-26.
- Cherkaoui A., Hibbs J. & Emonet S. 2010. Comparison of two matrix assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine bacterial speciation. *Journal of Clinical Microbiology*. (48): 1169–1175.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2013. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals; Approved Standards - Fourth Edition. CLSI document VET01-A4 (ISBN 1-56238-878-9). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2013. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals; Approved Standards; Second Informational Supplement. CLSI document VET01-S2 (ISBN 1-56238-880-0). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA.
- França C.A., Peixoto R.M., Cavalcante M.B., Melo N.F., Oliveira C.J.B., Veschi J.L.A., Mota R.A. & Costa M.M. 2012. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. from small ruminant mastitis in Brazil. *Pesq. Vet. Bras.*, 32(8):747-753.
- Garino J.R.F., Camboim E.K.A., Das Neves P.B., De Sá A.V.V. & Almeida A.P. 2011. Suscetibilidade a antimicrobianos e produção de betalactamase em amostras de *Staphylococcus* isolados de mastite caprina no semiárido paraibano. *Arq Inst Biol.* 78:103-7.
- Gentilini E., Denamiel G., Betancor A., Rebuelto M., Fermepin M.R. & De Torres R.A.J. 2002. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis in Argentina. *Am. Dairy Sci.* 85:1913-1917.
- Kuroda M., Ohta T., Uchiyama I., Baba T., Yuzawa H.I., Kobayashi L., Cui A., Oguchi K., Aoki Y. & Nagai J. 2001. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *New Engl. J. Med.* 319:157-61.
- Langoni H., Domingues P.F. & Baldini S. 2006. Mastite caprina: seus agentes e sensibilidade frente a antimicrobianos. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*. 13(1):51-54.
- Lencastre H. & Oliveira D.C. 2002. Multiplex PCR Strategy for Rapid Identification of Structural Types and Variants of the mec Element in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46(7):2155-2161.

- Lowy F.D. 2003. Antimicrobial resistance: The example of *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Invest. 111:1265-1273.
- Ma X.X., Ito T., Tiensasitorn C., Jamklang M., Chongtrakool P., Boyle-Vavra S., Daum R.S. & Hiramatsu K. 2002. Novel type of staphylococcal cassette chromosome *mec* identified in community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains. Antimicrob. Agents Chemother. 46(4):1147-1152.
- Melo D.A., Coelho I.S., Motta C.C., Rojas A.C.C.M., Dubenczuck F.C., Coelho S.M.O. & Souza M.M.S. 2014. Impairments of *mecA* gene detection in bovine *Staphylococcus* spp. Brazilian Journal of Microbiology (Online) JCR. 45:1075-1082.
- Memmi G., Filipe S.R., Pinho M.G., Fu Z. & Cheung A. 2008. *Staphylococcus aureus* PBP4 is essential for  $\beta$ -lactam resistance in in community--acquired methicillin resistant strains. Antimicrob. Agents Chemother. 52(11):3955-3966.
- Motta C.C., Rojas A.C.C.M., Dubenczuck F.C., Botelho L.A.B., Moreira B.M., Coelho S.M.O., Coelho I.S., Souza M.M.S. 2014. Verification of molecular characterization of coagulase positive *Staphylococcus* from bovine mastitis with matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI TOF MS) mass spectrometry. Afr. J. Microbial. Res. 48(8):3861-3866.
- Murakami K.W., Minamide K., Wada W., Nakamura E., Teraoka H. & Watanbe S. 1991. Identification of methicillin resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. Journal of Clinical Microbiology. 29:2240-2244.
- Peixoto R.M., Mota R.A. & Costa M.M. 2010. Mastite em pequenos ruminantes no Brasil. Pesq. Vet. Bras., 30:754-62.
- Peixoto R.M., Peixoto R.M., Alves A.P.P., Peixoto L.J.S., Reges A.M. & Costa M.M. 2013. Genes de resistência a antimicrobianos e produção de biofilme em *Staphylococcus* spp. isolados de caprinos leiteiros. Vet. e Zootec. 20(2 Supl 1): 343-344.
- Rosato A.E., Kreiswirth B.N., Graig W.A., Eisner W., Climo M.W. & Aecher G.L. 2003. *mecA-blaZ* corepressors in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. Antimicrob. Agents Chemother. 47:1463-1466.
- Steegeer M., Andersen P.S., Kearns A., Pichon B., Holmes M.A., Edwards G., Laurent F., Teale C., Shov R. & Larsen A. R. 2012. Rapid detection, differentiation and typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harbouring either *mecA* or the new *mecA* homologue *mecA<sub>LGA251</sub>*. Clinical Microbiology and Infection. 18 (4):395-400.
- Van Griethuysen A., Van Loo I., Van Belkum A., Vandenbroucke-Grauls C., Wannet W. & Van Keulen P. 2005. Loss of the *mecA* gene during storage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. J Clin Microbiol. 43(3):1361-65.
- Weller T.M.A. 2000. The distribution of *mecA*, *mecRI* and *mecI* and sequence analysis of *mecI* and the *mec* promoter region in staphylococci expressing resistance to methicillin. J. Antimicrob. Chemother. 43:15-22.
- Zhang K., Sparling J., Chow B.L., Elsayed S., Hussain Z., Church D.L., Gregson D.B., Louie T. & Conly J.M. 2004. New quadruplex PCR assay for detection of methicillin and mupirocin resistance and simultaneous discrimination of *Staphylococcus aureus* from coagulase-negative staphylococci. Journal of Clinical Microbiology. 42(11):4947-4955.

### 3.4 PESQUISA DE RESÍDUO DE ANTIBIÓTICOS EM LEITE DE CABRA *IN NATURA* PRODUZIDOS NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO PELO MÉTODO DE MULTIRRESÍDUO POR LC-QTOF-MS E LC-MS/MS

Trabalho preparado para envio para periódico Ciência Rural

#### **Pesquisa de resíduo de antimicrobianos em leite de cabra *in natura* produzidos no Estado do Rio de Janeiro pelo método de multirresíduo por LC-QTOF-MS e LC-MS/MS**

Camila S. Pereira<sup>1\*</sup>, Lídia M.M. dos Santos<sup>1</sup>, Louise Jank<sup>2</sup>, Magda Targa Martins<sup>2</sup>, Fabiano Barreto<sup>2</sup>, Elmiro R. do Nascimento<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal Fluminense - Rua Vital Brasil Filho, 64, CEP:24.230-340. Niterói, RJ.

<sup>2</sup>Laboratório Nacional Agropecuário – LANAGRO/RS, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento;

**RESUMO.** A presença de resíduos de antimicrobianos representa a principal contaminação química em leite e produtos lácteos. O leite com antimicrobianos é considerado impróprio para o consumo, representando riscos para a saúde, além da possibilidade de interferência nos processos tecnológicos de produção. Uma das medidas de fortalecimento da caprinocultura leiteira no país corresponde ao monitoramento da qualidade do leite produzido e a pesquisa de resíduos de antimicrobianos no leite. Considerando a importância em saúde pública e para a indústria, o objetivo do trabalho foi pesquisar a presença de resíduo de antimicrobianos em leite de cabra *in natura* produzidos no Estado do Rio de Janeiro. Foram coletados 133 amostras de leite de cabra de nove rebanhos leiteiros localizados no Estado do Rio de Janeiro. A metodologia utilizada foi o método multirresíduos em leite para diferentes grupos de antimicrobianos pela cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa de alta resolução (LC-QTOF-MS) e a cromatografia líquida acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS/MS). A análise de resíduo de antimicrobianos foi realizada no Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas e Medicamentos Veterinários do Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO) no Estado do Rio Grande do Sul. Nenhuma amostra apresentou

resíduo acima dos limites máximos permitidos. Apesar disso, a implantação de um programa de monitoramento de resíduos no leite da espécie caprina no país é essencial para a obtenção de um produto final de qualidade e seguro.

Palavras-chave: Leite de cabra, Resíduo Antimicrobiano, Cromatografia Líquida.

**ABSTRACT.** The presence of antibiotic residues is the main chemical contamination in milk and milk products. Milk with antibiotics is considered unfit for consumption, representing health risks and the possibility of interference in the technological processes of production. One of the building measures of dairy goat in the country is the monitoring of the quality of milk produced and antibiotic residues in milk. Considering the importance of public health and industry, the aim of the study was to investigate the presence of antibiotic residue in goat fresh milk produced in the state of Rio de Janeiro. We collected 133 samples of goat milk from nine dairy herds located in the State of Rio de Janeiro. The methodology used was the method multiresidues milk for different groups of antimicrobials by liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry (LC-QTOF-MS) and liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS / MS). The antimicrobial residue analysis was performed on Pesticide Residue Analysis Laboratory and Veterinary Medicinal Products of the National Agricultural Laboratory (LANAGRO) in the state of Rio Grande do Sul. No samples showed residue above the maximum allowable limits. Nevertheless, the implementation of a waste monitoring program in goats milk in the country is essential to achieving a final production quality and safe.

Keywords: Goat milk, antimicrobial residue, Liquid Chromatography.

## INTRODUÇÃO

Os antimicrobianos são amplamente utilizados no tratamento de doenças na medicina veterinária e também como suplementos em sua dieta. Contudo, podem caracterizar perigos relacionados ao risco de intoxicações de origem alimentar para os humanos quando administrados indiscriminadamente (Santos et al., 2007). Devido a este fato, o monitoramento dos resíduos de medicamentos veterinários em alimentos tornou-se uma área de preocupação constante dos consumidores, órgãos reguladores e instituições de pesquisa (ANVISA, 2003; Gatica & Gesche, 2007).

Em animais leiteiros, tais como bovinos, caprinos e ovinos, os antimicrobianos são comumente administrados para tratamento de mastites, doenças respiratórias e do trato reprodutivo. A principal fonte de resíduos de antimicrobianos no leite é originada do manejo inadequado dessas drogas e podem causar vários efeitos indesejáveis, como seleção de cepas bacterianas resistentes, hipersensibilidade e possível choque anafilático em indivíduos

alérgicos a essas substâncias, desequilíbrio da flora intestinal, como também, efeito teratogênico (Albuquerque et al., 1996; Costa, 1996; Van Schaik et al., 2002; Shitandi & Sternesjö, 2004).

Além disso, estes resíduos no leite interferem no processo industrial de derivados, inviabilizando a produção destes e, conseqüentemente, causando também sérios prejuízos econômicos, como, por exemplo, inibindo fermentos lácticos que são culturas de microrganismos usadas na produção de iogurtes, queijos e outros derivados (Van Schaik et al., 2002).

No setor agropecuário nacional, o leite é considerado um dos mais nobres dos produtos de origem animal, pelo elevado valor nutricional e por ser fonte de renda para os diferentes segmentos da cadeia produtiva (Ribeiro, 2008). A caprinocultura leiteira vem ganhando destaque no país devido ao aumento da demanda, ao interesse por produtos especiais fabricados com esse leite, como queijos e iogurtes, e sua boa digestibilidade e baixo potencial alergênico, sendo recomendado para crianças, pessoas idosas e convalescentes. (; Haenlein, 2004). De acordo com a Pesquisa Pecuária Municipal (IBGE, 2009), o Brasil possui cerca de nove milhões de cabeças de caprinos, com uma produção aproximada de 140 mil toneladas/ano de leite de cabra. Estas recomendações evidenciam a necessidade de um monitoramento dos resíduos, assim como o desenvolvimento de métodos eficazes para a determinação deste resíduo na matriz.

As organizações internacionais envolvidas com a saúde pública, como o JECFA - Comitê para Aditivos Alimentares da FAO/WHO e o FDA dos Estados Unidos, estabelecem as diretrizes para o Limite Máximo de Resíduo ou Limite de Tolerância definidos como a concentração máxima de resíduo resultante do uso de um medicamento veterinário, expresso em parte por milhão (ppm) ou parte por bilhão (ppb), que é legalmente permitido, ou reconhecido, como aceitável no alimento e é estabelecido para cada antimicrobiano e aprovados para uso em animal produtor de alimento. O valor de limite máximo de resíduo é correlacionado à Ingestão Diária Aceitável obtida a partir de ensaios de experimentação animal avaliando-se a toxicidade, teratogenicidade, e carcinogenicidade desses aditivos não intencionais (Kiser, 1984; Mitchell et al., 1998).

No Brasil, a competência para estabelecer limites máximos de resíduos em alimentos, seja de medicamentos veterinários, seja de agrotóxicos, contaminantes e aditivos, é do Ministério da Saúde através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003).

No caso de medicamentos veterinários, o Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal (PNCRB), foi instituído pela Portaria Ministerial nº 86 de 26 de janeiro de 1979 e Portaria Ministerial nº 51 de 06 de fevereiro de 1986 (Brasil, 1986). Posteriormente o plano recebeu o nome de Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal (PNCR). Em 2007 passou a se chamar Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) sendo que a cada ano são publicadas instruções normativas referentes às drogas a serem pesquisadas e seus respectivos Limites Máximos de Resíduos (LMR) e resultados obtidos. O PNCRC tem suas ações direcionadas para conhecer e evitar a violação dos níveis de segurança ou dos Limites Máximos de Resíduos (LMR's) de substâncias autorizadas, bem como a ocorrência de quaisquer níveis de resíduos de compostos químicos de uso proibido no país (BRASIL, 1999).

Para monitorar os resíduos de antimicrobianos em leite, são comumente usados testes de triagem imunológicos e de inibição microbiológica, além de técnicas analíticas sensíveis e específicas para a identificação e quantificação de resíduos de antimicrobianos no leite. A técnica mais utilizada visando à segunda alternativa é a cromatografia à líquido de alta eficiência (Shenck, Callery, 1998).

A cromatografia ocupa lugar de destaque devido a sua facilidade em efetuar a separação, identificação e quantificação das espécies químicas, acopladas ou não a outras técnicas instrumentais de análise, como, por exemplo, a espectrofotometria ou espectrometria de massa. É um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada por meio da distribuição destes componentes entre duas fases que estão em contato íntimo. Uma das fases permanece estacionária enquanto a outra se move através dela, tendo por objetivo a separação de diferentes compostos com base na diferença de interação destes com estas duas fases (Mac Neil, 1996).

Considerando a importância em saúde pública e para a indústria que os resíduos de antimicrobianos em leite representam, esse trabalho teve como objetivo detectar resíduos dessas substâncias em leite de cabra produzidos no Estado do Rio de Janeiro, utilizando-se o método de multirresíduos por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa de alta resolução (LC-QTOF-MS) e cromatografia líquida acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS/MS).

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Foram coletados 133 amostras de leite de cabra de nove rebanhos leiteiros, identificados de A a I, localizados nos seguintes municípios do Estado do Rio de Janeiro: Seropédica, Niterói, Friburgo, Teresópolis, Paraíba do Sul, São Gonçalo, Engenheiro Paulo de Frontin, Tanguá e Valença.

A análise de resíduo de antimicrobianos foi realizada no Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas e Medicamentos Veterinários do Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO) do Estado do Rio Grande do Sul. A metodologia utilizada foi o método multirresíduos em leite para diferentes grupos de antimicrobianos utilizando a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa de alta resolução (LC-QTOF-MS) e a cromatografia líquida acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS/MS) (Jang et al., 2013). Esse método é utilizado para o monitoramento de antimicrobianos em amostras de leite do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC).

Os analitos monitorados foram Tetraciclina (TC), Oxitetraciclina (OXI), Clortetraciclina (CTC), Doxiciclina (DOXI), Sulfadiazina (SDZ), Sulfatiazol (STZ), Sulfametazina (SMZ), Sulfametoxazol (SMA), Sulfaquinoxalina (SQX), Sulfadimetoxina (SDMX), Sulfadoxina (SDX), Sulfaclopiridazina (SCP), Sulfamerazina (SMR), Sulfizoxazol (SFX), Ácido nalidíxico (NALID), Ácido oxolínico (OXO), Flumequina (FLU), Ciprofloxacina (CIPRO), Enrofloxacina (ENRO), Difloxacina (DIFLO), Sarafloxacina (SARA), Danofloxacina (DANO), Norfloxacina (NORF), Penicilina G (PNG), Penicilina V (PNV), Ampicilina (AMP), Amoxicilina (AMX), Oxacilina (OXA), Cloxacilina (CLX), Dicloxacilina (DCX), Ceftiofur (CFT), Cefapirina (CFAP), Cefoperazona (CFOP), Naficilina (NAFC), Cefquinoma (CFQ), Cefalônio (CFN), Cefalexina (CFX), Eritromicina (ERT), Espiramicina (SPR), Tilmicosina (TLM), Azitromicina (AZT), Tilosina (TIL), Lincomicina (LNC), Clindamicina (CLN), Trimetoprima (TRI), Bromexina (BMX).

O limite de detecção e o limite de quantificação correspondente a 25% do LMR (limite máximo de resíduo) para cada resíduo. Os sistemas utilizados foram o cromatógrafo líquido (*Agilent*, modelo 1260) acoplado a espectrômetro de massas híbrido quadrupolo-tempo de voo (*Sciex*, modelo 5600) (LC-QTOF-MS) e o cromatógrafo líquido (*Agilent*, modelo 1100) acoplado a espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo (*Sciex*, modelo 5000) (LC-MS/MS). A fonte de ionização utilizada, em ambos os sistemas, foi a ionização por eletrospray (ESI) no modo positivo. O *software* utilizado foi o *Analyst* TF 1.5, para o sistema LC-QTOF-MS e *Analyst* 1.6.1, para o sistema LC-MS/MS.

As amostras foram submetidas ao processo de extração com solvente orgânico, para obtenção de um extrato purificado. Em seguida, tratadas com solução 150 mM de EDTA para evitar a quelação dos compostos da classe tetraciclina. Os analitos foram extraídos utilizando acetonitrila 0,1% de ácido fórmico. O extrato sofre duas etapas de purificação, através da remoção de interferentes com C18 bulk seguida de purificação a baixa temperatura. O sobrenadante foi submetido à evaporação sob fluxo de nitrogênio a 45 °C, não podendo chegar à secura, com volume final entre 0,2 e 0,7 mL. O volume foi completado a 1 mL e o extrato foi diretamente analisado no sistema de LC-QTOF-MS, para a análise de 42 antimicrobianos, e LC-MS/MS, para a análise de outros quatro que possuem Limite Máximo de Resíduos muito baixo (4 ng /mL-1) para serem detectados na metodologia empregando LC-QTOF-MS, pertencentes à classe dos beta-lactâmicos.

A diluição cromatográfica foi realizada empregando fase móvel em modo de gradiente. O volume de injeção foi de 10 µL e o fluxo da fase móvel foi de 300 µL min<sup>-1</sup>. O tempo de corrida foi de 14 minutos e o tempo de equilíbrio da coluna foi de 3 minutos ao final de cada corrida. No sistema LC-QTOF-MS, os dados foram adquiridos através de método *full scan* TOF MS, faixa de massa de 100 a 1000 da, no modo positivo, com critério Ingestão Diária Admissível (IDA). A quantificação é realizada através do software MULTIQUANT utilizando os métodos de quantificação adequados. O uso de controles preparados em matriz dispensa a correção dos valores obtidos pela recuperação do método.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as amostras analisadas obtiveram resultado dentro dos limites máximos permitidos pela legislação vigente.

A presença de resíduos antimicrobianos no leite está relacionada a fatores diversos, dentre eles a utilização de drogas na alimentação animal, ao manejo sanitário inadequado, utilização proposital de medicamentos em decorrência da deficiência na qualidade higiênica do leite, podendo ampliar o seu prazo de validade, além do uso indiscriminado de antimicrobianos para tratamento de doenças infecciosas no rebanho leiteiro (Brasil, 1991/1992).

Em estudo realizado por Nardelli (2008), analisando resíduos no leite de cabra no nordeste brasileiro, pela técnica qualitativa “Delvoteste SP”, foi detectada a presença de resíduos antimicrobianos em 14,16% do leite avaliado. Santos (2005) e Silva et al. (2005), ao pesquisar resíduo de antimicrobianos do grupo beta-lactâmicos pela técnica imunoenzimática

em leite de cabra na região do cariri paraibano, encontraram, respectivamente, 31,6% e 17,7% das amostras com resíduo antimicrobiano.

Apesar de diversos trabalhos detectarem amostras de leite de cabra com resíduo de antimicrobianos, a metodologia empregada por esses são métodos de triagem normalmente baseados na inibição de crescimento microbiano, testes imunológicos e testes enzimáticos com receptores específicos. Nesses casos, há necessidade de avaliação sobre possíveis interferentes que podem tornar o resultado falso positivo, uma vez que métodos analíticos baseados em imunoenaios são suscetíveis à interferência de metabólitos ou produtos de degradação dos analitos, os quais podem não ser identificados pelas técnicas cromatográficas utilizadas nos métodos de análises mais específicos. Ainda, os limites de detecção dos métodos de confirmação às vezes são maiores do que os dos métodos de triagem (Brasil, 2006-2007).

Os métodos de confirmação para análises de resíduos, de acordo com a Decisão da Comissão Europeia 657, de 12 de agosto de 2002, necessitam comprovar informações sobre a estrutura química do analito. Normalmente, são métodos que empregam as técnicas de cromatografia e espectrometria de massas.

Estudos investigativos de resíduos em leite de cabra são escassos, principalmente empregando técnicas cromatográficas. No Brasil não existe um programa de monitoramento de resíduos no leite da espécie caprina, mesmo com a criação do PAMvet, este programa não engloba o leite caprino. A implantação desse tipo de programa englobando o leite caprino é primordial, desde que associado a estes, campanhas para educação dos produtores e funcionários envolvidos e, capacitação técnica, para fomentar as boas práticas agropecuárias. Portanto, integração entre os produtores, indústria, centros de pesquisa e órgãos fiscalizadores é essencial para a produção de um leite de cabra de qualidade e seguro ao consumidor.

## CONCLUSÃO

Apesar de nenhuma amostra apresentar resíduo de antimicrobiano acima dos resíduos máximos permitidos, o monitoramento frequente de medicamentos, seus derivados metabólicos e o controle de resíduos de antimicrobianos no leite é muito importante à indústria de produtos lácteos, e, conseqüentemente, ao consumidor. Para o controle efetivo desses resíduos no leite é irrefutável a tomada de medidas conjuntas nos princípios da obtenção do leite, haja vista que uma série de medidas preventivas irá dificultar ou mesmo sanar a contaminação por medicamentos no leite.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA); *Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo (PAMVet)*, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Métodos de análise microbiológica para alimentos. Brasília. 2.a revisão. 1991/1992.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMVet). Relatório de 2006–2007, Monitoramento de resíduos em leite expostos ao consumo (5º e 6º ano de atividades). Brasília (DF): Anvisa; 2009 [acesso em 8 dez. 2015]. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/72efdb0047458ad19441d43fbc4c6735/PAMVE T.pdf?MOD=AJPERES>

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. Introdução a métodos cromatográficos. Campinas: Ed. Unicamp, 6ª ed. 1997 Gatica, C. P.; Gesche, E. R.; *Rev. Científica (Maracáibo)* 2007, 17, 231.

EUROPEAN UNION. COMMISSION DECISION 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and interpretation of results [cited 2012 Nov 8]. Available from: <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2002:221:0008:0036:EN:PDF>

JANK, L. ; MARTINS, M. T. ; ARSAND, J. B. ; BARRETO, F. ; HOFF, R. B. ; PIZZOLATO, Tânia Mara . Determinação de antimicrobianos em leite pertencentes a diferentes classes por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas por tempo de voo. XVII Congresso Brasileiro de Toxicologia. 2013. Porto Alegre - RS.

NARDELLI, M.J. Resíduos antimicrobianos e suas causas no leite de cabra in natura produzido em municípios do semi-árido paraibano.2008 131f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária de Ruminantes e Eqüídeos) – Universidade Federal de Campina Grande, Patos.

RIBEIRO M.G. Princípios terapêuticos na mastite em animais de produção e de companhia. In: Andrade S.F.(Ed.), Manual de Terapêutica Veterinária. 3 edição Roca, São Paulo. 936p., 2008.

SANTOS, M. G. O. Monitoramento das Condições de Processamento de Leite de Cabra Através do Método de Análise de Perigos e Pontos críticos de Controle –APPCC em Mini-usinas do Cariri Paraibano.2005. 94 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária de pequenos ruminantes).

SANTOS, S. M.; HENRIQUES, M.; DUARTE, A. C.; ESTEVES, V. I.; *Talanta* 2007, 71, 731.

SCHENCK, F.J.; CALLERY, P.S. Chromatographic methods of analysis of antibiotics in milk. *J. Chromatogr., A*, Amsterdam, v.812, p. 99-109, 1998.

SHITANDI, A.; STERNESJÖ, A.; Prevalence of multidrug resistant *Staphylococcus aureus* in milk from large- and small-scale producers in Kenya. *J. Dairy Sci.* 2004, 87, 4145

SILVA, L. M. de.; CARVALHO, M. G. X. de.; SIQUEIRA, I. N. de.; LIMA, S. C. P. de.; SANTOS, M. G. O. de.; XAVIER, V. M. C.; HOLANDA, S. A. M.; Pesquisa de resíduos de antibiótico  $\beta$ -lactâmico no leite de cabra cru fornecido a seis mini-usinas do Cariri paraibano. Anais... XXII Congresso Nacional de Laticínios. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes. Juiz de Fora. v.60, n.345, p.274-276, jul/ago de 2005.

MAC NEIL JD. Physical/chemical methods for analysis of antimicrobial in milk. *Milchwissenschaft* 1996;51(3):154-60.

VAN SCHAIK, G. Trends in somatic cells counts, bacterial counts, and antibiotic residue violations in New York State during 1999-2000. *Journal of Dairy Science*, v.85, n.4, p.782-789, 2002.

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

SCN foi confirmado como agente bacteriano isolado com maior frequência nas mastites caprinas e a resistência antimicrobiana dessas cepas frente a ampicilina, penicilina e oxacilina, alertam para alterações do perfil de sensibilidade destes patógenos ao longo dos anos. Entretanto, quando houve associação do beta-lactâmico com inibidor de beta-lactamase observou-se aumento de efetividade (100% sensibilidade). As diferenças observadas na eficácia dos antimicrobianos demonstram a importância da identificação do agente causal e da sua sensibilidade antimicrobiana, com o intuito de eleger o tratamento mais apropriado. Sugere-se que o isolamento bacteriano associado ao teste de sensibilidade a antimicrobianos seja uma prática rotineira, visando a redução das perdas econômicas advindas da mastite subclínica.

A detecção do gene *mecA* e a multirresistência encontrada nos isolados de *Staphylococcus* spp. reforçam a importância do uso consciente de medidas de controle contra a mastite subclínica em caprinos, como também, abre perspectivas para a investigação da epidemiologia da doença.

Foi observado que a CCS não se correlaciona com os resultados do isolamento bacteriano, devendo ser avaliada com cautela em estudos sobre mastite subclínica em cabras. Além disso, alguns rebanhos não atenderam aos padrões físico-químicos exigidos pela legislação brasileira e a CBT média obtida está acima do preconizado. Também se observou que a acidez do leite é influenciada pelo isolamento bacteriano e a lactose foi a variável que mais afetou o valor de CBT.

Nenhuma amostra apresentou resíduo de antimicrobiano acima dos limites máximos permitidos. Entretanto, programas de monitoramento são necessários, desde que associado a campanhas para educação dos produtores e funcionários envolvidos, como também capacitação técnica, são primordiais para fomentar as boas práticas agropecuárias e obtenção de melhor qualidade no leite e seus derivados. Portanto, integração entre os produtores, indústria, centros de pesquisa e órgãos fiscalizadores é essencial.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARESTRUP, F.M.; SEYFARTH, A.M.; EMBORBG, H. Effect of abolishment of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal enterococci from food animals in Denmark. *Ant. Ag. Chemoth.*, v.45, p.2054-2059, 2001.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA); *Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo (PAMVet)*, 2003.
- AGNESE, A.P., NASCIMENTO, A.M.D., VEIGA, F.H.A., PEREIRA, B.M. & OLIVEIRA, V.M. Avaliação físico-química do leite cru comercializado informalmente no Município de Seropédica – RJ. *Higiene Alimentar*, v.16, n.94, p.58-61, 2002.
- ALMEIDA, J.F; AQUINO, M.H.C.; MAGALHÃES, H.; NASCIMENTO, E.R.; PEREIRA, V.L.A.; FERREIRA, T.; BARRETO, M.L. Principais alterações no leite por agentes causadores de mastite no rebanho caprino dos estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro. *Arq. Inst. Biol.* v. 80, n.1, p.13-18, 2013.
- ALVES, F.S.F. *Leite de Cabra e Derivados: as barreiras sanitárias*. EMBRAPA. Disponível em: <[http://www.capritec.com.br/artigos\\_embrapa020819b.htm](http://www.capritec.com.br/artigos_embrapa020819b.htm)>. Acesso em 09 set. 2015.
- AMARAL, D.S.; AMARAL, D.S.; NETO, L.G.M. Tendências de consumo de leite de cabra: enfoque para a melhoria da qualidade. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, v.6, n.1, p.39-42, 2011.
- ANDRADE, P.V.D.; SOUZA, M.R.; BORGES, I.; PENA, C.F.A.M. Contagem de células somáticas em leite de cabra. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.53, n.3, p.396-400, 2001.
- ARCURI, E.F.; BRITO; M.A.V.P., PINTO, S.M.; ÂNGELO, F.F.; SOUZA, G.N. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.58, n.3, p.440-446, 2006.
- BAVA, L.; ZUCALI, M.; BRASCA, M.; ZANINI, L.; SAN DRUCCI, A. Efficiency of cleaning procedure of milking equipment and bacterial quality of Milk. *Italian Journal of Animal Science*, v.8, n.2, p.387-389, 2009.
- BERGONIER D., DE CRÉMOUX R., RUPP R., LAGRIFFOUL G. & BERTHELOT X. Mastitis of dairy small ruminants. *Veterinary Research*. v. 34, p. 689-716, 2003.
- BEZERRA, A.C.A.; FEIJÓ, F.M.C.; SILVA, J.S.; AVELINO, D.B. Relação entre o “California Mastitis Test” e os agentes microbianos de mastites em caprinos no estado do Rio Grande do Norte. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v.28, n.4, p.160-165, 2006.

BOISON, J.O.; KENG, L.J.Y. Multiresidue liquid chromatographic method for determining residues of mono and dibasic penicillins in bovine muscle tissues. *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.*, v. 81, n. 6, p.1113-1120, 1998.

BORGES, C. H. P. Custos de Produção do Leite de Cabra na Região Sudeste do Brasil. In: Simpósio Internacional sobre Caprinos e Ovinos de Corte, 2., Simpósio Internacional sobre o Agronegócio da Caprinocultura Leiteira, 1., 2006, João Pessoa. *Anais...* João Pessoa, 2006. Disponível em: [http://www.caprtec.com.br/pdf/custo\\_sudeste.pdf](http://www.caprtec.com.br/pdf/custo_sudeste.pdf). Acesso em: 29 mar. 2016.

BOŽANIĆ, R.; TRATNIK, L.; DRGALIĆ, I. Kozje mlijeko: karakteristike i mogućnosti (Goat's milk: characteristics and possibility). *Mljekarstvo Dairy*, v. 52, p. 207-237, 2002.

BRANDÃO, L.G.N.; SOUSA, M.B.; ZUZA, L.; OLIVEIRA, S.C.M. Resíduo de antibióticos no leite caprino do município de Senhor do Bonfim – BA. 42º Congresso Bras. de Medicina Veterinária e 1º Congresso Sul-Brasileiro da ANCLIVEPA - Curitiba – PR - 31/10 a 02/11 de 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Métodos de análise microbiológica para alimentos. Brasília. 2.a revisão. 1991/1992.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 37, de 31 de outubro de 2000. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite de Cabra. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2193>. Acesso em 08 set. 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 68 de 12 de dezembro de 2006. Anexo – Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos para Controle de Leite e Produtos Lácteos. *Diário Oficial [da] União*, Brasília, DF, 14 dez. 2006 , Seção 1 , p. 8.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMVet). Relatório de 2006–2007, Monitoramento de resíduos em leite expostos ao consumo (5º e 6º ano de atividades). Brasília (DF): Anvisa; 2009 [acesso em 8 dez. 2015]. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/72efdb0047458ad19441d43fbc4c6735/PAMVET.pdf?MOD=AJPERES>

BORGES, M.F.; ARCURI, E.F.; PEREIRA, J.L.; FEITOSA, T.; KUAYE, A.Y. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em leite e produtos lácteos, suas enterotoxinas e genes associados: revisão. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, v. 26, n. 1, 2008.

BRITO, M.A.V.P. Normas Internacionais e exigências do *Codex Alimentarius* e comparação entre blocos comerciais sobre a adoção de testes para detecção de resíduos de antibióticos no leite. In: BRITO, J.R.F.(Ed.) *Diagnóstico da qualidade do*

*leite, impacto para a indústria e a questão dos resíduos de antibióticos.* Juiz de Fora – MG: Embrapa Gado de Leite, 2003. Cap. 6, p. 65-76.

BRITO, J. R. F.; BRITO, M. A. V. P.; ARCURI, E. F. Controle da mastite – ou como reduzir a contagem de células somáticas do rebanho bovino leiteiro. Embrapa Gado de Leite. 2009. Disponível em: <<http://www.cnp.gl.embrapa.br/nova/...leite/arquivos/controlarmastite.doc>>. Acesso em 02 set. 2015.

BUENO, V.F.F.; MESQUITA, A.J.; OLIVEIRA, A.N.; NICOLAU, E.S.; NEVES, R.B.S. Contagem bacteriana total do leite: relação com a composição centesimal e período do ano no Estado de Goiás. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v.15, n.1, p.40-44, 2008.

BUSINCO, L.; BELLANTI, J. Food allergy in childhood. Hypersensitive to cow's milk allergens. *Clinical Experimental Allergy*, v.23, p.481-483, 1993.

CAIERÃO, J.; SUPERT, I S.; DIAS, C.A.G.; D'AZEVEDO, P.A. Automated systems in the identification and determination of methicillin resistance among coagulase negative staphylococci. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 101, p.277–9, 2006.

CARSON, M.C. Simultaneous determination of multiple tetracycline residues in milk using chelate affinity chromatography. *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.*, v.76, n. 2, p. 329-334, 1993.

CAVALCANTI, E.R.C.; CAVALCANTI, M.A.R.; SOUZA, W.J.; ARAUJO, D.G. Avaliação microbiológica em ordenhadeira mecânica antes e após a adoção de procedimento orientado de higienização. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v.17, n.1, p.3-6, 2010.

CAUWELIER, B. Evaluation of a disk diffusion method with cefoxitin (30µg) for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *European Journal Microbiology Infectious Disease*, v.23, p.389-392, 2004.

CHACÓN VILLALOBOS, A. Aspectos nutricionales de la leche de cabra (*Capra hircus*) y sus variaciones em el proceso agroindustrial. *Agronomía Mesoamericana, Alajuela*, v. 16, n. 2, p. 239- 252, 2005.

CHAPAVAL, L.; PIEKARSKI, P. R. B. *Leite de Qualidade: Manejo Reprodutivo, Nutricional e Sanitário*, Aprenda Fácil editora, Viçosa-MG, p. 71-78, 115, 131-136, 2000.

CHAPAVAL, L. Mastite em cabras leiteiras x qualidade do leite: pontos importantes para produzir alimentos seguros. PUBVET, Londrina. v.2, n.41, artigo 400. 2008. Disponível em: <http://www.pubvet.com.br/texto.php?id=400>>. Acesso em 08 set. de 2015.

CHAPAVAL, L.; MAGALHÃES, D. C. T. Qualidade do Leite de Cabra: uma questão de bom gosto. 2009. Disponível em: <[http://www.caprilvirtual.com.br/Artigos/CNPC\\_Qualidade\\_Leite.pdf](http://www.caprilvirtual.com.br/Artigos/CNPC_Qualidade_Leite.pdf)>. Acesso em 08 de novembro de 2015.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals. Approved Standards. 3rd ed. M31-A3. CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals; Approved Standards; Second Informational Supplement. CLSI document VET01-S2 (ISBN 1-56238-880-0). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2013.

CONTRERAS, A.; LUENGO, C.; SÁNCHEZ LÓPEZ, A.; CORRALES, J.C. Etiología de la infección intramamaria caprina en relación con los programas de control. In: XXVI Jornada Científica de la SEOC, Sevilla, p.71-83, 2001.

CONTRERAS A., SIERRA D., SÁNCHEZ A., CORRALES J.C., MARCO J.C., PAAPE M.J. & GONZALO C. Mastitis in small ruminants. *Small Ruminant Reserch*. v. 68, p.145-153, 2007.

CORDEIRO, P.R.C; CORDEIRO, A.G.P.C. A Produção de leite de Cabra no Brasil e seu Mercado. Leite de Cabra no Brasil, seu mercado, comercialização e produção. In: Encontro de Caprinocultores do Sul de Minas e Media Mogiana, 2009, Espírito Santo do Pinhal. Disponível em: <<http://www.caprtec.com.br/pdf/LeitedeCabranoBrasil.pdf>>. Acesso em: 01 fev. 2016.

COUTO, I.; PEREIRA, S.; MIRAGAIA, M.; SANCHES, I.S.; LENCASTRE, H. Identification of clinical staphy-lococcal isolates from humans by internal transcribed spacer PCR. *J Clin Microbiol*, 39:3099–103, 2001.

COSTA, E. O. Resíduos de antibióticos no leite: um risco à saúde do consumidor. *Revista Higiene Alimentar*, v.10, n. 44, p.15-17, 1996.

COSTA, E. O. Importância da mastite na produção leiteira do Brasil. *Revista de Educação Continuada do CRMV-SP*, v. 1, p. 3-9, 1998.

COSTA, A.L. Leite Caprino: Um Novo Enfoque de Pesquisa. EMBRAPA. 2008. Disponível em: <[http://www.caprtec.com.br/artigos\\_embropa.htm](http://www.caprtec.com.br/artigos_embropa.htm)>. Acesso em: 03 out. 2015.

COSTA, R.G.; QUEIROGA R.C.R.E.; PEREIRA, R.A.G. Influência do alimento na produção e qualidade do leite de cabra. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.38, p. 307-321, 2009.

CROXATTO A, PROD'HOM, GREUB G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Ver*, v.36, p.380–407, 2012.

CULLOR, J.S.; TYLER, J.W.; SMITH, B.P. Distúrbios da glândula mamária. In: SMITH, B. P. *Tratado de Medicina Interna dos Grandes Animais*. São Paulo, v.2, p.1041-1060, 1994.

DANCER, S.J. The problem with cephalosporins. *Journal Antimicrobial and Chemotherapy*, v.48, p.463–478, 2001.

DAL POZZO, M.; VIEGAS, J.; SANTURIO, D.F. *et al.* Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a *Staphylococcus* spp. isolados de mastite caprina. *Ciência Rural*, v.41, p.667-672, 2011.

DE LA CRUZ, M.; SERRANO, E., MONTORO, V.; MARCO, J.M. Etiology and prevalence of subclinical mastitis in the Manchega sheep at mid late lactation. *Small Ruminant Research*. v.14, p.175-180, 1994.

DONG , F.; HENNESSY, D. A.; JENSEN, H. H. Factors determining milk quality and implications for production structure under somatic cell count standard modification. *Journal of Dairy Science*, v. 95, p. 6421-6435, 2012.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. *Produção mundial de leite de diferentes espécies de animais*, 2010-2011. Embrapa Gado de Leite. Disponível em: <<http://www.cnpqgl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/tabela0210.php>>. Acesso em: 29.nov.2015.

EUROPEAN UNION. COMMISSION DECISION 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and interpretation of results [cited 2012 Nov 8]. Available from:<http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2002:221:0008:0036:EN:PDF>.

ESCAREÑO, L.; SALINAS-GONZALEZ, H.; WURZINGER, M.; IÑIGUEZ, L.; SÖLKNER, J.; MEZA-HERRERA, C. Dairy goat production systems. *Tropical animal health and production*. 2012.

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.

FERREIRA, M.C.C; QUEIROGA, R.C.R.E. Composição química do leite de cabras puras no Curimataú paraibano durante o período de lactação. *Revista do Instituto de Laticínios Candido Tostes*, v.58, n.330, p. 21-26, 2003.

FLETOURIS, D.J.; PSOMAS, J.E.; MANTIS, A.J. Determination of some monobasic penicillins in milk by ion-pair liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, v.40, p.617-721, 1992.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION – FAO. FAOSTAT – FAO Statistics Division/ProdSTAT. 2010. Disponível em: <

<http://faostat.fao.org/site/569/DesktopDefault.aspx?PageID=569#ancor>>. Acesso em: 01 dez. 2015.

FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. *Qualidade do leite e controle de mastite*. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. 175p.

FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. *Qualidade microbiológica do leite*. In: \_\_\_\_\_ (Ed.). *Qualidade do leite e controle de mastite*. 2.ed. São Paulo: Lemos Editorial, 2001. Cap.14, p.151-161

FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. *Estratégia para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite*. 2ª ed. Editora Manole, Barueri, p. 314. 2007.

FONSECA, J.F.; SIMPLÍCIO, A.A. *Inseminação artificial e transferência de embriões em ovinos e caprinos*. In: Encontro Internacional da Pecuária da Amazônia, 1. 2008, Belém, PA. *Anais...* Belém, PA: FAEPA; Instituto Frutal; SEBRAE-PA, 2008.

FONSECA, J.F., BRUSCHI, J.H. Produção de caprinos na região da mata atlântica. In: \_\_\_\_\_. *A caprinocultura leiteira no Brasil – Uma visão holística*. Minas Gerais: Embrapa Gado de Leite, 2009. 272p. cap. 1, p. 15-24.

FRANÇA, C.A.; PEIXOTO, R.M.; CAVALCANTE, M.B.; MELO, N.F.; OLIVEIRA, C.J.; VESCHI, J.A.; MOTA, R.A.; COSTA, M.M. Antimicrobial resistance os *Staphylococcus* spp. from small ruminant mastites in Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 32, n. 8, p. 747-753, 2012.

FREITAS, M.F.L.; PINHEIRO JÚNIOR, J.W.; STAMFORD, T.L.M.; RABELO, S.S. A.; DA SILVA, D.R.; SILVEIRA FILHO, V.M.; SANTOS, F.G.B.; SENA, M.J.; 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. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v. 72, n. 2, p. 171-177, abr./jun.2005.

GARGOURI, B.; AMMAR, S.; ZRIBI, A.; BEN MANSOUR, A; BOUAZIZ, M.. Effect of growing region on quality characteristics and phenolic compounds of chemlali extra-virgin olive oils. *Acta Physiologiae Plantarum*, v.35, p. 2801–2812, 2013.

GARINO JUNIOR, F.; Camboim, E.K.A.; Neves, P.B.; Sá, A.V.V.; Almeida, A.P. Suscetibilidade a antimicrobianos e produção de betalactamase em amostras de *staphylococcus* isolados de mastite caprina no semiárido paraibano. *Arquivo Instituto Biológico*, São Paulo, v.78, n.1, p.103-107, jan./mar., 2011.

GOMES, V.; LIBERA, A.M.M.P.D.; MADUREIRA, K.M.; ARAÚJO, W.P. Influência do estágio de lactação na composição do leite de cabras (*Capra hircus*). *Brasilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.41, n.5, p.339-342, 2004.

GONZALO C., TARDÁGUILA J.A., DE LA FUENTE L.F. & SAN PRIMITIVO F. Effects of selective and complete dry therapy on prevalence of intramammary infection and on milk yield in the subsequent lactation in dairy ewes. *Journal Dairy Research*. 71, p. 33-38. 2004.

HAENLEIN, G.F.W. Goat Milk in human nutrition. *Small Ruminant Research*, v. 51, p. 155-163, 2004.

HIRAMATSU, K.; HANAOKI, H.; ITO, T.; YABUTA, K.; OGURI, T.; TENOVER, F.C.. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J. Antimicrob. Chemother.* V.40, p.135-136, 2001.

HOLANDA JUNIOR, E.V.; MEDEIROS, H.R.; DAL MONTE, H.L.B. et al. Custo de produção de leite de cabra na região Nordeste. In: ZOOTEC 2008. João Pessoa, PB: UFPB/ABZ, 2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Censo Agropecuário 2009 do Estado do Rio de Janeiro. Disponível em: < [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2009/tabelas\\_pdf/tab04.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2009/tabelas_pdf/tab04.pdf) >. Acesso em: 04 dez. 2015.

ITO, T; KATAYAMA, Y.; ASADA, K.; MORI, N.; TSUTSUMIMOTO, K.; TIENSASITORN, C.; HIRAMATSU, K. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *S. aureus*. *Antimicrobial Agents of Chemotherapy*. v.45 p.1323-1336, 2001.

JANDAL, J.M. Comparative aspects of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, v.22, n.2, p.177-185, 1996.

JENNESS, R. Composition and characteristics of goat milk: A review, 1968-1979. *J. Dairy Sci.* v.63, p.1605-1630, 1980.

KONTOS, F.; PETINAKI, E.; SPILIOPOULOU, I.; MANIATI, M.; MANIATIS, A.N. Evaluation of a novel method based on PCR Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of the *tuf* gene for the identification of *Staphylococcus* species. *J Microbiol Methods*; v. 5, p.:465–9, 2003.

KOOP, G.; WERVEM, T.; TOFT, N.; NIELEN, M. Estimating test characteristic of somatic cell count to detect *Staphylococcus aureus* – infected dairy goats using latent class analysis. *Journal of Dairy Science*, v. 94, p. 2902-2911, 2011.

KURODA, M.; OHTA, T.; UCHIYAMA, I.; BABA, T.; YUZAWA, H.I.; KOBAYASHI, L.; CUI, A.; OGUCHI, K.; AOKI, Y.; NAGAI, J.. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *New Engl. J. Med.* 319:157-61. 2001.

LACERDA, L.M.; MOTA, R.A.; SENA, M.J. de Contagem de células somáticas, composição e contagem bacteriana total do leite de propriedades leiteiras nos municípios de Miranda do Norte, Itapecurúmirim e Santa Rita, Maranhão. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.77, n.2, p.209-215, 2010.

LANGONI, H.; DOMINGUES, P.F.; BALDINI, S.. Mastite caprina: seus agentes e sensibilidade frente a antimicrobianos. *Revista Brasileira Ciência Veterinária*, v. 13, n. 1, p. 51-54, jan./abr. 2006.

LIMA JÚNIOR, A.D.; NADER FILHO, A.; VIANI, M.C.E. Fatores condicionantes da mastite subclínica caprina em criatórios do Rio de Janeiro. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.47, n.4, p.463-474, 1995.

LOWY F.D. Antimicrobial resistance: The example of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Invest.* V. 111, p.1265-1273, 2003.

LUQUET, F.M. *La leche: de la mama a la lechería*. Zaragoza: Acribia, 1991. 195p.

MA, X.X.; ITO, T.; TIENSASITORN, C.; JAMKLANG, M.; CHONGTRAKOOL, P.; BOYLE-VAVRA, S.; DAUM, R.S.; HIRAMATSU, K. Novel type of staphylococcal cassette chromosome *mec* identified in community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* V.46, n.4, p.1147-1152, 2002.

MACEDO L.G.P., DAMASCENO J.C., MARTINS E.N., MACEDO V.P., SANTOS G.T., FALCÃO A.J.S. & CALDAS NETO S.. Substituição do farelo de soja pela farinha de glúten de milho na alimentação de cabras leiteiras. *Revista Brasileira Zootecnia*, n. 32, p. 992-1001, 2003.

MADANAT, A.; ZENDULKOVÁ, D.; POSPISIL, Z. Contagious agalactia of sheep and goats. A review. *Acta Veterinaria BRNO*, v.70, p. 403-412, 2001.

MADUREIRA, K.M.; GOMES, V.; CASTRO, R.S.; KITAMURA, S.S.; ARAÚJO, W.P. Análise das metodologias diretas e indiretas para a contagem de células somáticas no leite de cabras híidas. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.30, n.4, p.311-316, 2010.

MAGALHÃES, A.C.M. *Obtenção higiênica e parâmetros de qualidade do leite de cabra*. Viçosa, 2005. Disponível em: <[http://www.cpd.ufv.br/dzo/caprinos/artigos\\_tec/hig\\_quali.pdf](http://www.cpd.ufv.br/dzo/caprinos/artigos_tec/hig_quali.pdf)>. Acesso em: 27 nov. 2015.

MAGALHÃES, K.A.; MARTINS, E.C.; DE SOUZA, J.D.F.; BARBOSA, C.M.P.; GUIMARÃES, V.P. Panorama e perspectiva nacional da Ovinocultura e Caprinocultura. Embrapa Caprinos e Ovinos. Disponível em: <https://www.embrapa.br/documents/1355090/0/Panorama+Nacional+Caprinocultura+e+Ovinocultura/39160f17-81e8-495f-837b-4233aa63832e>. Acesso em: 20 jun. 2016.

MARANGONI, D.V. *Staphylococcus aureus*. Inf. Hosp. : prevenção e controle. São Paulo, Sarvier. p. 573-591, 1997.

MARTH, E. H; STEELE, J. L. *Applied dairy microbiology*, 744 p, Nova York, 2001.

MARTIN, B.S.; MORAGA, R. Evaluación de la técnica microbiológica con *Bacillus subtilis* BGA para la identificación de residuos de antimicrobianos en leche bovina. *Av. Cienc. Vet.*, v. 11, p. 43-48, 1996.

MCINTOSH, C.; SHELDON, M. The new Delvotest SP: what are the implications for dry cow therapy? *Cattle Pract.*, v. 10, p. 119-123, 2002.

MENDES, C. G.; SILVA, J. B. A.; ABRANTES, M. R. Caracterização organoléptica, físico-química, e microbiológica do leite de cabra: uma revisão. *Acta Veterinaria Brasilica*, v.3, n.1, p.5-12, 2009.

MINEO, H.; KANEKO, S. An analytical study of antibacterial residues in meat: the simultaneous determination of 23 antibiotics and 13 drugs using gas chromatography. *Vet. Hum. Toxicol.*, v. 34, n. 5, 1992.

MITCHELL, J.M., GRIFFITHS, M.W.; MCEWEN, S.A.;MCNAB, W.B.; YEE, A. Antimicrobial drug residues in milk and meat; causes, concerns, prevalence, regulations, tests, and test performance. *J. Food Prot.*, v. 61, n. 6, p. 742-745, 1998.

MOATS, W.A.; ANDERSON, K.L.; RUSHING, J.E.; WESEN, D.P. Comparison of a radioimmunoassay (Charm II) test with high-performance liquid chromatography for detection of oxytetracycline residues in milk samples from lactating cattle. *Am. J. Vet. Res.*, v. 56, n. 6, p. 795-800, 1995.

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.

MURAKAMI, K.W.; MINAMIDE, K.; WADA, W.; NAKAMURA, E.; TERAOKA, H.; WATANBE, S. Identification of methicillin resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 29, p. 2240-2244, 1991.

MURRAY, P. What Is a New in Clinical Microbiology – Microbial Identification by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *The Journal of Molecular Diagnostics*; v.14, n.5, p. 419-423, 2012.

NACIONAL MASTITIS COUNCIL. Diagnostic procedures. *Laboratory handbook on bovine mastitis*..222p. Cap.3. p.31-39.1999.

NARDELLI, M.J. Resíduos antimicrobianos e suas causas no leite de cabra in natura produzido em municípios do semi-árido paraibano.2008 131f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária de Ruminantes e Eqüídeos) – Universidade Federal de Campina Grande, Patos.

NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BELOTI, V. et al. Hazards in non-pasteurized milk on retail sale in Brazil: prevalence of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and chemical residues. *Brazilian Journal of Microbiology*. v. 35, p. 211-215, 2004.

NEUBAUER, G.D. Antibiotic residues: perception vs reality. *Bov. Pract.* , v.32, n. 1, p. 45-47, 1998.

NUNES, G.R.; BLAGITZ, M.G.; FREITAS, C.B.; SOUZA, F.N.; RICCIARDI, M.; STRICAGNOLO, C.R.; SANCHES, B.G.S.; AZEVEDO, M.R.; SUCUPITA, M.C.A.; DELLA LIBERA, A.M.M.P. Avaliação de indicadores inflamatórios no diagnóstico da mamite ovina. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.75, n.3, p.271-278, 2008.

OLIVEIRA, M.A.; FÁVARO, R.M.D.; OKADA, M.M. Qualidade físico-química e microbiológica do leite de cabra pasteurizado e Ultra Alta Temperatura, comercializado na região de Ribeirão Preto-SP. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v.64, n.1, p.104-109, 2005.

ORDÓÑEZ, Juan A. *Tecnologia de Alimentos: Alimentos de Origem Animal*. v.2. Porto Alegre: Artmed, 2005.

PAES, P.R.O.; LOPES, S.T.A.; LOPES, R.S.; KOHAYAGAWA, A.; TAKAHYRA, R.K.; LANGONI, H. Effects of administration of vitamin E on mammary health and milk cell counts of first parturition goats experimentally challenged with *Staphylococcus aureus*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 55, n. 1, 2003.

PAAPE M.J.; CAPUCO A.V. Cellular defense mechanisms in the udder and lactation of goats. *Journal Animal Science*, v. 75, n. 2, p. 565, 1996.

PARK, Y.W.; HUMPHREY, R.D. Bacterial cell counts in goat milk and their correlations with somatic cell counts, percent fat and protein. *Journal of Dairy Science*, v.69, p.32-37, 1986.

PARK, Y. W. Minor Species Milk. In: PARK, Y. W., HAENLEIN, G. F. W. *Handbook of Milk of Non-bovine Mammals*. Oxford: Blackwell Publishing Professional, p. 393-406. 2006.

PARK Y.W., JUÁREZ M., RAMOS M. & HAENLEIN G.F.W.. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, v. 68, p. 88-113, 2007.

PEIXOTO, R.M.; FRANÇA, C.A.; SOUZA JÚNIOR, A.F.; VESCHI, J.L.A.; COSTA, M.M. Etiologia e perfil de sensibilidade antimicrobiana dos isolados bacterianos da mastite em pequenos ruminantes e concordância de técnicas empregadas no diagnóstico. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.30, n.9, p.735-740, 2010.

PEREIRA D.B.C., SILVA P.H.F., COSTA JÚNIOR L.C.G. & OLIVEIRA L.L.. *Físico-química do leite e derivados: métodos analíticos*. 2. ed. Editora EPAMIG, Juiz de Fora, p.234. 2001.

PETZ, M. Residue analysis for antibiotics. *Meat Focus Int.*, v.5, n.10, p. 352-353, 1996.

PIRISI, A.; LAURET, A.; DOBEUF, J. P. Basic and incentive payments for goat and sheep milk in relation to quality. *Small Ruminant Research*, v.68, n.1-2, p.167- 178, 2007.

PRESTES, D.S.; FILAPPI, A.; CECIM, M. Susceptibilidade à mastite: fatores que a influenciam: uma revisão. *Revta FZVA*, Uruguaiana, v.9, n.1, p.118-132, 2002.

PYÖRÄLÄ S.; TAPONEN S. Coagulase-negative staphylococci: Emerging mastitis pathogens. *Veterinary Microbiology*, v. 134, p. 3-8, 2009.

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 jan. 2016.

QUEIROGA R.C.R.E. Caracterização nutricional, microbiológica, sensorial e aromática do leite de cabra Saanen, em função do manejo do rebanho, higiene da ordenha e fase de lactação [Tese de Doutorado]. Recife, Pernambuco: Universidade Federal de Pernambuco, 2004. 148 pp.

QUEIROGA, R.C.R.E.; COSTA, R.G.; BISCONTINI, T.M.B.; MEDEIROS, A.N.; MADRUGA, M.S.; SHULER, A.R.P. Influência do manejo do rebanho, das condições higiênicas da ordenha e da fase de lactação na composição química do leite de cabras Saanen. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.36, p.430-437, 2007.

QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E. et al. *Microbiologia Veterinária e Doenças Infeciosas*. São Paulo: Artmed, 2005. 512 p.

RAYNAL-LJUTOVAC, K.; LAGRIFFOUL, G.; PACCARD, P.; GUILLET, I.; CHILLIARD, Y. Composition of goat and sheep milk products: An Update. *Small Ruminant Research*, v.79, p.57-72, 2008.

RIBEIRO, M.E.R.; PETRINI, L.A.; AITA, M.F.; BALBINOTTI, M.; STUMPF JR, W.; GOMES, J.F.; SCHRAMM, R.C.; MARTINS, P.R.; BARBOSA, R.S. Relação entre mastite clínica, subclínica infecciosa e não infecciosa em unidades de produção leiteiras na região sul do Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Agrociência*, v.9, n.3, p.287-290, jul./set. 2003.

RIBEIRO, M.G.; LARA, G.H.B.; BICUDO, S.D. SOUZA, A.V.G.; SALERNO, T.; SIQUEIRA, A.K.; GERALDO, J.S. An unusual gangrenous goat mastitis caused by *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* and *Escherichia coli* co-infection. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 59, n.3, p. 810-812, maio 2007.

RIBEIRO, A.C.; RIBEIRO, S.D.A. Specialty products made from goat milk. *Small Ruminant Research*. V. 89, p.225-233, 2010.

RICH, M.; DEIGHTON, L.; ROBERTS, L. Clindamycin resistance in Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from animals. *Vet. Microbiol.*, v.111, p.237-240, 2005.

ROCHA, D. *Caprinocultura: o leite de cabra como alimento funcional*. *Zootecnia Brasil*, 2007. Disponível em: <<http://www.zootecniabrasil.com.br/sistema/modules/wfsection/article.php>>. Acesso em: 30 ago. 2015.

SABOUR, P.M.; GILL, J.J.; LEPP, D. Molecular Typing and Distribution of *Staphylococcus aureus* Isolates in Eastern Canadian Dairy Herds. *J. Clin. Microbiol.*, v.42, p.3449-3455, 2004.

SAINI, A.L.; GILL, R.S. Goat milk: An attractive alternate. *Indian Dairyman*. v.42, p.562-564, 1991.

SALINA A., MACHADO G.P., GUIMARÃES F.F., LANGONI H. Sensibilidade microbiana de *Staphylococcus* spp. isolados de leite de cabras com mastite subclínica. *Vet. e Zootec.*, v.22, n.2, p. 288-294, 2015.

SANTOS, M. G. O. Monitoramento das Condições de Processamento de Leite de Cabra Através do Método de Análise de Perigos e Pontos críticos de Controle – APPCC em Mini-usinas do Cariri Paraibano. 2005. 94 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária de pequenos ruminantes).

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite. São Paulo: Manole, 2007. 314 p.

SANTOS, O.D.; DE RESENDE, M.C.; DE MELLO, A.L.; FRAZZON, A.P.; D'AZEVEDO, P.A. The use of whole-cell protein profile analysis by SDS-PAGE as an accurate tool to identify species and subspecies of coagulase-negative staphylococci. *APMIS*, v.120, n.1, p.39-46, 2011.

SCHENCK, F.J.; CALLERY, P.S. Chromatographic methods of analysis of antibiotics in milk. *J. Chromatogr., A*, Amsterdam, v.812, p. 99-109, 1998.

SHEARER, J.K.; HARRIS JR., B. Mastitis in Dairy Goats. DS 85, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. Jun. 2003. Disponível em: <<http://edis.ifas.ufl.edu>>. Acesso em 08 out. 2015.

SIERRA D., SÁNCHEZ A. & CORRALES J.C.. *Differential cell counts in goat's milk*. In: International Symposium on the Milking of Small Ruminants, 6., 1999, Athens, Wageningen. 1999, p.178-180.

SILVA E.R., SAUKAS T.N., ALVES S.F.A. & PINHEIRO R.R. Contagem de células somáticas e California Mastitis Test no diagnóstico da mastite caprina subclínica. *Revista Brasileira Medicina Veterinária*, v. 18, n. 2, p. 78-83, 1996.

SILVA, E.R.; ARAÚJO, A.M.; ALVES, F.S.F.; PINHEIRO, R.R.; SAUKAS, T.N. Associação entre o California Mastitis Teste e a Contagem de Células Somáticas na avaliação da saúde da glândula mamária caprina. *Brazilian Journal Veterinarian Research Animal Science*, São Paulo, v. 38, n. 1, p. 46-48, 2001.

SILVA, L. M. de.; CARVALHO, M. G. X. de.; SIQUEIRA, I. N. de.; LIMA, S. C. P. de.; SANTOS, M. G. O. de.; XAVIER, V. M. C.; HOLANDA, S. A. M.; Pesquisa de resíduos de antibiótico  $\beta$ -lactâmico no leite de cabra cru fornecido a seis mini-usinas do Cariri paraibano. Anais... XXII Congresso Nacional de Laticínios. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*. Juiz de Fora. v.60, n.345, p.274-276, jul/ago de 2005.

SILVEIRA, J. A. D. Leite de Cabra. São José dos Campos, SP. 2008. Disponível em: <<http://www.riocapri.com.br/artigo7.pdf>>. Acesso em: 18 ago 2015.

SIQUEIRA, I. N. Características físico-químicas e pesquisa de resíduos de antibióticos no leite de cabra cru nas mini-usinas do Cariri Paraibano. 2007. 83f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária de Pequenos Ruminantes). Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, PB, 2007.

SOUZA, G.N.; FARIA, C.G.; MORAES, L.C.D; RUBIALE, L. Contagem de Células Somáticas (CCS) em leite de cabra. *Panorama do Leite* – Embrapa Gado de Leite, ano 2, n.10, ago.2007. Disponível em: <<http://www.cileite.com.br/panorama/qualidade10.html>>. Acesso em: 03 set. 2015.

SOUZA, G.N.; BRITO, J.R.F.; BRITO, M.A.V.P.; LANGE, C.; FARIA, C.G.; MORAES, L.C.D.; FONSECA, R.G.; SILVA, Y.A. Composition and bulk tank somatic cell counts of milk from dairy goat herds in southeastern Brazil. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* v.46, n., p.19-24, 2009.

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.

THACKER, J.D.; CASALE, E.S.; TUCKER, C.M. Imunoassays (ELISA) for rapid, quantitative analysis in the food-processing industry. *J. Agric. Food Chem.*, v.44, p.2680-2685, 1996.

THORNSBERRY, C.; MCDUGAL, L.K. Successful use of broth microdilution in susceptibility tests for methicillinresistant (heteroresistant) staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology*, v.18, p.1084–1091, 1983.

TRONCO, V. M., Controle Físico-Químico do Leite. In: *Manual para Inspeção da Qualidade do Leite*. Santa Maria, RS: UFMS, 1997. Cap. V, p. 103-105.

TROMBETE, F.M.; SANTOS, R.R.; SOUZA, A. resíduos de antibióticos en la leche comercializada en Brasil: una revisión de los estudios publicados en los últimos años. *Rev Chil Nutr*, v. 41, n. 2, 2014.

VIGUIER, C.S.; ARORA, N.; GILMARTIN, K.; WELBECK, R.; O’KENNEDY. Mastitis detection current trends and future perspectives. *Trend. Biotechnol.*, v.27, n.8, p.486-493, 2009.

VILEI, E.M.; KORCZAK, B.M.; FREY, J. *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC can be grouped into a single subspecies. *Veterinary Research*, v. 37, p. 779-790, 2006.

WELLER, T.M.A. The distribution of *mecA*, *mecRI* and *mecI* and sequence analysis of *mecI* and the *mec* promoter region in staphylococci expressing resistance to methicillin. *J. Antimicrob. Chemother.* V.43, p.15-22, 2000.

WILSON, D.J.; STEWART, K.N; SEARS, P.M. Effects of stage of lactation, production, parity and season on somatic cells counts in infected and uninfected dairy goats. *Small Ruminants Research*, v. 16, p. 165-169, 1995.

ZAMBOM, M. A. *Desempenho e qualidade do leite de cabras saanen alimentadas com diferentes relações volumoso: concentrado, no pré-parto e lactação*. Maringá, 2003. 57 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)- Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Maringá, 2003.

ZENG, S. S. Comparison of goat milk standards with cow milk standards for analyses of somatic cell count, fat and protein in goat milk. *Small Ruminant Research*, v.21, n.3, p.221-225, 1996.