

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL**  
***CAMPUS* REALEZA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE, BEM-ESTAR E PRODUÇÃO**  
**ANIMAL SUSTENTÁVEL NA FRONTEIRA SUL**

**RAFAEL LUAN PERIN**

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE *STAPHYLOCOCCUS XYLOSUS* CAUSADORES DE**  
**INFECÇÕES INTRAMAMÁRIAS EM OVELHAS DA RAÇA LACAUNE**

**REALEZA**

**2025**

**RAFAEL LUAN PERIN**

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE *STAPHYLOCOCCUS XYLOSUS* CAUSADORES DE  
INFECCÕES INTRAMAMÁRIAS EM OVELHAS DA RAÇA LACAUNE**

Dissertação apresentada para o Programa de Pós-Graduação em Saúde, Bem-Estar e Produção Animal Sustentável na Fronteira Sul da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), como requisito para obtenção do título de Mestre em Saúde, Diagnóstico e Bem-Estar Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Maiara Garcia Blagitz Azevedo

Coorientador: Prof. Dr. Fernando Nogueira de Souza

**REALEZA**

**2025**

## **Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS**

Perin, Rafael Luan

Diversidade genética de *Staphylococcus xylosus* causadores de infecções intramamárias em ovelhas da raça Lacaune / Rafael Luan Perin. -- 2025.  
31 f.

Orientadora: Doutora Maiara Garcia Blagitz Azevedo  
Co-orientador: Doutor Fernando Nogueira de Souza  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Fronteira Sul, Intercâmbio Acadêmico em Saúde, Bem Estar e Produção Animal Sustentável Na Fronteira Sul, Realeza, PR, 2025.

1. Epidemiologia molecular. 2. *Staphylococcus* não-aureus. I. Azevedo, Maiara Garcia Blagitz, orient. II. Souza, Fernando Nogueira de, co-orient. III. Universidade Federal da Fronteira Sul. IV. Título.

Elaborada pelo sistema de Geração Automática de Ficha de Identificação da Obra pela UFFS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

**RAFAEL LUAN PERIN**

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE *STAPHYLOCOCCUS XYLOSUS* CAUSADORES DE  
INFECCÕES INTRAMAMÁRIAS EM OVELHAS DA RAÇA LACAUNE**

Dissertação apresentada para o Programa de Pós-Graduação em Saúde, Bem-Estar e Produção Animal Sustentável na Fronteira Sul da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), como requisito para obtenção do título de Mestre em Saúde, Diagnóstico e Bem-Estar Animal.

Este trabalho foi defendido e aprovado pela banca em 18/06/2025.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Maiara Garcia Blagitz Azevedo – UFFS  
Orientadora

---

Prof. Dr. Marcos Bryan Heinemann – USP  
Avaliador

---

Profa. Dra. Alice Maria Melville Paiva Della Libera – USP  
Avaliadora

Dedico esse trabalho aos meus pais Renato e Carmen, com todo meu amor e gratidão, por tudo que fizeram por mim ao longo de minha vida.

## AGRADECIMENTO

Em primeiro lugar, a Deus, por todas as bênçãos e oportunidades colocadas em meu caminho.

À minha família, por sempre ter acreditado em mim e tornado esse sonho possível.

À minha mãe, Carmen, por ser exemplo de força, amor e perseverança.

Ao meu pai, Renato, por seu exemplo de amor aos filhos e temor a Deus.

Aos meus irmãos, Ricardo, Mateus e Ravi, pelas risadas que transformam dias pesados em leves.

À minha companheira, Juliana, por ter sido alicerce sólido e companhia incondicional em tantos momentos difíceis.

Ao curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Fronteira Sul e seu corpo docente, pelo exemplo profissional de amor e dedicação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Saúde, Bem-Estar e Produção Animal Sustentável na Fronteira Sul, pelos ensinamentos e oportunidades.

À minha orientadora, Profa. Dra. Maiara Garcia Blagitz Azevedo, por sua sabedoria, paciência e dedicação ao longo do desenvolvimento de nossas pesquisas.

À família Blagitz, colegas de graduação e pós-graduação que sempre auxiliaram e vibraram pelo sucesso de nossas atividades.

À Profa. Dra. Alice Maria Melville Paiva Della Libera, pelo suporte material e emocional à execução desta pesquisa.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Fernando Nogueira de Souza, pela paciência e dedicação demonstradas na idealização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcos Bryan Heinemann e a todo o Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da FMVZ-USP, pelo apoio e conhecimento que permitiram a realização deste estudo.

Ao colega de pós-graduação, Gabriel Siqueira dos Santos, por sua competência científica inigualável e disposição em ensinar, sem as quais nada disso poderia ter se concretizado.

À coordenadora do PPG-SBPAS, Profa. Dra. Tatiana Champion, por nos ensinar a olhar além dos horizontes.

À Profa. Dra. Dalila Moter Benvegnú e ao grupo de pesquisa BioSaúde Humana & Animal, pelos conselhos, ensinamentos e exemplo de dedicação à pesquisa.

Ao meu amigo e colega de pós-graduação, Isaac de Jesus de Oliveira (in memoriam), cuja dedicação aos amigos e à medicina veterinária serão eternamente lembrados.

A todos que direta ou indiretamente tornaram esse momento possível.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro concedido durante o período de mestrado.

Meu filho, não há felicidade sem coragem, nem virtude sem luta. A palavra virtude vem de força; a força é a base da virtude; a virtude só pertence a um ser fraco por natureza e forte por sua vontade; é só nisso que consiste o mérito do homem justo (Rousseau, 1762).

## RESUMO

As infecções intramamárias em ovinos, frequentemente associadas ao gênero *Staphylococcus*, representam um desafio sanitário e econômico, especialmente em sistemas de produção leiteira. Este estudo investigou a epidemiologia molecular de *S. xylosus* em casos de infecção intramamária em ovelhas, com foco em genes de resistência antimicrobiana e diversidade genética. Foram analisadas 24 amostras positivas para *S. xylosus* e identificou-se a presença do gene blaZ ( $\beta$ -lactamase) em 16,7% dos isolados e do gene mecC (resistência à meticilina) em 8,3%. Nenhuma amostra apresentou o gene mecA, sugerindo mecanismos alternativos de resistência, como efluxo ativo. A análise de RAPD-PCR revelou diversidade genética entre os isolados, com formação de subtipos distintos, indicando possíveis rotas de transmissão heterogêneas. A detecção de mecC reforça o papel de *S. xylosus* como reservatório de genes de resistência emergentes, com riscos de transferência horizontal para patógenos humanos. Os resultados destacam a necessidade de monitoramento contínuo desse patógeno e a adoção de práticas de manejo que reduzam a pressão seletiva por antimicrobianos. Além disso, a ausência de correlação direta entre genótipo e fenótipo de resistência ressalta a importância de abordagens integradas, combinando genômica e ensaios fenotípicos, para orientar terapias assertivas e políticas de controle em ovinocultura.

**Palavras-chaves:** Infecção intramamária. Resistência antimicrobiana. Formação de biofilme. Epidemiologia molecular.

## ABSTRACT

Ovine mastitis, frequently associated with *Staphylococcus* spp., represents a sanitary and economic challenge, particularly in dairy production systems. This study investigated the molecular epidemiology of *S. xylosus* in ovine mastitis cases, focusing on antimicrobial resistance genes and genetic diversity. Twenty-four *S. xylosus*-positive samples were analyzed, identifying the blaZ gene ( $\beta$ -lactamase) in 16.7% of isolates and the mecC gene (methicillin resistance) in 8.3%. No samples tested positive for the mecA gene, suggesting alternative resistance mechanisms, such as active efflux. RAPD-PCR analysis revealed genetic diversity among isolates, with distinct subtypes indicating heterogeneous transmission routes. The detection of mecC reinforces the role of *S. xylosus* as a reservoir for emerging resistance genes, posing risks of horizontal transfer to human pathogens. These findings underscore the need for continuous pathogen monitoring and the adoption of management practices to reduce antimicrobial selective pressure. Additionally, the lack of direct correlation between resistance genotype and phenotype highlights the importance of integrated approaches combining genomics and phenotypic assays to guide targeted therapies and control policies in ovine farming.

**Keywords:** Ovine mastitis. Antimicrobial resistance. Biofilm formation. Molecular epidemiology.

## SUMÁRIO

|          |                                                                                  |           |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO .....</b>                                                          | <b>11</b> |
| <b>2</b> | <b>REVISÃO DE LITERATURA .....</b>                                               | <b>13</b> |
| 2.1      | PATOFISIOLOGIA DA GLÂNDULA MAMÁRIA ..... <b>ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.</b>     |           |
| 2.2      | MASTITE EM PEQUENOS RUMINANTES .....                                             | 13        |
| 2.3      | <i>STAFILOCOCCUS</i> NÃO-AUREUS.....                                             | 14        |
| 2.4      | <i>STAPHYLOCOCCUS XYLOSUS</i> .....                                              | 15        |
| 2.4.1    | Características microbiológicas .....                                            | 15        |
| 2.4.2    | Patogenicidade.....                                                              | 15        |
| 2.4.3    | Identificação em leite e derivados .....                                         | 16        |
| 2.4.4    | Resistência a antimicrobianos .....                                              | 16        |
| 2.4.5    | Mecanismos de virulência e biofilme.....                                         | 17        |
| 2.4.6    | Implicações em saúde pública e biotecnologia.....                                | 17        |
| <b>3</b> | <b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                                                   | <b>18</b> |
| 3.1      | AMOSTRAS .....                                                                   | 18        |
| 3.2      | LOCAL DA PESQUISA.....                                                           | 18        |
| 3.3      | ENRIQUECIMENTO E CULTIVO DOS ISOLADOS BACTERIANOS .....                          | 18        |
| 3.4      | CULTURA E ANTIBIOGRAMA .....                                                     | 19        |
| 3.5      | REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE PARA PESQUISA DE <i>S. XYLOSUS</i><br>.....       | 19        |
| 3.6      | REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE PARA PESQUISA DE GENES<br>MECC, MECA E BLAZ ..... | 20        |
| 3.7      | ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA POR RAPD-PCR.....                                | 20        |
| 3.8      | ANÁLISE ESTATÍSTICA .....                                                        | 21        |
| 3.9      | RESULTADOS E DISCUSSÃO .....                                                     | 21        |
| <b>4</b> | <b>CONCLUSÃO .....</b>                                                           | <b>25</b> |
|          | <b>REFERÊNCIAS.....</b>                                                          | <b>26</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

As primeiras secreções lácteas em animais surgiram há mais de 150 milhões de anos, a partir de tecidos muito mais simples se comparados às glândulas mamárias dos mamíferos atuais. Nos sinapsídeos ancestrais aos mamíferos, é provável que uma secreção semelhante ao leite fosse produzida pela pele, provavelmente para umidificar e proteger ovos, antes da emergência da amamentação como estratégia reprodutiva (Widelitz *et al.*, 2007). Com a evolução dos mamíferos, especialmente após a transição para o viviparismo, o tecido mamário assumiu novas organizações e especializou-se na síntese de nutrientes, culminando no leite que sustenta filhotes de ruminantes e humanos. Durante a última era glacial, o consumo de leite por adultos era arriscado devido à intolerância à lactose. A persistência da enzima lactase, fruto de uma mutação genética, permitiu que populações europeias explorassem esse recurso, impulsionando o desenvolvimento de civilizações (Curry, 2013).

Durante o período Neolítico, com a domesticação de ruminantes, o leite tornou-se importante fonte alimentar para as populações humanas, conforme apontado em análise isotópica de ácidos graxos ( $\delta^{13}\text{C}$ ) extraídos de cerâmicas que indicam a utilização e o processamento do leite de ruminantes há pelo menos 6500 anos antes de Cristo (Evershed *et al.*, 2008). Atualmente, o leite bovino, caprino, ovino e bubalino é um pilar alimentar global, mas sua produção enfrenta desafios sanitários críticos, como as infecções intramamárias causadoras de mastite.

No contexto da ovinocultura, atividade em expansão no Brasil (Bianchi *et al.*, 2023), as infecções intramamárias destacam-se como um entrave econômico e sanitário. Essa condição está frequentemente associada a patógenos como os *Staphylococcus* não-aureus (SNA), grupo que inclui o *Staphylococcus xylosus*. Esses microrganismos, embora menos estudados que o *S. aureus*, exibem complexidade epidemiológica: são comensais em nichos como a pele de camundongos (Battaglia; Garrett-Sinha, 2023), mas podem se tornar oportunistas em hospedeiros imunocomprometidos, causando infecções locais e sistêmicas (Akhaddar *et al.*, 2010; Çolak *et al.*, 2024). Além disso, sua capacidade de formar biofilmes resistentes, mediados por DNA extracelular e proteínas como SxsA (Schiffer *et al.*, 2022), e de adquirir resistência a antimicrobianos via plasmídeos (Milton; Hewitt; Harwood, 1992), os transforma em potenciais reservatórios de genes de virulência e resistência, com riscos de transferência horizontal para patógenos humanos (Leroy; Christieans; Talon, 2019).

Em ovinos, as infecções intramamárias por SNA estão relacionadas a perdas produtivas, alterações na qualidade do leite (Vasil *et al.*, 2016) e desafios terapêuticos, agravados pela

multirresistência de cepas a quinolonas,  $\beta$ -lactâmicos e macrolídeos (Al-Tameemi *et al.*, 2023; Vela *et al.*, 2012). A detecção de material genético bacteriano em leite pasteurizado (Vasileiou *et al.*, 2019) amplia as preocupações, sugerindo que o consumo de derivados lácteos possa veicular não apenas patógenos, mas também determinantes genéticos de resistência. A escassez de dados sobre a epidemiologia molecular do *S. xylosus* em rebanhos ovinos limita a elaboração de estratégias eficazes de controle, especialmente em países como o Brasil, cuja cadeia produtiva de leite ovino está em consolidação (Pulina *et al.*, 2018).

Diante desse cenário, este estudo visa descrever a epidemiologia molecular do *Staphylococcus xylosus* em casos de infecção intramamária, investigando fatores genéticos de virulência, padrões de resistência antimicrobiana e dinâmicas de transmissão. Os resultados buscarão subsidiar medidas de prevenção, tratamento e controle, mitigando impactos econômicos e reduzindo riscos associados à disseminação de resistência em cadeias produtivas e ecossistemas microbianos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

Em pequenos ruminantes o úbere está localizado na região inguinal e é formado por duas glândulas independentes. Sua superfície é revestida pelo aparelho suspensório mamário e separado pelo ligamento suspensório do úbere na linha média ventral. Cada glândula mamária possui internamente um epitélio túbulo-alveolar típico com um grande seio lactífero composto por uma parte glandular e outra parte papilar. Dois esfíncteres estão presentes: o primeiro entre as duas partes do seio lactífero e o segundo no aspecto distal do ducto papilar (canal do teto), na abertura de um orifício único denominado óstio papilar (Caja; Such; Rovai, 2000). Histologicamente, a glândula mamária dos ovinos é semelhante à encontrada em outros ruminantes, exceto pela presença de grande número de células ciliadas cujas funções e importância não são claras (Brooker, 1984). O leite produzido pelas células mamárias serve tanto para a nutrição de sua prole, como para o crescimento bacteriano e o surgimento de infecções. Esses e outros mecanismos serão abordados ao longo desta revisão.

### 2.1 MASTITE EM PEQUENOS RUMINANTES

O termo mastite é utilizado para definir a inflamação da glândula mamária. Suas causas podem ser secundárias a traumas físicos, substâncias químicas ou agentes infecciosos como vírus, fungos e bactérias (Contreras; Rodríguez, 2011). O quadro é classificado em dois grupos principais que levam em consideração os sinais clínicos apresentados: mastite clínica e mastite subclínica (Zadoks *et al.*, 2011). Na mastite clínica ocorrem os sinais clássicos de inflamação (dor, rubor, aumento de volume, calor) e alterações físicas na característica do leite secretado pelo animal (Sharun *et al.*, 2021), enquanto na mastite subclínica as principais características são a alteração da composição química do leite, com aumento de proteínas séricas e leucócitos (Khan *et al.*, 2024). Essas alterações podem ser identificadas por meio de exames complementares, conforme será abordado adiante (Deb *et al.*, 2013a).

Além das preocupações com a saúde do animal, a mastite pode gerar outros problemas. Do ponto de vista sanitário, quando consequente as causas infecciosas, a mastite pode disseminar-se rapidamente pelo rebanho, comprometendo a saúde e o bem-estar dos animais (McLaren *et al.*, 2018). Ainda neste sentido, o leite produzido apresenta alterações organolépticas que podem afetar a qualidade do produto *in natura* e de seus derivados (Alba *et al.*, 2019). Do ponto de vista econômico, a mastite é responsável pelo descarte precoce de animais, pela redução na produção individual (Knuth *et al.*, 2021) e pelo aumento dos custos de produção associados à serviços médico-veterinários e medicamentos.

Para seu controle são necessárias uma série de medidas de manejo para identificar rapidamente casos da doença e garantir maiores chances de cura (Ruegg, 2017). Com o diagnóstico precoce, é possível reduzir os riscos de transmissão entre animais (Deb *et al.*, 2013b). Outra técnica utilizada para a redução da contaminação a partir do ambiente, bem como da infecção entre animais são o uso de sanitizantes denominados *pré-dipping* e *pós-dipping* (Silva *et al.*, 2024). Consistem em substâncias microbidas utilizadas antes e após a ordenha dos animais com o objetivo de reduzir a contaminação do teto e prevenir a entrada de bactérias após a ordenha, enquanto o esfíncter permanecer aberto (Krupelnytskyi, 2023).

Abordagens tem sido analisadas em busca de controlar a mastite em ovelhas. Vários estudos comprovaram que existem genes relacionados a uma maior resistência a mastite e que, portanto, a seleção genética pode ser realizada, levando em consideração dados como contagem de células somáticas, mas também, predições genéticas (Banos *et al.*, 2017; Bergonier *et al.*, 2003). Isso foi evidenciado também pela maior resistência de algumas raças em detrimento de outras, e pela identificação de regiões genômicas associadas a este traço (Banos *et al.*, 2017; Goñi *et al.*, 2004; Vasileiou *et al.*, 2018).

Estudos determinaram que a resistência a antibióticos em isolados de *Staphylococcus* não-aureus de mastite ovina na Ásia e América do Sul apresentaram maior resistência quando comparado com estudos realizados na Europa (Lysitsas *et al.*, 2023).

## 2.2 STAFILOCOCCUS NÃO-AUREUS

A importância das infecções por *Staphylococcus* não-aureus está cada vez mais clara para a comunidade científica. Em um estudo observacional realizado entre os anos de 2022 e 2023 com 20 fazendas produtoras de leite ovino da Nova Zelândia observou-se predominância de *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* não-aureus (Chambers *et al.*, 2024). Ressaltando, por sua vez, um grupo de *Staphylococcus* não-aureus, outro estudo observou que em ovelhas de corte criadas intensivamente os *Staphylococcus* não-aureus foram os principais agentes etiológicos causadores de infecções intramamárias subclínicas, responsáveis por 72,1% do total. Diante destes dados, ressaltam a importância de realizar estudos com o objetivo de elaborar tratamentos baseados na etiologia, por meio da caracterização da virulência, resistência à antimicrobianos e das rotas de transmissão da doença (Peckler *et al.*, 2024). Para fins de identificação do agente etiológico e posterior correta abordagem terapêutica, provou-se a efetividade de métodos moleculares como o MALDI-TOF - *Matrix Associated Laser Desorption-Ionization – Time of Flight* (Rosa *et al.*, 2022).

A diversidade genética foi descrita em algumas observações realizadas em mastites estafilocócicas. Nestas, não houve diferença significativa entre isolados de *S. aureus* de mastites clínicas e subclínicas de ovinos e caprinos, indicando que animais com mastite subclínica são reservatórios de *S. aureus* responsáveis por causar mastites clínicas. Assim, concluiu-se que o controle da mastite subclínica é determinante para o controle da mastite clínica em pequenos ruminantes (Hoekstra *et al.*, 2019). Enquanto isso, resultados de investigações quanto ao microbioma e microbiota de leite de ovinos da raça Manchega revelaram poder existir diferenças significativas entre o microbioma de animais com e sem histórico de mastite clínica (Castro *et al.*, 2019).

Recentemente foi identificada a presença de genes associados a resistência a antimicrobianos, produção de biofilme e outros genes regulatórios em isolados de *Staphylococcus* não-aureus, como *blaZ*, *sasC*, *ica*, *bap* e *agr*, confirmando a capacidade que estas espécies possuem de adquirir genes de virulência bacteriana e atuarem como patógenos em mastites ovinas (Capri *et al.*, 2024).

## 2.3 STAPHYLOCOCCUS XYLOSUS

### 2.3.1 Características microbiológicas

O *Staphylococcus xylosus* é um coco Gram-positivo, coagulase-negativo, não hemolítico, fosfatase-positivo, que cresce em pequenas colônias brancas (<5 mm de diâmetro) em ágar sangue. Esta bactéria é catalase-positiva, com pelo menos dois genes responsáveis pela codificação de enzimas catalase, sendo que o gene *katA*, presente em outros estafilococos, pode não ser o principal responsável pela síntese da enzima nessa espécie (Barrière, 2002). Demonstra capacidade de crescimento em meios salinos e metabolização de xilose (Conrad; West, 1984). Além disso, possui habilidade de espalhar-se sobre superfícies, o que favorece a colonização (Dordet-Frisoni *et al.*, 2008).

### 2.3.2 Patogenicidade

Embora tradicionalmente considerado não patogênico para humanos (Battaglia; Garrett-Sinha, 2023), o *S. xylosus* foi identificado como agente de pielonefrite aguda em uma paciente de 26 anos (Tselenis-Kotsowilis; Koliomichalis; Papavassiliou, 1982), abscesso cerebral em adolescente (Akhaddar *et al.*, 2010), sacrolite séptica com formação de abscesso (Çolak *et al.*, 2024) e pseudocisto pancreático em imunossuprimido (Mastroianni *et al.*, 1994). Em modelos

animais, está associado a dermatite epizootica fatal em camundongos atímicos (Bradfield *et al.*, 1993) e dermatite aguda (Acuff *et al.*, 2017).

Apesar de comensal da pele de camundongos, sua patogenicidade emerge em condições de lesão cutânea, embora não infecte a pele humana (Battaglia; Garrett-Sinha, 2023). Comparado a *S. aureus* e *S. epidermidis*, apresenta menor virulência e ausência de adesinas, enterotoxinas estafilocócicas, leucocidinas,  $\alpha$ -hemolisina e  $\gamma$ -hemolisina (Tan *et al.*, 2014). No entanto, compartilha genes de virulência com *S. aureus* via transferência genética lateral: transdução, transformação ou conjugação (Kaur *et al.*, 2016).

### 2.3.3 Identificação em leite e derivados

*S. xylosus* e *S. equorum* foram identificados em leite de cabra e derivados usando ribotipagem para diferenciação de espécies (Meugnier *et al.*, 1996). Em bovinos leiteiros, sua ocorrência é relevante, associando-se a mastites e alterações na qualidade do leite, como redução de proteína e matéria seca (Freu *et al.*, 2024; Vasil *et al.*, 2016). Infecções por *Staphylococcus* não-aureus causam perdas econômicas devido à queda na produção e alterações na composição do leite (Vasil *et al.*, 2016).

### 2.3.4 Resistência a antimicrobianos

As primeiras análises de susceptibilidade relataram resistência à eritromicina (CIM 150  $\mu\text{g/mL}$ ) e sensibilidade à penicilina e outras dez substâncias (Tselenis-Kotsowilis; Koliomichalis; Papavassiliou, 1982). Mecanismos de resistência baseados em plasmídeos são críticos: o plasmídeo pCH200 (52 kb) está ligado à resistência à eritromicina e pode ser transferido para *S. aureus* e *B. subtilis* (Götz *et al.*, 1983; Milton; Hewitt; Harwood, 1992).

Estudos recentes destacam multirresistência: 45% dos isolados de queijo Bryndza na Eslováquia apresentaram resistência a múltiplos antimicrobianos (Mikulášová *et al.*, 2014). A cepa NM36, isolada de mastites bovinas, possui nove determinantes de resistência, incluindo quinolonas, metilicina e tetraciclina (Al-Tameemi *et al.*, 2023). Resistência à oxacilina foi observada sem detecção do gene *mecA*, sugerindo mecanismos alternativos (Vela *et al.*, 2012). Além disso, há relatos de resistência cruzada entre tilosina e florfenicol (Chen *et al.*, 2022) e efluxo de tetraciclina mediado pelo gene *tetK* (Cheng *et al.*, 2019).

### 2.3.5 Mecanismos de virulência e biofilme

A formação de biofilme em *S. xylosus* envolve matrizes de DNA extracelular (eDNA) liberadas por lise celular, diferindo de outros estafilococos (Leroy *et al.*, 2021). A proteína Bap, dispensável nessa espécie, é substituída por outros mecanismos, como a proteína SxsA (Schiffer *et al.*, 2021, 2022). Comparado a *S. epidermidis* (forte formador de biofilme ica-positivo), *S. xylosus* ica-negativo exibe intensidade similar, sugerindo papel central do gene bap (Schiffer *et al.*, 2019).

A modulina PSM $\alpha$  produzida por *S. xylosus* é mais potente que a  $\delta$ -toxina de *S. aureus*, mas secretada em menor quantidade (Reshamwala *et al.*, 2022). Além disso, quando co-cultivado com *S. aureus*, *S. xylosus* inibe a formação de biofilme deste (Leroy *et al.*, 2020).

### 2.3.6 Implicações em saúde pública e biotecnologia

Apesar de subestimado historicamente (Meugnier *et al.*, 1996), o *S. xylosus* é um potencial reservatório de genes de resistência, com capacidade de transferência horizontal para patógenos humanos (Leroy; Christieans; Talon, 2019; Vela *et al.*, 2012). Seu uso como *starter* em fermentação alimentar exige cautela devido a esse risco (Leroy; Christieans; Talon, 2019).

O sequenciamento da cepa HKUOPL8 (isolada de fezes de panda) revelou genes associados à produção de muco (ureABCEFGD), resistência à fagocitose (SCCcap1) e transporte de metais (mtsABC), explicando sua patogenicidade em imunocomprometidos (Ma *et al.*, 2014).

Estudos reforçam a necessidade de reavaliar abordagens terapêuticas para *Staphylococcus* não-aureus (Al-Tameemi *et al.*, 2023) e desenvolver estratégias de controle específicas para espécies predominantes em infecções intramamárias (Jenkins *et al.*, 2019).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 AMOSTRAS

As amostras utilizadas neste estudo foram doadas pelo projeto aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Fronteira Sul (CEUA/UFFS) com o protocolo número 23205.003339/2018-02. Estas provêm de 50 ovelhas da raça Lacaune, sendo 20 primíparas e 30 múltiparas, de propriedade leiteira localizada na cidade de Chapecó, Estado de Santa Catarina, Brasil. Inicialmente, as bactérias foram isoladas em ágar-sangue (5% de sangue bovino) e armazenadas em caldo infusão cérebro-coração (BHI; #K25620007, Kasvi®, São José dos Pinhais, Brasil), suplementado com 10% de glicerina (Dinâmica®, São Paulo, Brasil), a -20°C até a análise de espectrometria de massa com fonte de ionização e dessorção a laser assistida por matriz e analisador de tempo-de-voo (MALDI-TOF). Com a realização do MALDI-TOF obteve-se a identificação das espécies bacterianas presentes em cada amostra, que foram novamente criopreservadas (-80°C) e encontravam-se disponíveis para a realização de novos testes moleculares.

Para compor o grupo de isolados oriundos de amostras de leite foram selecionadas as amostras contendo *Staphylococcus xylosus* em duas categorias: infecção intramamária transitória quando o patógeno foi identificado ao menos em uma amostra entre coletas consecutivas, descartando-se o primeiro e último momentos por ausência de histórico anterior e posterior à realização da pesquisa; e infecção intramamária persistente quando o patógeno foi identificado em  $\geq 3$  coletas consecutivas. Para cada caso de infecção intramamária persistente optou-se aleatoriamente pelo isolado de uma das coletas, uma vez que estas representam a mesma cepa.

#### 3.2 LOCAL DA PESQUISA

A pesquisa foi realizada no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (VPS/FMVZ – USP).

#### 3.3 ENRIQUECIMENTO E CULTIVO DOS ISOLADOS BACTERIANOS

As amostras selecionadas foram descongeladas e cultivadas em caldo BHI durante 24 horas. O crescimento bacteriano foi observado por meio da turbidez do meio. Aproximadamente 10 µL de leite foram inoculados em placa de ágar-sangue (contendo 5% de

sangue bovino) com o auxílio de uma alça de inoculação descartável estéril. As placas foram incubadas aerobicamente a 37°C e verificadas 24, 48 e 72 horas após a inoculação quanto à presença de crescimento bacteriano.

### 3.4 CULTURA E ANTIBIOGRAMA

Para a avaliação do perfil de resistência antimicrobiana das cepas de *Staphylococcus xylosus*, procedeu-se à semeadura das amostras previamente incubadas em caldo Brain Heart Infusion (BHI) por 24 horas a 37°C. A partir desse cultivo, o inóculo bacteriano foi padronizado para uma turbidez, utilizando solução salina estéril como diluente. Com auxílio de uma alça bacteriológica estéril, o inóculo foi semeado por esgotamento em placas de Petri contendo ágar Mueller-Hinton, garantindo uma distribuição homogênea.

Em seguida, discos de antibióticos foram dispostos sobre a superfície do ágar, respeitando uma distância mínima de 24 mm entre centros de discos e 15 mm das bordas da placa, conforme recomendações do BRCast (*Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) para amostras veterinárias. Foram testados dez antimicrobianos, abrangendo diferentes classes terapêuticas: tetraciclina (TET, 30 µg), amicacina (AMI, 30 µg), eritromicina (ERI, 15 µg), sulfametoxazol-trimetoprima (SUT, 23,75/1,25 µg), clindamicina (CLI, 2 µg), cefoxitina (CFO, 30 µg), oxacilina (OXA, 1 µg), penicilina (PEN, 10 UI), gentamicina (GEN, 10 µg) e ciprofloxacino (CIP, 5 µg).

As placas foram incubadas a 35°C por 18–24 horas em aerobiose. Após o período de incubação, os diâmetros dos halos de inibição foram mensurados com paquímetro digital, e os resultados interpretados conforme os pontos de corte estabelecidos pelo BRCast para bactérias de origem veterinária.

### 3.5 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE PARA PESQUISA DE *S. XYLOSUS*

Após o cultivo e crescimento das colônias bacterianas, estas foram selecionadas e extraídas com kit de extração (*Bacteria DNA Preparation Kit*, Cellco® Biotec do Brasil) de acordo com as instruções do fabricante. Então, foram submetidas a reação em cadeia da polimerase por método previamente estabelecido (Morot-Bizot; Talon; Leroy, 2004), para confirmação de sua identidade microbiológica.

### 3.6 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE PARA PESQUISA DE GENES MECC, MECA E BLAZ

Foram realizadas reações individuais para pesquisa de cada gene de resistência. Para cada reação utilizou-se o Master Mix Taq Pol (Cellco® Biotec do Brasil) e 40 ciclos de 95°C/1min, 95°C/15seg, 55°C/30seg e 72°C/30seg. Após os 40 ciclos, a termocicladora permaneceu a 72°C/2min e em seguida a 4°C até a corrida em gel de agarose.

### 3.7 ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA POR RAPD-PCR

A análise da diversidade genética foi realizada por meio de amplificação aleatória do DNA polimórfico por reação em cadeia da polimerase (RAPD-PCR) e determinação do coeficiente de similaridade de Dice dos isolados bacterianos conforme descrito anteriormente (Fitzgerald *et al.*, 1997; Piessens *et al.*, 2012). Primeiramente, foi realizada a extração do DNA genômico pelo kit *Bacteria DNA Prepartion* (Cellco Biotec do Brasil). Em seguida, cada amostra extraída teve sua qualidade e quantidade mensuradas em equipamento Espectrofotômetro NanoDrop® Thermo Scientific para padronização da quantidade de DNA utilizada na reação, bem como para verificar a qualidade e presença de resíduos do kit de extração. Então, 1 µL de DNA (50 ng/µL) foi utilizado para a amplificação. O programa de amplificação consistiu em 4 ciclos de desnaturação a 94°C por 5 minutos, anelamento a 36°C por 5 minutos e extensão a 72°C por 5 minutos; seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 36°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos; e uma etapa final de extensão a 72°C por 10 minutos. O primer utilizado foi o D11344, com 23 nucleotídeos de sequência 5'-AGTGAATTTCGCGGTGAGATGCCA-3'.

Os fragmentos gerados foram separados em gel de agarose em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE 1X; Invitrogen®, Paisly, Reino Unido) em 120 V durante 4 horas. Uma amostra controle (*Staphylococcus auriculares*, ATCC 33753) foi analisada em cada corrida. Os padrões de banda obtidos no RAPD foram analisados pelo programa BioNumerics® (Applied-Maths, bioMérieux, Marcy-l'Étoile, França). O coeficiente de similaridade de Dice foi calculado pelo BioNumerics®. Os resultados obtidos foram utilizados para a construção de dendrograma pelo método hierárquico UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*). Os parâmetros de otimização e tolerância de posição foram definidos como 0,5 e 1%, respectivamente. Para cada espécie, os subtipos identificados pelo RAPD receberam uma letra minúscula arbitrária com base no agrupamento.

### 3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O Coeficiente de Similaridade de Dice foi calculado pelo programa BioNumerics® com base na leitura das bandas geradas pela eletroforese em gel agarose. Com o coeficiente calculado, as informações foram expostas em dendrograma.

### 3.9 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a realização da reação em cadeia da polimerase (PCR) para identificação microbiológica, foram confirmadas 24 amostras positivas para *Staphylococcus xylosus*. Dentre estas, quatro amostras (A249, A338, A330 e A128) apresentaram positividade para o gene blaZ, associado à resistência a  $\beta$ -lactâmicos. Entre as amostras que apresentaram o gene blaZ, 100% apresentaram resistência a oxacilina, 50% apresentaram resistência a penicilina e tetraciclina e 25% apresentaram resistência a clindamicina e eritromicina.

Os resultados obtidos na identificação molecular de *Staphylococcus xylosus* associados à infecção intramamária ovina revelam aspectos relevantes sobre os mecanismos de resistência a antimicrobianos nesta espécie. Das 24 amostras positivas para *S. xylosus*, quatro (16,7%) apresentaram o gene blaZ, associado à resistência a  $\beta$ -lactâmicos, como penicilinas, por codificar uma  $\beta$ -lactamase. Esse achado corrobora estudos anteriores que identificaram a presença de blaZ em *S. xylosus* de origem animal, por sua vez, em frequências muito menores (Vela et al., 2012). A detecção deste gene reforça a hipótese de que a resistência a  $\beta$ -lactâmicos nesta espécie pode estar parcialmente mediada por enzimas modificadoras, embora a ausência de correlação entre a presença de blaZ e fenótipos de resistência específicos deva ser investigada em ensaios fenotípicos complementares.

Como observado neste estudo a presença do gene blaZ não determinou resistência a penicilina em todas amostras. Sabe-se que em *Staphylococcus aureus* existem polimorfismos do gene blaZ que produzem bactérias codificadoras de  $\beta$ -lactamase com alterações em seu sítio de ligação que fazem com que esta não acople devidamente no antimicrobiano (Rocha et al., 2022). A resistência a oxacilina, um  $\beta$ -lactâmico não suscetível a penicilinas, esteve presente em todas as amostras, sem relacionar-se com o gene mecA. Isso levanta a possibilidade de que represente resistência intrínseca destes isolados a determinados antimicrobianos, ou então, que seja coordenado por genes de resistência desconhecidos, conforme já sugerido anteriormente (Resch; Nagel; Hertel, 2008).

A resistência a tetraciclina é mediada pelos genes *tetK*, *tetL*, *tetM* e *tetO*, não investigados neste estudo. Sabe-se, porém, que esse gene pode ser transferido ao *S. xylosus* a

partir de cepas de *S. aureus* careadoras (Leroi; Christieans; Talon, 2019) e é possível que estivesse presente nas amostras analisadas. Estudos anteriores identificaram a presença do gene *tetK* em quase metade dos isolados de *S. xylosus* de infecções intramamárias em búfalos e alta homologia entre o gene encontrado em bactérias não-aureus e o *S. aureus*, indicando a possível transferência entre as espécies (El-Razik *et al.*, 2017).

A resistência a eritromicina é mediada por genes de resistência a macrolídeos, não investigados neste estudo. Estudos anteriores com *Staphylococcus* não-aureus identificaram a presença dos genes *erm*(C) ou *msr*(A/B) em todas as amostras resistentes a macrolídeos (Chajęcka-Wierzchowska *et al.*, 2015).

Dois isolados (A260 e A185) foram positivos para o gene *mecC* e nenhuma amostra demonstrou presença do gene *mecA*, responsável pela resistência à meticilina-resistência em estafilococos. Entre as amostras que apresentaram o gene *mecC*, 100% apresentaram resistência a oxacilina, 50% apresentaram resistência a penicilina, clindamicina e tetraciclina e nenhuma foi resistente a eritromicina. O teste de suscetibilidade à ciprofloxacina encontrou 100% das amostras em classificação intermediária, ou seja, nem sensíveis, nem resistentes a substância, tanto para amostras positivas como para amostras negativas para os genes de resistência investigados. A frequência de resistência a eritromicina foi de 25% para as amostras do grupo *blaZ* e 0% para o grupo *mecC*, enquanto apresentou valor intermediário levando-se em conta todas as amostras, resistente em 12,1% dos isolados.

Resultados semelhantes foram identificados em testes de suscetibilidade a partir de amostras de *S. xylosus* em queijos: alta taxa de resistência a oxacilina e de intermediários à ciprofloxacina. Além disso, 45,1% das amostras de *S. xylosus* foram consideradas multirresistentes, com perfil de resistência  $\geq 4$  antimicrobianos. Em nosso trabalho, por sua vez, a taxa de isolados multirresistentes foi de 16,6% (Mikulášová *et al.*, 2014). É de conhecimento que algumas espécies vem apresentando crescente aumento em sua resistência a ciprofloxacina: *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* (Shariati *et al.*, 2022). Em *S. aureus* sabe-se que os principais mecanismos de resistência compreendem bombas de efluxo endógenas e mutações em topoisomerasas que impedem a ligação do antimicrobiano (Hooper; Jacoby, 2015).

A presença do gene *mecC* em duas amostras (8,3%) é particularmente significativa, uma vez que este gene, uma variante alélica de *mecA*, está associado à resistência à meticilina em estafilococos. A ausência de *mecA* nas amostras analisadas está alinhada com estudos prévios que sugerem que *S. xylosus* pode empregar mecanismos alternativos para resistência a  $\beta$ -lactâmicos, como modificações em proteínas ligadoras de penicilina (PBPs) ou a expressão de

bombas de efluxo (Vela et al., 2012; Al-Tameemi et al., 2023). A detecção de *mecC* em *S. xylosus* ressalta seu papel potencial como reservatório de genes de resistência emergentes, especialmente considerando que *mecC* foi originalmente descrito em *Staphylococcus aureus* associado a animais (García-Álvarez et al., 2011). Esse achado reforça a necessidade de vigilância genômica contínua, uma vez que a transferência horizontal de *mecC* para patógenos humanos poderia comprometer terapias antimicrobianas.

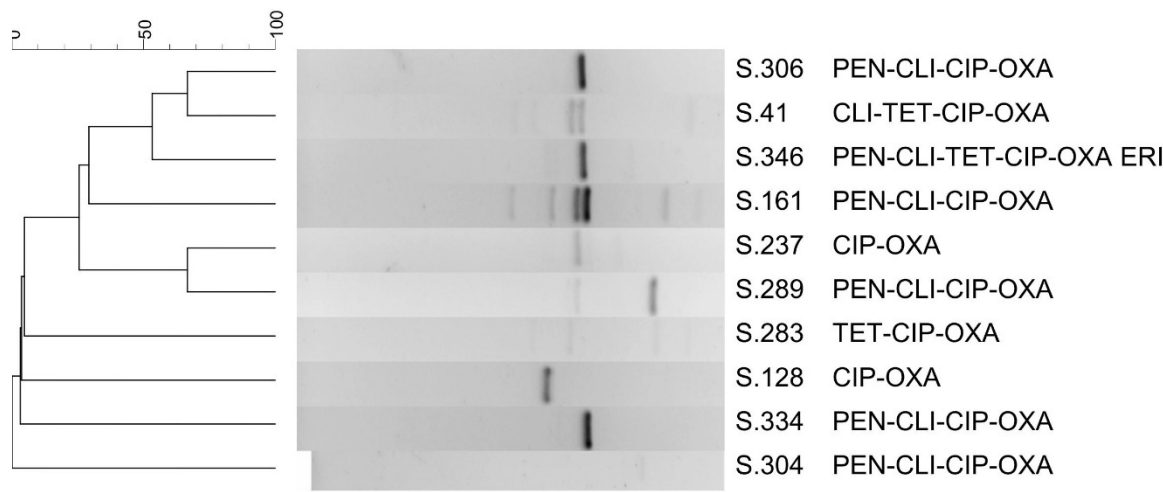
A ausência de *mecA* em todas as amostras contrasta com relatos anteriores que identificaram cepas de *S. xylosus* resistentes à oxacilina sem a detecção deste gene (Vela et al., 2012). Isso sugere que polimorfismos nas regiões alvo dos primers ou a presença de variantes genéticas ainda não caracterizadas podem explicar a discrepância entre fenótipos de resistência e marcadores genéticos. Além disso, a resistência a  $\beta$ -lactâmicos em *S. xylosus* pode estar associada a mecanismos combinatórios, como a produção de biofilmes (que reduzem a penetração de antimicrobianos) e a coexistência de genes de efluxo, como observado na cepa NM36 (Al-Tameemi et al., 2023).

A frequência de resistência a penicilina foi de 50% tanto para os isolados positivos para *blaZ* como para os isolados positivos para *mecC*. Por sua vez, levando em conta todas as amostras positivas para *S. xylosus*, a frequência de resistência a penicilina foi superior, de aproximadamente 60,6%. Por sua vez, a resistência a tetraciclina foi de 50% tanto para os isolados positivos para *blaZ* como para os isolados positivos para *mecC*, enquanto sua frequência no total de amostras foi inferior, de 36,3%. A frequência de resistência a clindamicina foi de 25% para o grupo *blaZ* e 50% para o grupo *mecC*, enquanto sua frequência no total de amostras foi de 72,7%. Por fim, do total de amostras analisadas, 6% foram resistentes a cefoxitina e todas foram suscetíveis a gentamicina, sulfametoxazol-trimetropima e ampicilina.

A resistência a clindamicina (72,7%) e cefoxitina (6%) diferiram da prevalência em *Staphylococcus* não-aureus isolados de alimentos de origem animal prontos para consumo, cujo valor foi de 36,2% e 41,3%, respectivamente (Chajęcka-Wierzchowska et al., 2015). Apenas duas amostras foram resistentes a clindamicina e eritromicina ao mesmo tempo, então pode-se assumir que ao menos a maior parte das amostras positivas não são consequência de indução por macrolídeos (Timsina et al., 2020).

A diversidade genética foi analisada por RAPD-PCR. Os resultados revelam heterogeneidade genética significativa entre as cepas (Figura 1), com perfis de similaridade variando entre aproximadamente 70% (indicativo de disseminação clonal) e 0% (cepas geneticamente distintas).

Figura 1 – Resultado da amplificação aleatória (RAPD-PCR) com resultados do teste de suscetibilidade a antimicrobianos



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

A detecção de *blaZ* e *mecC* em amostras de origem ovina tem implicações diretas para a saúde pública e animal. Ovinos são frequentemente criados em sistemas extensivos, o que favorece a exposição a antibióticos de uso veterinário e a disseminação de genes de resistência entre bactérias comensais e patogênicas. A presença de *mecC* em *S. xylosus* pode representar um risco zoonótico, especialmente em ambientes onde humanos e animais compartilham espaços, como em propriedades rurais. Além disso, a persistência desses genes em linhagens de *S. xylosus* utilizadas como *starters* em fermentação alimentar (Leroy; Christeians; Talon, 2019) destaca a necessidade de revisão de protocolos de segurança microbiológica na indústria de laticínios.

Apesar de a PCR ter identificado genes-chave de resistência, a análise não abrangeu outros determinantes genéticos (como *tetK* ou genes de efluxo) já reportados em *S. xylosus* (Cheng *et al.*, 2019; Chen *et al.*, 2022). Estudos futuros deveriam empregar sequenciamento completo do genoma para mapear todos os genes de resistência e elementos móveis (plasmídeos, *transposons*), além de ensaios fenotípicos para correlacionar genótipo e perfil de suscetibilidade. A investigação da expressão de *blaZ* e *mecC* em condições *in vitro* também seria valiosa para entender sua contribuição real na resistência.

#### 4 CONCLUSÃO

Os resultados demonstram que *S. xylosus* em ovinos carrega genes de resistência a antimicrobianos de relevância clínica, como *blaZ* e *mecC*, mesmo em ausência de *mecA*. Esses achados reforçam a necessidade de monitoramento contínuo desse patógeno como reservatório de resistência, além da implementação de práticas de manejo que reduzam a pressão seletiva por antibióticos em rebanhos. A elucidação dos mecanismos genéticos subjacentes à resistência em *S. xylosus* é essencial para orientar terapias assertivas e políticas de controle de mastite em ovinocultura.

## REFERÊNCIAS

- ACUFF, N. V. *et al.* Severe Dermatitis Associated with Spontaneous *Staphylococcus xylosus* Infection in Rag-/-Tpl2-/- Mice. **Comparative medicine**, [s. l.], v. 67, n. 4, p. 344–349, 2017.
- AKHADDAR, A. *et al.* *Staphylococcus xylosus* Isolated from an Otogenic Brain Abscess in an Adolescent. **Surgical Infections**, [s. l.], v. 11, n. 6, p. 559–561, 2010.
- ALBA, D. F. *et al.* Subclinical mastitis in Lacaune sheep: Causative agents, impacts on milk production, milk quality, oxidative profiles and treatment efficacy of ceftiofur. **Microbial Pathogenesis**, [s. l.], v. 137, p. 103732, 2019.
- AL-TAMEEMI, H. M. *et al.* Whole genome sequence and comparative genomics analysis of multidrug-resistant *Staphylococcus xylosus* NM36 isolated from a cow with mastitis in Basrah city. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 163, 2023.
- BANOS, G. *et al.* The genomic architecture of mastitis resistance in dairy sheep. **BMC Genomics**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 624, 2017.
- BARRIÈRE, C. Characterisation of the katA gene encoding a catalase and evidence for at least a second catalase activity in *Staphylococcus xylosus*, bacteria used in food fermentation. **FEMS Microbiology Letters**, [s. l.], v. 216, n. 2, p. 277–283, 2002.
- BATTAGLIA, M.; GARRETT-SINHA, L. A. *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus aureus* as commensals and pathogens on murine skin. **Laboratory Animal Research**, [s. l.], v. 39, n. 1, p. 18, 2023.
- BERGONIER, D. *et al.* Mastitis of dairy small ruminants. **Veterinary Research**, [s. l.], v. 34, n. 5, p. 689–716, 2003.
- BIANCHI, A. E. *et al.* O-195 Strategic analysis of the dairy sheep production systems in Brazil – An approach by SWOT methodology. **Animal - science proceedings**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 202, 2023.
- BRADFELD, J. F. *et al.* Epizootic fatal dermatitis in athymic nude mice due to *Staphylococcus xylosus* LinkOut-more resources Medical. [s. l.], v. 43, n. 1, p. 111–114, 1993. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8459675/>.
- BROOKER, B. E. An ultrastructural study of the sinus epithelium in the mammary gland of the lactating ewe. **Journal of Anatomy**, v. 138, n. 2, p. 287–296, 1984.
- CAJA, G.; SUCH, X.; ROVAI, M. Udder Morphology and Machine Milking Ability in Dairy Sheep. In: , 2000, Ontario, Canada. **Proceedings of the 6th Great Lakes Dairy Sheep Symposium**. Ontario, Canada: [s. n.], 2000. p. 25–48. Disponível em: [http://refhub.elsevier.com/S0921-4488\(19\)30209-3/sbref0055](http://refhub.elsevier.com/S0921-4488(19)30209-3/sbref0055). Acesso em: 5 jan. 2025.
- CAPRI, F. C. *et al.* Characterization of *Staphylococcus* Species Isolates from Sheep Milk with Subclinical Mastitis: Antibiotic Resistance, Enterotoxins, and Biofilm Production. **Foodborne Pathogens and Disease**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 10–18, 2024.

CASTRO, I. *et al.* Metataxonomic and immunological analysis of milk from ewes with or without a history of mastitis. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 102, n. 10, p. 9298–9311, 2019.

CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA, W. Coagulase-negative staphylococci (CoNS) isolated from ready-to-eat food of animal origin – phenotypic and genotypic antibiotic resistance. **Food Microbiology**, v. 46, p. 222–226, 2015.

CHAMBERS, G. *et al.* An observational study of farmer-reported clinical mastitis in New Zealand dairy ewes. **New Zealand Veterinary Journal**, [s. l.], v. 72, n. 4, p. 212–224, 2024.

CHEN, M. *et al.* Molecular Mechanism of *Staphylococcus xylosus* Resistance Against Tylosin and Florfenicol. **Infection and Drug Resistance**, [s. l.], v. Volume 15, p. 6165–6176, 2022.

CHENG, Q. *et al.* Genome Sequence of a *Staphylococcus xylosus* Clinical Isolate, Strain SMA0341-04 (UGA5), from Siaya County Referral Hospital in Siaya, Kenya. **Microbiology Resource Announcements**, [s. l.], v. 8, n. 16, 2019.

ÇOLAK, A. F. *et al.* A rare case presentation of septic sacroiliitis caused by *Staphylococcus xylosus* and complicated with abscess formation: A case report. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, [s. l.], v. 109, n. 3, p. 116290, 2024.

CONRAD, S. A.; WEST, B. C. Endocarditis caused by *Staphylococcus xylosus* associated with intravenous drug abuse. **Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 149, n. 5, p. 826–827, 1984.

CONTRERAS, G. A.; RODRÍGUEZ, J. M. Mastitis: Comparative Etiology and Epidemiology. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, [s. l.], v. 16, n. 4, p. 339–356, 2011.

CURRY, A. The milk revolution. **Nature**, [s. l.], v. 500, p. 20–22, 2013.

DEB, R. *et al.* Trends in Diagnosis and Control of Bovine Mastitis: A Review. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, [s. l.], v. 16, n. 23, p. 1653–1661, 2013.

DORDET-FRISONI, E. *et al.* Surface migration of *Staphylococcus xylosus* on low-agar media. **Research in Microbiology**, [s. l.], v. 159, n. 4, p. 263–269, 2008.

EL-RAZIK, K. A. A. *et al.* Tetracycline resistance phenotypes and genotypes of coagulase-negative staphylococcal isolates from bubaline mastitis in Egypt. **Veterinary World**, v. 10, n. 6, p. 702–710, 2017.

EVERSHED, R. P. *et al.* Earliest date for milk use in the Near East and southeastern Europe linked to cattle herding. **Nature**, v. 455, n. 7212, p. 528–531, 2008.

FITZGERALD, J. R. *et al.* Fine-structure molecular epidemiological analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. **Epidemiol. Infect.**, [s. l.], v. 119, p. 261–269, 1997.

FREU, G. *et al.* Frequency of non-aureus staphylococci and mammaliicocci species isolated from quarter clinical mastitis: A 6-year retrospective study. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 107, n. 6, p. 3813–3823, 2024.

GOÑI, P. *et al.* Antibiotic resistance and epidemiological typing of *Staphylococcus aureus* strains from ovine and rabbit mastitis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, [s. l.], v. 23, n. 3, p. 268–272, 2004.

- GÖTZ, F. *et al.* DNA homology between the Arsenate Resistance Plasmid pSX267 from *Staphylococcus xylosus* and the Penicillinase Plasmid P1258 from *Staphylococcus aureus*. **Plasmid**, [s. l.], n. 9, p. 126–137, 1983.
- HOEKSTRA, J. *et al.* Differences between *Staphylococcus aureus* lineages isolated from ovine and caprine mastitis but not between isolates from clinical or subclinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 102, n. 6, p. 5430–5437, 2019.
- HOOPER, D. C.; JACOBY, G. A. Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1354, n. 1, p. 12–31, 2015.
- JENKINS, S. N. *et al.* Molecular epidemiology of coagulase-negative *Staphylococcus* species isolated at different lactation stages from dairy cattle in the United States. **PeerJ**, [s. l.], v. 7, p. e6749, 2019.
- KAUR, G. *et al.* Genome sequencing, assembly, annotation and analysis of *Staphylococcus xylosus* strain DMB3-Bh1 reveals genes responsible for pathogenicity. **Gut Pathogens**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 55, 2016.
- KHAN, M. Z. *et al.* Bioactive Compounds and Probiotics Mitigate Mastitis by Targeting NF- $\kappa$ B Signaling Pathway. **Biomolecules**, [s. l.], v. 14, n. 8, p. 1011, 2024.
- KNUTH, R. M. *et al.* Relationships among intramammary health, udder and teat characteristics, and productivity of extensively managed ewes. **Journal of Animal Science**, [s. l.], v. 99, n. 4, 2021.
- KRUPELNYTSKYI, T. V. Hygiene products for udder health of lactating cows. **Ukrainian Journal of Veterinary and Agricultural Sciences**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 84–94, 2023.
- LEROY, S. *et al.* Interaction in dual species biofilms between *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 326, p. 108653, 2020.
- LEROY, S. *et al.* Investigating Extracellular DNA Release in *Staphylococcus xylosus* Biofilm In Vitro. **Microorganisms**, [s. l.], v. 9, n. 11, p. 2192, 2021.
- LEROY, S.; CHRISTIEANS, S.; TALON, R. Tetracycline Gene Transfer in *Staphylococcus xylosus* in situ During Sausage Fermentation. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 10, 2019.
- LYSITSAS, M. *et al.* Coagulase-Negative Staphylococci as an Etiologic Agent of Ovine Mastitis, with a Focus on Subclinical Forms. **Antibiotics**, [s. l.], v. 12, n. 12, p. 1661, 2023.
- MA, A. P. Y. *et al.* Complete Genome Sequence of *Staphylococcus xylosus* HKUOPL8, a Potential Opportunistic Pathogen of Mammals. **Genome Announcements**, [s. l.], v. 2, n. 4, 2014.
- MASTROIANNI, A. *et al.* *Staphylococcus xylosus* isolated from a pancreatic pseudocyst in a patient infected with the human immunodeficiency virus. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 19, n. 6, p. 1173–1174, 1994.
- MCLAREN, A. *et al.* New mastitis phenotypes suitable for genomic selection in meat sheep and their genetic relationships with udder conformation and lamb live weights. **Animal**, [s. l.], v. 12, n. 12, p. 2470–2479, 2018.

MEUGNIER, H. *et al.* Identification and ribotyping of *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus equorum* strains isolated from goat milk and cheese. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 31, p. 325–331, 1996.

MIKULÁŠOVÁ, M. *et al.* Multiresistance of *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus equorum* from Slovak Bryndza cheese. **Folia Microbiologica**, [s. l.], v. 59, n. 3, p. 223–227, 2014.

MILTON, I. D.; HEWITT, C. L.; HARWOOD, C. R. Cloning and sequencing of a plasmid-mediated erythromycin resistance determinant from *Staphylococcus xylosus*. **FEMS Microbiology Letters**, [s. l.], v. 97, n. 1–2, p. 141–147, 1992.

MOROT-BIZOT, S. C.; TALON, R.; LEROY, S. Development of a multiplex PCR for the identification of *Staphylococcus* genus and four staphylococcal species isolated from food. **Journal of Applied Microbiology**, [s. l.], v. 97, n. 5, p. 1087–1094, 2004.

PECKLER, G. L. *et al.* Etiology, persistence, and risk factors of subclinical mastitis in a meat-producing sheep flock. **Journal of Animal Science**, [s. l.], v. 102, 2024.

PIESSENS, V. *et al.* Intra-species diversity and epidemiology varies among coagulase-negative *Staphylococcus* species causing bovine intramammary infections. **Veterinary Microbiology**, [s. l.], v. 155, n. 1, p. 62–71, 2012.

PULINA, G. *et al.* Invited review: Current production trends, farm structures, and economics of the dairy sheep and goat sectors. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 101, n. 8, p. 6715–6729, 2018.

RESCH, M. NAGEL, V., HERTEL, C. Antibiotic resistance of coagulase-negative staphylococci associated with food and used in starter cultures. **International Journal of Food Microbiology**, v. 127, n. 1-2, p. 99-104, 2008.

RESHAMWALA, K. *et al.* Identification and characterization of the pathogenic potential of phenol-soluble modulins in the mouse commensal *Staphylococcus xylosus*. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 13, 2022.

ROCHA, G. D. *et al.* Impact of polymorphisms in *blaZ*, *blaR1* and *blaI* genes and their relationship with  $\beta$ -lactam resistance in *S. aureus* strains isolated from bovine mastitis. **Microbial Pathogenesis**, v. 165, 105453, 2022.

ROSA, N. M. *et al.* Species identification by MALDI-TOF MS and gap PCR–RFLP of non-aureus *Staphylococcus*, *Mammaliococcus*, and *Streptococcus* spp. associated with sheep and goat mastitis. **Veterinary Research**, [s. l.], v. 53, n. 1, p. 84, 2022.

RUEGG, P. L. A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 100, n. 12, p. 10381–10397, 2017.

SCHIFFER, C. J. *et al.* *SxsA*, a novel surface protein mediating cell aggregation and adhesive biofilm formation of *Staphylococcus xylosus*. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 117, n. 5, p. 986–1001, 2022.

SCHIFFER, C. *et al.* Bap and Cell Surface Hydrophobicity Are Important Factors in *Staphylococcus xylosus* Biofilm Formation. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 10, 2019.

- SCHIFFER, C. J. *et al.* Bap-Independent Biofilm Formation in *Staphylococcus xylosus*. **Microorganisms**, [s. l.], v. 9, n. 12, p. 2610, 2021.
- SHARIATI, A. *et al.* The resistance mechanisms of bacteria against ciprofloxacin and new approaches for enhancing the efficacy of this antibiotic. **Frontiers in Public Health**, v. 10, 1025633, 2022.
- SHARUN, K. *et al.* Advances in therapeutic and managemental approaches of bovine mastitis: a comprehensive review. **Veterinary Quarterly**, [s. l.], v. 41, n. 1, p. 107–136, 2021.
- SILVA, C. R. e A. *et al.* Natural sanitizers pre- and post-milking in the prevention of bovine mastitis. **Concilium**, [s. l.], v. 24, n. 12, p. 526–540, 2024.
- TAN, X. *et al.* Genome of *Staphylococcus xylosus* and Comparison with *S. aureus* and *S. epidermidis*. **Journal of Genetics and Genomics**, [s. l.], v. 41, n. 7, p. 413–416, 2014.
- TIMSINA, R. *et al.* Inducible Clindamycin Resistance and Erm Genes in *Staphylococcus Aureus* in School Children in Kathmandu, Nepal. **Future Science OA**, v. 7, n. 1, 2021.
- TSELENIS-KOTSOWILIS, A. D.; KOLIOMICHALIS, M. P.; PAPAVALASSILIOU, J. T. Acute Pyelonephritis Caused by *Staphylococcus xylosus*. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 16, n. 3, p. 593–594, 1982.
- VASIL, M. *et al.* Effects of udder infections with *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus warneri* on the composition and physicochemical changes in cows milk. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, [s. l.], v. 19, n. 4, p. 841–848, 2016.
- VASILEIOU, N. G. *et al.* Association of subclinical mastitis prevalence with sheep breeds in Greece. **Journal of Dairy Research**, [s. l.], v. 85, n. 3, p. 317–320, 2018.
- VASILEIOU, N. G. C. *et al.* Role of staphylococci in mastitis in sheep. **Journal of Dairy Research**, [s. l.], v. 86, n. 3, p. 254–266, 2019.
- VELA, J. *et al.* Characterization of *Staphylococcus xylosus* isolated from broiler chicken barn bioaerosol. **Poultry Science**, [s. l.], v. 91, n. 12, p. 3003–3012, 2012.
- WIDELITZ, R. B. *et al.* Mammary glands and feathers: Comparing two skin appendages which help define novel classes during vertebrate evolution. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, [s. l.], v. 18, n. 2, p. 255–266, 2007.
- ZADOKS, R. N. *et al.* Molecular Epidemiology of Mastitis Pathogens of Dairy Cattle and Comparative Relevance to Humans. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, [s. l.], v. 16, n. 4, p. 357–372, 2011.