



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Saúde Animal

RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE
***Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE**
MASTITE BOVINA

AMANDA DE OLIVEIRA ALVES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL

BRASÍLIA/DF
JULHO/2023



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Saúde Animal

RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE MASTITE BOVINA

AMANDA DE OLIVEIRA ALVES

ORIENTADOR: PROFA. DRA. SIMONE PERECMANIS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: MEDICINA PREVENTIVA E PATOLOGIA
VETERINÁRIA

LINHA DE PESQUISA: EPIDEMIOLOGIA, PREVENÇÃO E CONTROLE DE
DOENÇAS DOS ANIMAIS E GESTÃO DOS RISCOS PARA A SAÚDE PÚBLICA

PUBLICAÇÃO: /2023

BRASÍLIA/DF

JULHO/2023

RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE
MASTITE BOVINA

AMANDA DE OLIVEIRA ALVES

DISSERTAÇÃO DE
MESTRADO SUBMETIDA AO
PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM SAÚDE
ANIMAL, COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS
A OBTENÇÃO DO GRAU DE
MESTRE EM SAÚDE ANIMAL.

APROVADA POR:

SIMONE PERECMANIS, Doutora (UNB). Orientadora

ÂNGELA PATRÍCIA SANTANA, Doutora (UNB).

PAULA SUZANA ELISA MACIEL POLL, Doutora (UNB).

Brasília/DF, 26 de julho de 2023.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

ALVES, A.O. RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE MASTITE BOVINA. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2023, 58p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de Mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos; foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na secretaria do Programa. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

Sumário

CAPÍTULO I.....	11
REFERENCIAL TEÓRICO	11
Influência da mastite no cenário mundial	11
Mastite bovina: conceitos fundamentais e classificações.....	12
Microrganismos causadores de mastite.....	15
Categorização e Características dos <i>Staphylococcus aureus</i>	19
Cultivo e identificação.....	19
Fatores de Virulência do <i>Staphylococcus aureus</i>	20
Resistência a antimicrobianos	23
Diagnóstico da mastite.....	26
Tratamento	30
Controle e prevenção	31
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
CAPÍTULO II.....	40
RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE <i>Staphylococcus aureus</i> ISOLADOS DE MASTITE BOVINA.	40
Resumo.....	40
Abstract	41
INTRODUÇÃO	42
OBJETIVOS.....	43
MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
Características das cepas bacterianas e seu cultivo.....	44
Teste de suscetibilidade antimicrobiana	44
Identificação de genes espécie-específico, coagulase e resistência antimicrobiana por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	45
RESULTADOS.....	47
Teste de suscetibilidade antimicrobiana	47

Identificação de genes espécie-específico, coagulase e resistência antimicrobiana por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	48
DISCUSSÃO	51
CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

µg	Micrograma
µg/µl	Micrograma por microlitro
AroA	Gene espécie-específico do <i>Staphylococcus aureus</i>
AS	Ágar Sangue
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Infusão cérebro-coração
blaZ	Gene de resistência à penicilina
Blal	Gene repressor transcricional
BlaR1	Proteína sensora/transdutora de β-lactâmicos
BPA	Boas Práticas Agropecuárias
BrCAST	<i>Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
CCS	Contagem de células somáticas
CLSI	<i>Clinical & Laboratory Standards Institute</i>
CMT	<i>Californian Mastit Test</i>
CoA	Gene da coagulase
CS/ml	Células somáticas por mililitro
D-Ala-D-Ala	D-alanil-D-alanina
D-Ala-D-Lac	D-alanil-D-lactato
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
Dnase	Desoxirribonuclease
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DTA	Doenças Transmitidas por Alimentos
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
mecA	Gene de resistência à meticilina
mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MH	Müller-Hinton
MicroMedVet	Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária
min	Minuto
mL	Mililitro

mM	Milimolar
mm	Milímetro
MO	Microrganismo
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
MSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> susceptíveis à meticilina
NaCl	Cloreto de Sódio
NIRD	<i>National Institute of Research in Dairying</i>
O/F	Teste Fermentativo Oxidativo
pb	Pares de base
PBP	<i>Penicillin Binding Protein</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RNA	Ácido Ribonucleico
s	Segundos
SCP	<i>Staphylococcus Coagulase Positiva</i>
TAE	Tampão Tris-Acetato_EDTA
tetK	Gene de resistência à tetraciclina K
tetM	Gene de resistência à tetraciclina M
TSST-1	Toxina da síndrome do choque Tóxico 1
UI	Unidade Internacional
vanA	Gene de resistência à vancomicina A
vanB	Gene de resistência à vancomicina B
VP	Voges Proskauer
WMT	<i>Wisconsin Mastitis Test</i>

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequências de oligonucleotídeos iniciadores de PCR utilizados para amplificação dos genes espécie-específico, presença da enzima coagulase e genes de resistência antimicrobiana	46
Tabela 2: Amostras resistentes aos antimicrobianos como determinado pelo método de disco-difusão	47
Tabela 3: Resistência fenotípica aos antimicrobianos e genes de resistência detectados nas amostras	50
Tabela 4: Resultados dos produtos de PCR para o gene CoA	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Resposta da glândula mamária frente à invasão de microrganismos	18
Figura 2: Testes bioquímicos utilizados na caracterização e determinação do perfil de resistência de S. aureus.....	20
Figura 3: Achados no teste CMT que indicam a presença de mastite no rebanho	28
Figura 4: Práticas rotineiras na ordenha que auxiliam no controle de disseminação e detecção precoce de casos de mastite.....	32
Figura 5: Eletroforese em gel de agarose demonstrando a amplificação dos genes da coagulase.....	48

CAPÍTULO I

REFERENCIAL TEÓRICO

Influência da mastite no cenário mundial

A mastite é uma doença de grande impacto no cenário mundial, sendo considerada a mais comum entre o rebanho leiteiro. Estima-se que cerca de 38% da morbidade no gado leiteiro seja atribuída à mastite. A cada três vacas-leiteiras, uma apresenta sinais de inflamação no úbere, e 7% são descartadas devido à doença, com 1% chegando a óbito. A mastite também causa mais de 25% dos prejuízos econômicos associados a doenças no gado leiteiro (NETO; ZAPPA, 2011; SANTOS, 2017; FONSECA *et al.*, 2021).

Embora o Brasil seja o terceiro maior produtor de leite do mundo, o país está confrontando obstáculos associados à eficiência produtiva, à qualidade do leite e à renda dos agricultores. A gestão adequada da saúde do gado é essencial para superar essas dificuldades, já que a mastite está causando prejuízos econômicos substanciais nas criações (NETO; ZAPPA, 2011; EMBRAPA, 2022).

A mastite bovina acarreta prejuízos em toda a indústria leiteira, envolvendo despesas com remédios, serviços especializados e a eliminação de animais e leite contaminado. O descarte de leite, seja devido ao período de carência pelo uso de antibióticos ou à baixa qualidade da matéria-prima, constitui a maior perda na cadeia de produção, representando até 10% do faturamento das fazendas de laticínios no Brasil. Nos Estados Unidos, esses prejuízos atingem a marca de US\$ 2 bilhões, devido à redução na produção e aos custos associados à mastite (COSTA *et al.*, 2013; MAIOCHI; RODRIGUES; & WOSIACKI, 2019; FONSECA *et al.*, 2021; EMBRAPA, 2022).

O segmento de laticínios no Brasil passou por mudanças substanciais nas últimas décadas, experimentando um crescimento tanto na produção quanto no consumo, acompanhado por uma modernização tecnológica. Os produtores têm se beneficiado das ferramentas tecnológicas que aprimoram a gestão e impulsionam a eficiência produtiva. Apesar de o preço do leite no Brasil ser aproximadamente 19% superior ao preço internacional, a produção continua enfrentando desafios, tanto no cenário doméstico quanto global. Nos últimos anos, o setor teve que lidar com

obstáculos, como o aumento dos custos de produção, uma demanda enfraquecida e margens de lucro estreitas, resultando em uma redução na disponibilidade do produto no mercado nacional (FONSECA *et al.*, 2021; EMBRAPA, 2022).

Assim, a mastite continua sendo uma preocupação significativa para o cenário mundial do rebanho leiteiro, enquanto o setor leiteiro brasileiro enfrenta desafios e mudanças que impactam sua produção e disponibilidade. A aplicação de tecnologias eficazes de manejo sanitário e genético são essenciais para combater a mastite e promover o crescimento sustentável do setor (FONSECA *et al.*, 2021; CALIMAN; GASPAROTTO; RIBEIRO, 2023).

Mastite bovina: conceitos fundamentais e classificações

O termo “mastite” é empregue para se referir à inflamação da glândula mamária. As causas da mastite são diversas e envolvem múltiplos fatores que podem levar à inflamação da glândula mamária das vacas-leiteiras. Entre as principais causas estão o trauma ou lesão ao tecido mamário, que podem ocorrer durante o processo de ordenha ou devido a condições inadequadas de manuseio, também pode ter origem fisiológica, alérgica e/ou metabólica. No entanto, a causa mais comum de mastite bovina é a infecção por microrganismos (MO), principalmente bactérias (COSER; LOPES; COSTA, 2012; NOGUEIRA *et al.*, 2013; FONSECA *et al.*, 2021; CALIMAN; GASPAROTTO; RIBEIRO, 2023).

Essas bactérias chegam à glândula mamária pela via descendente, através da via hematogena ou linfática; ou por via ascendente, sendo a forma mais comum de infecção, através do canal do teto, especialmente durante a ordenha, ou por meio de feridas e rachaduras presentes nos tetos. Além disso, a higiene inadequada do ambiente e das instalações de ordenha, a qualidade do manejo do rebanho, a frequência e a técnica de ordenha, e a presença de condições ambientais favoráveis ao crescimento bacteriano também podem desempenhar um papel importante no desenvolvimento da mastite bovina (COSER; LOPES; COSTA, 2012; KREWER, 2013; FONSECA *et al.*, 2021).

A classificação da mastite também pode ser feita segundo seu acometimento clínico, dividindo-se em clínica e subclínica, bem como conforme os agentes causadores, agrupando-se em contagiosa ou ambiental. A gravidade dos casos é

influenciada pelos patógenos causadores, pelo estado de saúde do animal e pela forma como o produtor lida com o problema. Os principais patógenos responsáveis pela mastite são estafilococos, estreptococos e coliformes. É essencial compreender as diferentes formas de manifestação da mastite e adotar medidas preventivas e tratamentos adequados para minimizar os impactos dessa doença na produção leiteira e no bem-estar dos animais (COSER; LOPES; COSTA, 2012; SCHVARZ; SANTOS, 2012; COSTA; DIAS, 2013; SAAB *et al.*, 2014; MASSOTE *et al.*, 2019; FONSECA *et al.*, 2021).

Mastite clínica

A mastite clínica é uma infecção caracterizada por visíveis alterações no tecido mamário, e no quadro clínico do animal, apresentando sinais inflamatórios como aumento de temperatura, edema, dor, sensibilidade e perda de função do tecido em decorrência da fibrose do teto, eventualmente ocasionando a morte do animal. Essa forma pode ser classificada, de acordo com a duração dos sinais clínicos, em aguda, subaguda, superaguda e crônica. A categoria de quadros superagudos é caracterizada por sinais intensos de inflamação e até sintomas sistêmicos, como febre e prostração. Em contraste, os quadros agudos apresentam sinais sistêmicos menos acentuados e um desenvolvimento mais lento. Os casos subagudos revelam grumos no leite durante o teste da caneca, mas apresentam sinais inflamatórios discretos. Nos animais crônicos, a infecção persiste por um período de meses a anos, podendo levar à perda do(s) quarto(s) afetado(s) (COSER; LOPES; COSTA, 2012; SCHVARZ; SANTOS, 2012; RAMOS *et al.*, 2017; MASSOTE *et al.*, 2019; FONSECA *et al.*, 2021; CALIMAN; GASPAROTTO; RIBEIRO, 2023).

Mastite subclínica

A mastite subclínica é uma infecção que não apresenta sinais clínicos evidentes e passa despercebida pelos produtores geralmente. Essa forma não apresenta os sinais de inflamação evidentes, dificultando o diagnóstico e permite que se dissemine facilmente, acometendo mais animais. Os animais infectados permanecem na linha de produção, impactando negativamente a economia do setor, diminuindo a quantidade e qualidade do produto, aumentando gastos com atendimento veterinário,

tratamento, descarte de leite e de animais acometidos. A diminuição da volume produzido e alterações na composição do leite, como aumento na Contagem de Células Somáticas (CCS) são indicadores da ocorrência de mastite subclínica no rebanho (COSER; LOPES; COSTA, 2012; SAAB *et al.*, 2014; Lopes, LOPES; MANZI; LANGONI, 2018; MASSOTE *et al.*, 2019; FONSECA *et al.*, 2021; CALIMAN; GASPAROTTO; RIBEIRO, 2023).

Mastite contagiosa

Microrganismos oportunistas e contagiosos, adaptados a sobreviver no hospedeiro, podem estar presentes no corpo do animal, independentemente da mastite. São transmitidos durante a ordenha de um teto para o outro ou entre animais, pelas mãos do ordenhador e/ou equipamentos e materiais de ordenha que não foram devidamente higienizados ou são reutilizados. Sua apresentação comumente é na forma subclínica da mastite, por período prolongado, sendo detectado o aumento na CCS. A mastite contagiosa causa grandes problemas para a produção leiteira, tornando imprescindíveis o controle e profilaxia adequados e frequentes. Os *Streptococcus agalactiae* e *Staphylococcus aureus* são os principais agentes etiológicos para essa forma de mastite. O *S. aureus* se destaca mais entre os estafilococos, sua importância fundamentada principalmente na capacidade de causar infecções graves, disseminação pelo consumo do leite e difícil tratamento (ARCANJO *et al.*, 2017; MASSOTE *et al.*, 2019; OLIVEIRA *et al.*, 2019; FONSECA *et al.*, 2021; CALIMAN; GASPAROTTO; RIBEIRO, 2023).

Mastite ambiental

É causada por microrganismos oportunistas encontrados no ambiente no qual o animal se encontra, tal qual equipamentos e materiais utilizados na ordenha ou curral, água contaminada, fezes e materiais orgânicos usados como cama dos animais. A contaminação pode ocorrer durante o processo de ordenha pelo uso de equipamentos, como a teteira, e/ou pelas mãos do ordenhador, quando não devidamente higienizados, ou ainda no período entre as ordenhas, principalmente quando as vacas se deitam em ambientes contaminados antes que o esfíncter do teto

da vaca tenha se fechado (NETO; ZAPPA, 2011; MASSOTE *et al.*, 2019). Geralmente se apresenta como uma mastite clínica de rápida resolução. Dentre os patógenos associados, estão os coliformes (*Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. e *Enterobacter* spp.), os Streptococcus (*Streptococcus uberis* e *Streptococcus dysgalactiae*), as *Pseudomonas aeruginosa* e microalgas, como *Prototheca zopfii*. Por estarem presentes no ambiente onde os animais se encontram, em contato constante, são de difícil controle. (FONSECA *et al.*, 2021).

Microrganismos causadores de mastite

Existe uma grande variedade de microrganismos que tem sido identificada como causadores de mastite, esse número expressivo de agentes envolvidos dificulta a eficácia dos tratamentos estabelecidos. Os patógenos responsáveis pela mastite são classificados com base no local de ocorrência e na forma de infecção. Além disso, são agrupados conforme o efeito que têm na contagem de células somáticas, denominados de primários e secundários. Os primários contagiosos, como *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus* spp, e os primários ambientais, como *Streptococcus uberis*, *S. dysgalactiae* e *Escherichia coli*, frequentemente resultam em significativas alterações nos valores da CCS (REIS; AL., 2017; MASSOTE *et al.*, 2019; FONSECA *et al.*, 2021).

Entre os patógenos ambientais, destacam-se a *Escherichia coli*, uma enterobactéria Gram-negativa que está presente no trato digestivo dos animais e pode afetar animais com imunidade baixa, causando sintomas variados, principalmente por sua capacidade de produzir enterotoxinas. Outro exemplo de enterobactéria produtora de toxinas que pode acarretar uma infecção longa e clinicamente mais severa é a *Klebsiella* spp. A *Pseudomonas aeruginosa* é outro microrganismo ambiental, com capacidade de produção de toxinas, encontrado com frequência. É uma bactéria oportunista, transmitida pelo uso de água contaminada, que tem se mostrado resistente aos antimicrobianos (SHUKKEN, 2012; VITORINO, 2018; BETTANIN, 2019; MASSOTE *et al.*, 2019; FONSECA *et al.*, 2021).

Dos estreptococos, se destacam o *Streptococcus dysgalactiae*, que leva a um aumento expressivo na CCS, e o *Streptococcus uberis* que apresenta potencial de transmissão entre animais. Esse grupo é facilmente isolado no ambiente onde os

animais se encontram, como no úbere, pele, fezes, cama e sendo transmitidos no momento da ordenha, no entanto, podem ser erradicados das propriedades com boas práticas de higiene e manejo ambiental (SHUKKEN, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2016; MASSOTE *et al.*, 2019; CALIMAN; GASPAROTTO; RIBEIRO, 2023).

Fungos e leveduras presentes no solo são causas infrequentes de mastite, mas podem ocorrer principalmente se os animais se deitarem antes que o esfíncter do teto esteja completamente fechado. Podem causar inchaço do quarto acometido, redução da produção e presença de grumos no leite. Não respondem ao tratamento com antibióticos, mas, geralmente, são autolimitantes (BETTANIN, 2019; SANTOS *et al.*, 2019).

Por outro lado, os patógenos causadores de mastite contagiosos, são microrganismos oportunistas com origem na microbiota da pele da glândula mamária e dos tetos das vacas. São facilmente disseminados em locais com higienização deficiente, com o uso de equipamentos e materiais contaminados, pelo próprio ordenhador ou ainda de animal para animal. A transmissão, entre o rebanho, desses patógenos permite que a mastite se apresente mais frequentemente em sua forma subclínica e se perpetue por longos períodos, pode ser identificada com a detecção do aumento da contagem de CCS (MASSOTE *et al.*, 2019; FONSECA *et al.*, 2021; CALIMAN; GASPAROTTO; RIBEIRO, 2023).

O *Streptococcus agalactiae* é um exemplo, encontrado no leite, que acomete a glândula mamária dos animais, gerando um aumento significativo na CCS. A transmissão ocorre principalmente durante a ordenha, por uso de teteiras e materiais contaminados.

A disseminação entre animais é considerada baixa, uma vez que se trata de um patógeno obrigatório do úbere e não resiste muito tempo fora da glândula. Sua prevalência no rebanho brasileiro é alta, chegando a 65% em rebanhos com controle ineficaz de limpeza, apesar de seu controle ser relativamente fácil com a higienização adequada das estruturas e sua sensibilidade a tratamentos com β -lactâmicos (ACOSTA, 2016; FONSECA *et al.*, 2021; CALIMAN; GASPAROTTO; RIBEIRO, 2023).

O patógeno *Staphylococcus aureus*, encontrado no úbere, na pele e pelo dos animais, além da pele de seres humanos, é de difícil eliminação do rebanho após sua instalação. A transmissão desse microrganismo, assim como o *S. agalactiae* ocorre

principalmente durante a ordenha, com a contaminação das teteiras e mãos dos ordenhadores (MASSOTE *et al.*, 2019; OLIVEIRA *et al.*, 2019; SANTOS *et al.*, 2019; CALIMAN; GASPAROTTO; RIBEIRO, 2023).

É importante salientar que a classificação entre mastite contagiosa e ambiental nem sempre é absoluta, pois alguns patógenos de fonte ambiental podem apresentar características contagiosas e vice-versa. Além disso, o manejo adequado da propriedade e boas práticas de higiene são essenciais para o controle e prevenção da mastite em rebanhos leiteiros. Nesse contexto, os produtores devem estar atentos às medidas de controle e profilaxia, buscando identificar precocemente os patógenos e adotar estratégias para minimizar os impactos da mastite na produção de leite e na saúde das vacas.

A importância do *Staphylococcus aureus* na mastite bovina

No grupo de *Staphylococcus Coagulase Positiva* (SCP), aqueles que possuem grande importância como causadores da mastite, estão inclusos os *S. aureus*, *S. intermedius* e variantes de *S. hyicus*. Os *S. aureus* são os microrganismos mais frequentemente isolados nos casos de mastite bovina classificadas como contagiosas (ACOSTA, 2016; FONSECA *et al.*, 2021).

Os *S. aureus* desempenham um papel muito importante como causadores da mastite, uma vez que possuem mecanismos que facilitam a evasão do sistema imune e permitem desenvolver infecções subclínicas e crônicas. No entanto, quando existe uma ativação e migração intensa de células de defesa, pode ocorrer o acúmulo de citocinas tóxicas e radicais livres que lesam o tecido local e liberam essas substâncias para a corrente sanguínea, podendo ocasionar também sinais sistêmicos nos animais. A Figura 1 ilustra o processo de infecção nos tecidos produtores de leite causado pelas bactérias *S. aureus*. O sistema imune tenta conter as bactérias, isolando essas áreas com leucócitos e tecido cicatricial. No entanto, as bactérias são periodicamente liberadas dessas áreas e acabam infectando outros tecidos (TONG; CHEN; FOWLER, 2012; POLLITT *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2019).

Figura 1: Resposta da glândula mamária frente à invasão de microrganismos

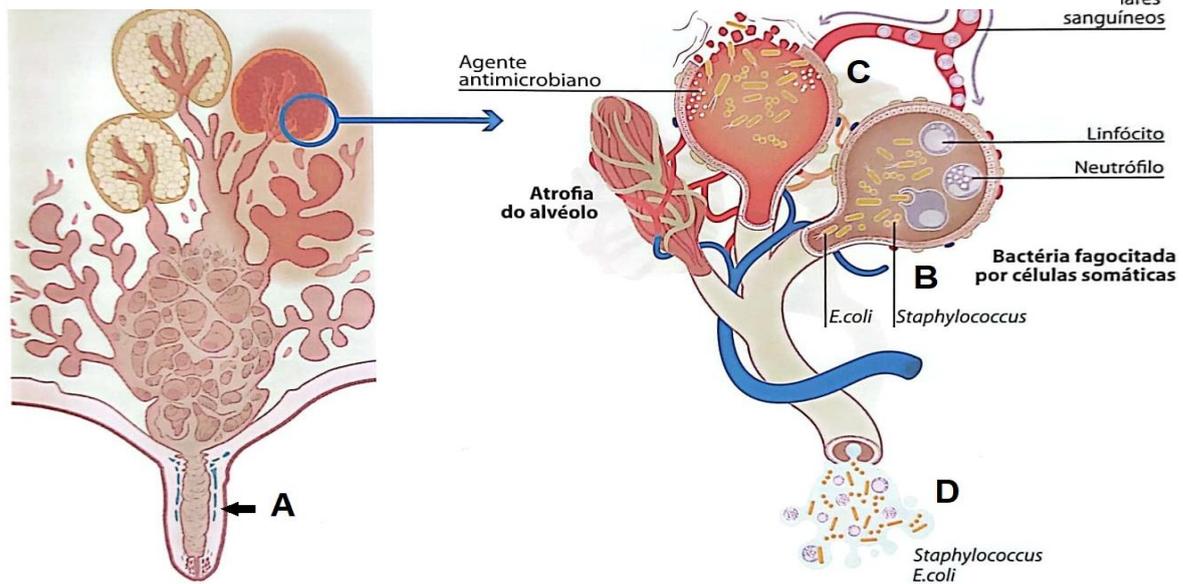


Diagrama ilustrando a resposta imune da glândula mamária a microrganismos que ultrapassaram a barreira primária do canal dos tetos. A) O MO adere aos tecidos internos, dificultando sua remoção durante a ordenha e permitindo que se estabeleça a infecção. B) Penetra os alvéolos da glândula, onde se proliferam. C) A ativação e migração intensa de células de defesa pode levar ao acúmulo de citocinas tóxicas e radicais livres que lesam o tecido local, resultando na liberação de substâncias que aumentam a permeabilidade dos vasos na corrente sanguínea. D) A maior permeabilidade permite que o plasma sanguíneo, com leucócitos, se mova para os alvéolos, além de diluir o soro com as toxinas produzidas. (Fonte: adaptado de Santos, 2019).

Tem fácil resolução quando esse agente é identificado e eliminado precocemente. No entanto, após sua instalação no rebanho, sua eliminação torna-se dificultada, devido a sua alta resistência às drogas. Outro fator que dificulta o controle do *S. aureus* e permite que o patógeno perpetue por longos períodos no rebanho é a sua grande variedade genética, podendo ser encontradas diferentes cepas no mesmo lote. Dessa forma, quando o agente se instala nos uberes em sua forma de apresentação mais comumente subclínica, pode facilmente avançar para um quadro crônico (MASSOTE *et al.*, 2019; SANTOS *et al.*, 2019; FONSECA *et al.*, 2021).

O *S. aureus* também tem importância na saúde humana por sua capacidade de ocasionar toxinfecções alimentares, leves a severas, devido à produção de toxinas. É um microrganismo reconhecido por seu grande potencial de causar Doenças

Transmitidas por Alimentos (DTA) pelo consumo de leite e/ou alimentos contaminados (COSTA; DIAS, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2019; FONSECA *et al.*, 2021; CALIMAN; GASPAROTTO; RIBEIRO, 2023).

Categorização e Características dos *Staphylococcus aureus*

Estafilococos são classificados morfotintorialmente como cocos Gram-positivos que se assemelham a “cachos de uva” quando examinados ao microscópio, apresentando um diâmetro médio de 1.0µm. São anaeróbios facultativos, fermentam glicose no teste O/F, são catalase positivos, oxidase negativos e não são móveis. São MOs fermentadores de glicose, maltose, produzem pigmentação e α-hemólise. Além disso, são não formadores de esporos. Seu crescimento ocorre bem em meios de cultivo comuns, como ágar nutriente e ágar sangue ovino 5%, a 37 °C em 24 horas, formando colônias de tamanho médio (1 a 2 mm), lisas, brilhantes, com bordas contínuas e coloração amarelada ou esbranquiçada (QUINN *et al.*, 1994, QUINN *et al.*, 2011; BRASIL, 2013).

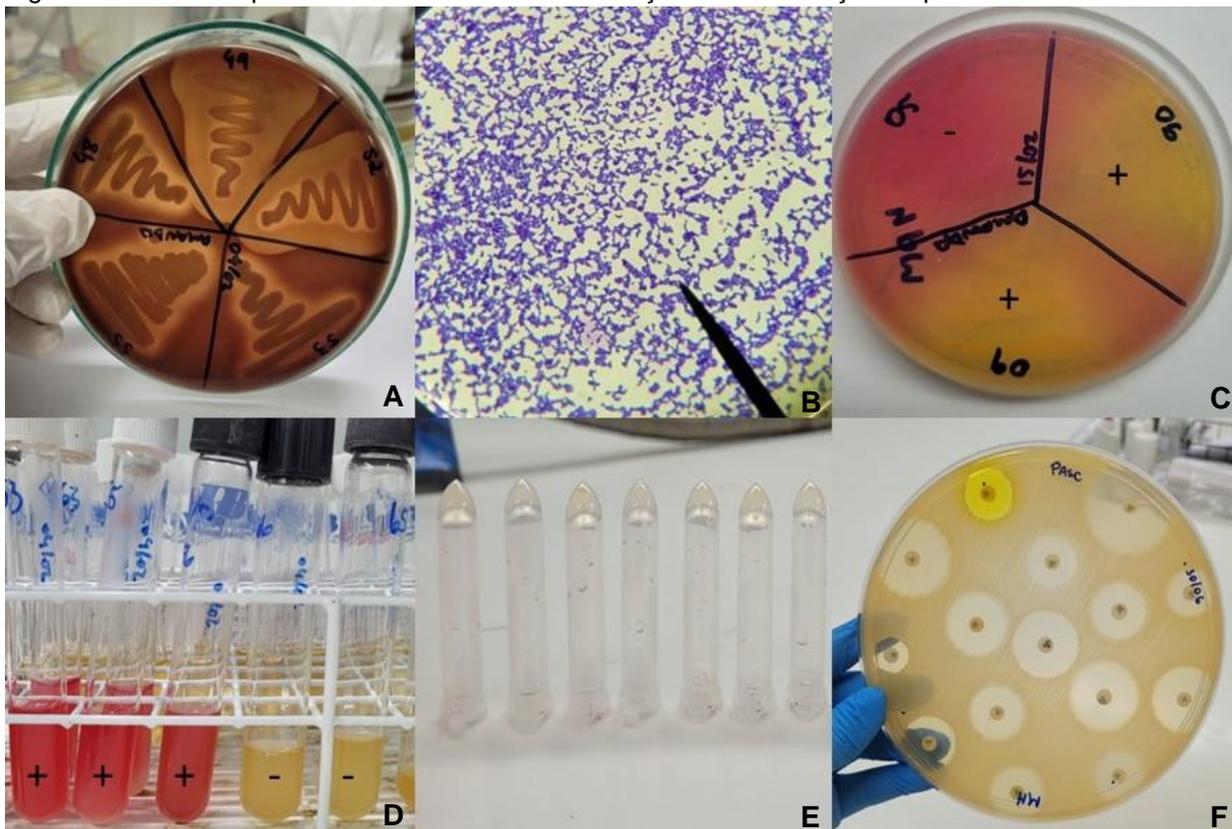
Os *S. aureus* são assim denominados devido à pigmentação amarela das colônias (aureus = dourado). Eles fazem parte da microbiota de diferentes espécies animais, incluindo o homem. São tolerantes à concentração de 10% NaCl, crescem em uma faixa de pH de 4,0 a 10 e têm uma faixa de temperatura de 6,7 °C a 48 °C (CARDOSO; CARMO; SILVA, 2000; TORTORA; FUNKE; CASE, 2008).

Cultivo e identificação

Apresentam crescimento satisfatório no ágar sangue de carneiro a 5%, após incubação a 37 °C durante 24 horas, e suas colônias podem exibir pigmentação amarela, amarelo-alaranjada ou ainda esbranquiçada, os pigmentos ficam mais pronunciados após 72 horas de incubação em temperatura ambiente. A reação para a presença da coagulase é positiva, resultando da conversão do fibrinogênio do plasma de coelho em fibrina por essa enzima, bem como a reação para a presença da enzima catalase. São redutores de nitrato em nitrito, demonstram testes positivos para gelatina, DNase e VP, e fermentam os carboidratos glicose, lactose, maltose, manitol e sacarose. (BRASIL, 2013; QUINN *et al.*, 2011).

No meio de cultivo ágar sal manitol contendo 7,5% de NaCl, ocorre a inibição do crescimento de várias bactérias, e as colônias de *S. aureus* se mostram cercadas por um halo amarelo. São resistentes aos antibióticos polimixina B (300 UI) e bacitracina (10 UI), enquanto apresentam sensibilidade à novobiocina (5mg) (QUINN *et al.*, 1994; QUINN *et al.*, 2011; OLIVEIRA, 2000).

Figura 2: Testes bioquímicos utilizados na caracterização e determinação do perfil de resistência de *S.*



A) Crescimento em AS – 37 °C por 24h – formação de hemólise; B) Microscopia ótica (1000x) de cocos Gram-positivos agrupados em “cachos de uva”; C) Fermentação em ágar sal manitol; D) Prova de VP; E) Teste da coagulase em microtubo; F) Teste de sensibilidade antimicrobiana por disco difusão em ágar Müller-Hinton. (Fonte: fotos da autora, 2023).

Fatores de Virulência do *Staphylococcus aureus*

O *Staphylococcus aureus* é uma bactéria patogênica que possui múltiplos mecanismos para subverter a resposta imunológica, seja interferindo nos mecanismos de resposta, produzindo toxinas específicas, a capacidade de sobreviver intracelularmente em células imunológicas e/ou a habilidade de escapar da captura pelos fagócitos (ZECCONI; SCALI, 2013; POLLITT *et al.*, 2018).

A parede celular do *S. aureus* é composta por glicopeptídeos e ácidos teicóicos. Os glicopeptídeos conferem rigidez e elasticidade, determinando sua forma e protegendo-a da lise osmótica além de aderência específica da bactéria às superfícies mucosas. Os ácidos teicóicos também estão envolvidos na aderência celular, eles conferem uma carga negativa à superfície celular e desempenham um papel na aquisição e localização de íons metálicos. Por meio da ativação de outras proteínas de superfície chamadas adesinas, o *S. aureus* é capaz de se aderir à matriz extracelular de células do hospedeiro e ser endocitado. As células atuam como um reservatório e auxiliam na proteção contra drogas e na evasão do sistema imune ao evitar a fagocitose (OLIVEIRA; BORGES; SIMÕES, 2018; POLLITT *et al.*, 2018).

O *S. aureus* produz várias toxinas que atuam por meio de diferentes mecanismos, podendo ser divididas em três grupos principais - as Toxinas Formadoras de Poros (PFTs), Toxinas Esfoliativas (ETs) e Superantígenos (SAGs): A alfa-toxina é uma citotoxina que forma poros na membrana celular dos leucócitos, resultando na lise celular e que estimula a liberação de citocinas, contribuindo para o desenvolvimento do choque séptico. A leucocidina é uma exotoxina que causa danos diretos às membranas dos leucócitos, resultando em degranulação do citoplasma, edema celular e lise. Pode dissolver a matriz muco polissacarídica da epiderme, levando à separação intraepitelial das ligações celulares do extrato granuloso (pela liberação da hialuronidase) (OLIVEIRA; BORGES; SIMÕES, 2018; PEREIRA *et al.*, 2018).

As enterotoxinas estafilocócicas são proteínas extracelulares de baixa massa molecular que atuam como superantígenos. Elas estão subdivididas em diferentes tipos, sendo a toxina do choque tóxico-1 (TSST-1) uma das mais importantes, sendo um superantígeno que se trata da causa mais comum da síndrome do choque tóxico, e é produzida exclusivamente pelo *S. aureus*. Há também a toxina Pantón-Valentine leucocidina (PVL) consegue causar a destruição de células polimorfonucleares e mononucleares, levando a processos de necrose e apoptose. Outras enterotoxinas, como a A e E, aumentam o peristaltismo intestinal, mas geralmente causam condições tóxicas autolimitadas (SHALLCROSS *et al.*, 2013; KONG; NEOH; NATHAN, 2016; OLIVEIRA; BORGES; SIMÕES, 2018).

Infecções pelo gênero *Staphylococcus* são frequentemente associadas à formação de biofilmes, especialmente por *S. epidermidis* e *S. aureus*. Os biofilmes são aglomerações celulares, que se transformam em estruturas tridimensionais, tendo a função de proteger as bactérias contra a fagocitose e a ação de antimicrobianos e desinfetantes. Essas bactérias utilizam diferentes substratos para formar biofilmes, como polissacarídeos, proteínas, fibrina e amiloide. (TORTORA; FUNKE; CASE, 2008; MCADOW *et al.*, 2012; JUSKO *et al.*, 2014; ZAPOTOCZNA; O'NEILL; O'GARA, 2016).

Esses MOs também produzem diversas enzimas, tais como coagulase, proteases e estafiloquinase (ou fibrolisina), que permitem que as bactérias evitem as defesas do hospedeiro, além de facilitar a invasão e penetração nos tecidos. Essas enzimas, em sua maioria, atuam degradando moléculas do hospedeiro ou interferindo nas vias de sinalização e nos caminhos metabólicos do hospedeiro. que podem contribuir para sua virulência. A catalase atua inativando o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais livres tóxicos formados pelo sistema mielo peroxidase no interior das células fagocitárias, permitindo a sobrevivência da bactéria. A coagulase é importante para a identificação da espécie ao promover a coagulação do sangue através da transformação da protrombina em trombina, resultando na formação de coágulo que protege isola a bactéria das defesas do hospedeiro A coagulase desempenha um papel significativo na formação do biofilme de fibrina, conferindo resistência a drogas antimicrobianas e proteção contra o sistema imune. Outras enzimas como a DNase e lipase, também desempenham papéis relevantes na virulência do *S. aureus* (MCADOW *et al.*, 2012; JUSKO *et al.*, 2014; KONG; NEOH; NATHAN, 2016).

Esses fatores de virulência conferem ao *S. aureus* a capacidade de provocar uma variedade de infecções, incluindo infecções cutâneas, abscessos, pneumonia, infecções do trato urinário e até infecções sistêmicas graves como a síndrome do choque tóxico. O entendimento desses mecanismos é crucial para o desenvolvimento de estratégias de prevenção e tratamento eficazes contra as infecções causadas por essa bactéria. No entanto esses mecanismos de virulência vêm atrelados a outras variedades genéticas que favorecem o sucesso da disseminação e perpetuação do agente, como é o caso das resistências às drogas microbianas.

Resistência a antimicrobianos

Os *S. aureus* foram identificados pela primeira vez por Anton Rosencah, em 1884. Até a introdução da penicilina, no início da década de 40, possuíam uma taxa de mortalidade de aproximadamente 82%, nos pacientes que desenvolviam bacteremia pelo mesmo. Rapidamente, após o início do uso da penicilina para tratamento da população, foram detectadas cepas resistentes e até o fim da década de 40 quase 25% das cepas associadas a hospitais demonstravam resistência à penicilina. O mesmo processo ocorreu com o desenvolvimento da metilina e da oxacilina que logo, após um ano de uso, começaram a surgir cepas resistentes, designadas *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA). As infecções por MRSA se tornaram frequentes, e desde então notou-se a associação do uso de antimicrobianos e a probabilidade de infecção por esse microrganismo (OLIVEIRA; BORGES; SIMÕES, 2018).

O *S. aureus* desenvolve resistência a antimicrobianos por meio de diversos mecanismos, incluindo: a diminuição da entrada do medicamento, a modificação do alvo do medicamento, a inativação enzimática do medicamento e a expulsão ativa do medicamento para fora da célula. Dependendo do antimicrobiano em questão, a bactéria pode utilizar um ou vários desses mecanismos de resistência. As informações desses mecanismos de resistência estão presentes nos genes de resistência em elementos genéticos transferíveis, como plasmídeos e transposons, o que facilita a transferência horizontal da resistência entre as bactérias (LOWY, 2003; QU *et al.*, 2019).

A rápida emergência da resistência aos β -lactâmicos, em especial à metilina em *Staphylococcus aureus* (MRSA) nas últimas décadas aumentou significativamente a ameaça representada por essas chamadas superbactérias. No entanto a presença de múltipla resistência a medicamentos também está surgindo rapidamente em outras variantes como é o caso dos *Staphylococcus aureus* sensível à metilina (MSSA) (YILMAZ; ASLANTAS, 2017; AZHAR *et al.*, 2017).

Mecanismo de resistência aos antibióticos β -lactâmicos em Staphylococcus spp.: os β -lactâmicos funcionam ao se ligarem às proteínas PBP, que são essenciais na síntese da parede celular bacteriana. Isso altera a estrutura da parede celular e leva à morte das bactérias. A resistência à metilina em estafilococos pode ser causada

por duas principais vias genéticas, as quais afetam a resposta a antibióticos β -lactâmicos, como a penicilina e cefalosporinas. A primeira via envolve uma proteína chamada PBP2a (Proteína de Ligação à Penicilina), que tem uma afinidade reduzida por esses antibióticos. A segunda via é mediada pelo gene *blaZ*, que codifica uma enzima chamada β -lactamase, a qual inativa os β -lactâmicos (LOWY, 2003; MOUSSALLEM; KURY; MEDINA-ACOSTA, 2007).

A presença da proteína PBP2a substitui as PBP normais e, devido à sua baixa afinidade pelos β -lactâmicos, permite que os estafilococos sobrevivam quando expostos a altas concentrações desses antibióticos. Além disso, a resistência à meticilina também confere resistência a outros antibióticos da mesma classe, como as cefalosporinas. O gene *mecA* é responsável pela produção da proteína PBP2a e está ausente em estirpes sensíveis à meticilina (LOWY, 2003; MOUSSALLEM; KURY; MEDINA-ACOSTA, 2007).

A β -lactamase é uma enzima produzida pelos estafilococos em resposta à exposição aos β -lactâmicos. Essa enzima inativa esses antibióticos por meio da quebra do anel β -lactâmico. O gene *blaZ* é regulado por outros dois genes próximos, *BlaR1* e *BlaI*. A ativação da síntese da β -lactamase envolve a clivagem sequencial das proteínas reguladoras *BlaR1* e *BlaI* após a exposição aos β -lactâmicos. É importante destacar que o gene para a β -lactamase pode estar presente em plasmídeos, que também podem conter outros genes de resistência a diferentes antibióticos, como gentamicina e eritromicina. A resistência à penicilina geralmente se espalha por meio da disseminação de estirpes bacterianas resistentes (LOWY, 2003).

Mecanismo de resistência à tetraciclina: As tetraciclinas são antibióticos bacteriostáticos de amplo espectro, eficazes contra várias bactérias Gram positivas e Gram negativas. Seu mecanismo de ação envolve a ligação com a fração 30S do ribossomo bacteriano, impedindo a fixação de novos aminoácidos e, assim, interferindo na síntese proteica. A resistência à tetraciclina é mediada principalmente por quatro mecanismos diferentes entre estafilococos: bomba de efluxo ativa, proteção do sítio de ligação, modificação do fármaco e modificação do sítio de ligação. Devido à resistência bacteriana, seu uso como primeira escolha na terapia diminuiu, mas derivados como a tigeciclina, que inibe a bomba de efluxo, ainda são de interesse. O gene *tetM* é responsável pela proteção ribossômica e o gene *tetK* é responsável

pela bomba de efluxo. A ampla disseminação do gene tetM é explicada pela localização deste gene no transposon conjugativo Tn5801(GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010; YILMAZ; ASLANTAS, 2017).

Mecanismo de resistência à vancomicina: Os glicopeptídeos também agem na síntese da parede celular, eles se ligam à uma molécula que fica no final da cadeia de peptídeos, que compõe a parede celular bacteriana em crescimento, e impedem a incorporação de novas subunidades, formam lacunas na formação da parede celular. O uso crescente de vancomicina para tratar infecções resistentes a metilina precedeu o surgimento de estafilococos resistentes à vancomicina (LOWY, 2003; AZHAR *et al.*, 2017).

Existem duas formas de resistência: VISA e VRSA. As cepas VISA têm reduzida suscetibilidade à vancomicina devido a alterações no peptidoglicano. Já as cepas VRSA adquirem resistência por transferência conjugal do operon vanA de *Enterococcus faecalis*, levando ao risco de disseminação mais eficiente (LOWY, 2003 AZHAR *et al.*, 2017).

As cepas VISA tem paredes celulares com formato irregular e espessas pela quantidade adicional de peptidoglicano sintetizado. Há também uma diminuição na ligação cruzada das fibras de peptidoglicano, o que expõe mais resíduos de D-Ala-D-Ala para se ligarem e capturarem a vancomicina. A vancomicina ligada atua como um impedimento adicional para as moléculas do medicamento alcançarem seu alvo na membrana citoplasmática. Os mecanismos moleculares para essas alterações na biossíntese do peptidoglicano não estão esclarecidos (LOWY, 2003; AZHAR *et al.*, 2017).

A segunda forma de resistência à vancomicina em cepas VRSA é resultado da provável transferência conjugal do operon vanA de *Enterococcus faecalis* resistente à vancomicina. O plasmídeo enterocócico contendo vanA também codifica um feromônio sexual sintetizado por *Staphylococcus aureus*, sugerindo um possível facilitador da transferência conjugal. A resistência nessas cepas é causada pela alteração do peptídeo terminal para D-Ala-D-Lac, em vez de D-Ala-D-Ala. Essa adaptação ecológica, juntamente com a resistência a outros antibióticos, aumenta a probabilidade de que as cepas VRSA se tornem mais prevalentes (LOWY, 2003; AZHAR *et al.*, 2017).

Os genes de resistência antimicrobiana comumente detectados entre isolados de estafilococos bovino incluem blaZ e mecA (genes de resistência a β -lactâmicos); tetK, tetL, tetM e tetO (genes de resistência a tetraciclinas); aacA-aphD, aadD e aphA3 (genes de resistência a aminoglicosídeos); ermA, ermB, ermC, ermT, msrA, mphC e lnuA (genes de resistência a macrolídeos, lincosamidas e estreptogramina B; genes de resistência a MLSB); dfrG e dfrK (genes de resistência ao trimetoprim); e vanA e vanB (genes de resistência à vancomicina (QU *et al.*, 2019).

Diagnóstico da mastite

O diagnóstico precoce da mastite é crucial para minimizar perdas tanto para os animais quanto para o produtor. Ele torna o tratamento economicamente viável, evita danos na composição do leite e reduz os descartes de animais. O processo de diagnóstico é dividido em etapas fundamentais para obter resultados satisfatórios. O processo se inicia com o exame físico, por profissional capacitado, inspecionando e palpando o úbere, avaliando todo o animal e a realizando exames complementares que analisam tanto o animal quanto o leite. A detecção de mastite clínica envolve avaliar características do leite, sinais de inflamação do úbere e sintomas sistêmicos da doença. Testes como a caneca de fundo escuro e caneca telada são indicados para observar a formação de grumos ou sangue no leite. É importante incluir esses testes na rotina da fazenda, realizando-os em todos os animais antes da ordenha, são práticas simples que se realizadas com frequência e constância são suficientes para a detecção precoce da mastite. Já a detecção de mastite subclínica é feita por meio de testes que analisam a composição do leite, uma vez que esse tipo de mastite não apresenta sintomas clínicos, mas pode afetar a qualidade do leite. Diagnosticar vacas com mastite subclínica é essencial, pois esses animais podem se tornar fonte de contaminação no rebanho (COSTA *et al.*, 2013; SANTOS, 2017; MAIOCHI; RODRIGUES; & WOSIACKI, 2019; MASSOTE *et al.*, 2019; FONSECA *et al.*, 2021).

Com os testes de caneca de fundo escuro e caneca telada é possível identificar a presença de mastite clínica no animal através da observação do aspecto do leite, podendo ser observada a presença de grumos ou até mesmo de sangue no leite depositado na caneca, durante os primeiros jatos de leite (Figura 3). É importante realizar o teste em cada quarto mamário separadamente (MAIOCHI; RODRIGUES;

& WOSIACKI, 2019; MASSOTE *et al.*, 2019; FONSECA *et al.*, 2021).

O *California Mastitis Test* (CMT) é um teste importante no diagnóstico da mastite subclínica, sendo um exame indireto que utiliza a CCS no leite para indicar a enfermidade. Nesse teste, as células inflamatórias são contadas mediante escores baseados na viscosidade do gel formado pelo contato do RNA liberado pelas células somáticas com o reagente utilizado. A quantidade de células somáticas presente nas amostras de leite determina o grau de viscosidade do gel, classificado de 1 a 5, onde 1 é considerado negativo e a partir de 3 é considerado positivo. O resultado se torna subjetivo ao depender da interpretação de quem está avaliando o teste. As diferenças nos graus de viscosidade podem ser observadas na Figura 3. É um exame de rápida e fácil aplicação que pode ser realizado no campo, sendo recomendado estar incluso no programa de controle da mastite em propriedades leiteiras (AVANZA *et al.*, 2008; MAIOCHI; RODRIGUES; & WOSIACKI, 2019; MASSOTE *et al.*, 2019; FONSECA *et al.*, 2021).

O CMT (Figura 3) é particularmente útil no controle da mastite subclínica, sendo essencial para rebanhos que lidam com essa condição ou que possuem programas de controle de mastite. Para um diagnóstico mais detalhado, é importante que as amostras dos animais positivos no teste CMT passem por análise de contagem de célula somática (SANTOS, 2017; MAIOCHI; RODRIGUES; & WOSIACKI, 2019; MASSOTE *et al.*, 2019; FONSECA *et al.*, 2021; CALIMAN; GASPAROTTO; RIBEIRO, 2023).

Figura 3: Achados no teste CMT que indicam a presença de mastite no rebanho



A) Alteração de coloração e consistência do leite; B) Presença de grumos; C) Graus 1,2 e 3 de viscosidade; D) Graus 0 e 4 de viscosidade. (Fonte: fotos da autora, 2023).

A contagem de células somáticas é um importante indicador no leite, é um dos principais critérios para avaliação da qualidade do leite por parte da indústria, produtores e entidades governamentais. Diversos fatores podem influenciar o aumento dessas células, como período de lactação, estação do ano e idade do animal, mas uma infecção na glândula mamária é o fator que altera drasticamente a contagem de células.

O teste de CCS é realizado com equipamentos automatizados e pode ser efetuado tanto em amostras de um animal específico quanto no tanque de leite. O princípio do exame é baseado no conhecimento de que leucócitos são células do sangue que fagocitam patógenos responsáveis por infecções, como a mastite. Assim, ao detectar um alto número de células somáticas no leite, é possível identificar uma infecção na glândula mamária, diagnosticando a mastite subclínica (MASSOTE *et al.*, 2019; SANTOS *et al.*, 2019; FONSECA *et al.*, 2021).

A contagem superior a 200.000 (CS/mL), pode sugerir um quadro de mastite subclínica. A contagem de células somáticas é um excelente indicador tanto do índice de mastite subclínica, quanto da qualidade do leite nas propriedades leiteiras. Os resultados desse teste são importantes para os produtores, por permitirem a adoção de medidas de controle e tratamento, evitando quedas na qualidade do leite e reduzindo prejuízos (LANGONI, 2017; SANTOS *et al.*, 2019; MAIOCHI; RODRIGUES; & WOSIACKI, 2019).

No Brasil, a Instrução Normativa 76 de 26/11/2018 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, estabeleceu um limite de <500.000 CS/mL, em média geométrica trimestral, para o leite proveniente de propriedades rurais destinado ao beneficiamento industrial. Portanto, uma alta incidência de mastite subclínica em um rebanho leiteiro, resulta em elevação do CCS do leite misturado, o que resulta no impedimento da comercialização do leite pelo produtor e, conseqüentemente, perda das bonificações de incentivo por atender aos parâmetros de qualidade definidos pelo laticínio (BRASIL, 2018; SANTOS *et al.*, 2019; CALIMAN; GASPAROTTO; RIBEIRO, 2023).

O teste *Wisconsin Mastitis Test* (WMT) é um aprimoramento CMT e elimina a subjetividade dos resultados desse último. O WMT, também conhecido como viscosímetro, avalia a viscosidade do líquido após a mescla com o reagente, sendo que a consistência da viscosidade está relacionada ao número de células somáticas presentes na amostra (LEMOS, 2018; MAIOCHI; RODRIGUES; & WOSIACKI, 2019). O teste é realizado em um tubo graduado utiliza-se o mesmo reagente do CMT, diluindo-o com água destilada na mesma proporção (1:1). Em seguida, combina-se 2 mL de leite com 2 mL do reagente diluído no tubo, que possui um canal de 1,15 mm de diâmetro. Após homogeneizar a mistura com movimentos circulares, aguarda-se 15 segundos para o líquido escorrer. O resultado é então visualizado nos milímetros do tubo e comparado com o número de células somáticas (LEMOS, 2018; MAIOCHI; RODRIGUES; & WOSIACKI, 2019; FONSECA *et al.*, 2021).

A cultura microbiológica associada ao antibiograma é indispensável para o controle eficaz de mastite. Considerado o padrão ouro para diagnóstico de infecções intramamárias, esse exame permite isolar e identificar o patógeno responsável pela inflamação da glândula mamária. A Figura 2 demonstra os principais testes

bioquímicos utilizados na caracterização e determinação do perfil de resistência de *S. aureus* em laboratório (MAIOCHI; RODRIGUES; & WOSIACKI, 2019).

Como todo teste, possui suas limitações, os resultados negativos ocorrem com frequência em amostras de mastite clínica e subclínica, o que não indica necessariamente a ausência de infecção. Um resultado microbiológico adequado exige uma seleção criteriosa das vacas – a partir dos sinais clínicos e da CCS individual – e dos quartos – uso do CMT – para análise, e tempo, pois além da identificação das vacas a serem amostradas, envolve a coleta estéril, o envio para laboratório especializado, tempo de processamento e recebimento dos resultados, para então se decidir a instauração ou adequação de protocolo de tratamento (SOUZA *et al.*, 2016; MAIOCHI; RODRIGUES; & WOSIACKI, 2019; SANTOS *et al.*, 2019).

A identificação específica de qual agente etiológico está afetando o animal e o antibiograma revelam quais medicamentos são sensíveis ou resistentes ao microrganismo identificado (Figura 2F). Essa informação é essencial para determinar a melhor estratégia de tratamento e gestão do rebanho, permitindo a adoção de medidas preventivas mais efetivas e o tratamento mais adequado para animais doentes (MAIOCHI; RODRIGUES; & WOSIACKI, 2019; FONSECA *et al.*, 2021).

Tratamento

O tratamento da mastite bovina é uma questão complexa que envolve diversos fatores, como resistência bacteriana, resposta do rebanho, agente etiológico, gravidade da infecção, tempo de evolução da doença e também fatores individuais de cada animal, como o período lactacional da vaca, por exemplo, são diferentes as opções de tratamento para vacas secas e vacas lactantes. É importante ter cautela nesse momento de tratamento, pois o uso indiscriminado de antimicrobianos pode levar à resistência dos patógenos que permanecerão no rebanho e à presença de resíduos medicamentosos no leite. Dentre os tratamentos utilizados, destaca-se o uso de antibióticos de amplo espectro e com capacidade de penetrar nos tecidos da glândula mamária, como a enrofloxacin, eficiente contra amplo espectro de agentes Gram-negativos e Gram positivos, especialmente para animais afetados por *Staphylococcus aureus* (MUSHTAQ; AL., 2018; CALIMAN; GASPAROTTO;

RIBEIRO, 2023).

A penicilina tem indicação para uso contra bactérias Gram-positivas, restringindo sua chance de sucesso no tratamento da mastite quando não se sabe o agente etiológico, no entanto seu uso em associação a antibióticos de amplo espectro de ação, como a enrofloxacina, amplia sua eficácia, seja o agente infeccioso Gram-positivo ou Gram-negativo (LANGONI *et al.*, 2000; JESUS; COUTINHO, 2018).

É importante considerar a escolha adequada dos antibióticos para alcançar o sucesso no tratamento da mastite. A terapia sistêmica, juntamente com a infusão intramamária, é necessária em casos de toxemia ou septicemia, com destaque para cefalosporinas e ceftiofur. O tratamento das vacas secas também é uma prática relevante para reduzir a mastite subclínica no período seco e evitar recidivas de infecções (RIBEIRO; LANGONI; DOMINGUES, 2016).

O uso seletivo de antimicrobianos tem se destacado como uma estratégia para evitar tratamentos desnecessários e reduzir o uso de antimicrobianos em vacas com CCS baixa. O antibiograma é uma ferramenta importante para identificar os microrganismos resistentes e suscetíveis aos antimicrobianos, auxiliando no combate à resistência bacteriana. Assim, a escolha adequada dos antibióticos e a implementação de estratégias seletivas são fundamentais para o sucesso no tratamento da mastite bovina (COSTA, 2014; CAMERON *et al.*, 2015; CALIMAN; GASPAROTTO; RIBEIRO, 2023).

Controle e prevenção

As medidas de controle de mastite devem ter como foco a redução de novas infecções; a redução da duração de casos e eliminação dos existentes; e o monitoramento contínuo da saúde do rebanho (SANTOS *et al.*, 2019).

As Boas Práticas Agropecuárias (BPA) são fundamentais para garantir a saúde dos animais e a qualidade do leite (Figura 4), atendendo às normas da legislação. Quando bem aplicadas podem não só reduzir a incidência, mas substituir a antibioticoterapia. A higiene é primordial, desde o momento que antecede a ordenha, com lavagem e secagem adequadas dos tetos, uso de pré e *pós-dipping* com desinfetantes específicos, e garantindo a limpeza das instalações e equipamentos utilizados na ordenha (Figura 4). Uma limpeza adequada, não se limita às instalações,

mas também à higiene pessoal do ordenhador. Além da limpeza, o funcionamento correto do sistema de ordenha, o manejo ambiental e o uso de selantes nos tetos na secagem auxiliam na redução de novas infecções (COSER; LOPES; COSTA, 2012; LANGONI, 2013; SANTOS *et al.*, 2019; SHARUN, 2021; CALIMAN; GASPAROTTO; RIBEIRO, 2023).

A eliminação de infecções já existentes e a redução da duração dos quadros podem ser alcançadas com tratamento imediato e adequado durante a lactação (quando houver recomendação); com o tratamento de vacas secas, a secagem adequada evita a ocorrência de mastite subclínica durante o período seco; o descarte de vacas com formas crônicas também é importante para a obtenção de bons resultados (LANGONI, 2017; SANTOS *et al.*, 2019).

Já o monitoramento contínuo da saúde das glândulas mamárias (Figura 4), do indivíduo e do rebanho, avalia o sucesso das medidas de controle e se necessário a adoção de medidas mais específicas. (SANTOS *et al.*, 2019).

Figura 4: Práticas rotineiras na ordenha que auxiliam no controle de disseminação e detecção precoce de casos de mastite



A) Exame físico do úbere; B) *Pré-dipping*; C) Secagem dos tetos com papel descartável, uma folha para cada tete; D) Uso de teteira adequada e devidamente higienizada Teste CMT. (Fonte: fotos da autora, 2023).

Um dos pilares do controle da mastite mundial é o “programa dos 5 pontos”, desenvolvido na Inglaterra pelos pesquisadores do antigo NIRD (*National Institute of Research in Dairying*). Esse programa enumera cinco pontos principais de maior atenção para o controle eficiente da mastite contagiosa em uma propriedade (HILLERTON; BOOTH, 2018; SANTOS *et al.*, 2019).

O primeiro ponto é a rotina de ordenha correta e a desinfecção dos tetos, onde o ambiente de ordenha deve ser limpo e calmo, com a realização de testes para diagnosticar a mastite clínica. O *pré-dipping* e o *pós-dipping* são realizados com eficácia comprovada para controle de patógenos contagiosos.

O segundo ponto é o tratamento imediato dos animais positivos para mastite clínica durante o período de lactação. Esses animais devem ser tratados e ordenhados por último.

O terceiro ponto destaca a limpeza, manutenção e funcionamento adequado dos equipamentos utilizados na ordenha. A higienização deve incluir uma série de procedimentos como pré-enxague, uso de detergente alcalino clorado, enxague, lavagem com detergente ácido e uso de sanitizantes.

O quarto ponto é a identificação, separação e descarte de vacas com casos crônicos de mastite. O uso de cultura microbiológica é recomendado para identificar o patógeno e direcionar o tratamento adequado, evitando a resistência bacteriana.

Por fim, o quinto ponto aborda o manejo ambiental. O local de ordenha deve ser sempre limpo para eliminar patógenos ambientais, garantindo segurança e conforto para os animais. Estratégias como a oferta de alimentos após a ordenha são usadas para evitar que o animal se deite e favoreça a infecção (HILLERTON; BOOTH, 2018; SANTOS *et al.*, 2019).

O programa tem passado por aprimoramentos constantes, ARCANJO *et al.* aplicou o uso do “Programa dos seis pontos no controle da mastite bovina” em uma propriedade leiteira, seu programa segue estrutura similar ao anterior, mas acrescenta a secagem dos animais como um ponto importante no controle da mastite. Seus pontos são: 1) Rotina de ordenha correta e desinfecção dos tetos (*pré-dipping* e *pós-dipping*); 2) Tratamento dos animais positivos para mastite clínica no período de lactação; 3) uso de antibióticos de secagem em todos os animais; 4) limpeza, manutenção e funcionamento ideal de equipamentos utilizados na ordenha; 5)

identificação, separação e descarte de vacas com casos crônicos de mastite e o 6) manejo do ambiente que os animais permanecem (ARCANJO *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2019; FONSECA *et al.*, 2021).

Um dos conjuntos mais completos atualmente é o “Programa de 10 pontos” recomendado pelo *National Mastitis Council* dos Estados Unidos da América (EUA), o programa traz as seguintes medidas (HILLERTON; BOOTH, 2018; SANTOS *et al.*, 2019):

- 1) Coleta de dados sobre a sanidade do úbere: é importante implantar uma rotina de coleta de dados, como CCS individual e do tanque, casos de mastite clínica e seus agentes (identificação do animal, quarto afetado, gravidade, duração e o tratamento utilizado);
- 2) Estabelecer metas para os indicadores de sanidade do úbere: é necessário analisar a situação do rebanho e definir metas, que possam ser alcançadas para os indicadores (CCS do tanque, prevalência de mastite subclínica, incidência de mastite clínica e dos agentes causadores);
- 3) Ambiente limpo e confortável para permanência dos animais: um ambiente de tamanho adequado para a lotação, manutenção das camas para reduzir riscos de contaminação dos tetos e novos casos de mastite ambiental e boas condições de limpeza e higiene nas instalações de vacas secas, em lactação e parição;
- 4) Rotina de ordenha: a eficiência e rapidez na ordenha (testes diagnósticos de mastite precisam fazer parte da rotina, a desinfecção dos tetos antes da ordenha, utilização de materiais descartáveis para a secagem, uso correto das teteiras e desinfecção/selante pós-ordenha) reduzem o risco de novas infecções e aumentam a qualidade da produção de leite;
- 5) Manutenção e uso adequando do equipamento: a avaliação e manutenção periódicas, o uso de equipamento de dimensão correta e o treinamento dos ordenhadores para uso, evitam deficiências de estimulação e otimizam o fluxo e tempo de ordenha;
- 6) Tratamento de mastite clínica, com recomendação: priorização do

tratamento de casos clínicos durante a lactação, idealmente baseado no agente causador, escolha dos medicamentos adequados com recomendação de profissional veterinário, ordenha separada e descarte do leite de vacas em período de carência;

- 7) Controle de vacas secas: a recomendação atual é realizar o tratamento de vaca seca em todos os animais com mastite subclínica ou com histórico de mastite clínica, buscando eliminar os casos de mastite subclínica que surgiram durante a lactação. O protocolo de vacinação deve ser instituído em rebanhos com alta incidência de mastite ambiental por coliformes, reduzindo a ocorrência e gravidade dos casos;
- 8) Separação e descarte de casos crônicos: separação durante a ordenha, serem ordenhadas por último, ou enviadas para descarte. São potenciais fontes de infecção e a chance de cura com tratamento é baixa;
- 9) Medidas de biossegurança: quarentena de animais adquiridos antes da introdução no rebanho, obtenção de dados sobre a sanidade do úbere das vacas compradas, coleta de amostra para CCS e cultura, animais com CCS alta ou com histórico de mastite infecciosa devem ser separados dos demais;
- 10) Avaliação periódica das medidas de controle: o sucesso do programa implica na sua avaliação constante, identificar o cumprimento das metas e a necessidade de ajustes. O manejo da ordenha e os protocolos de tratamento devem ser reavaliados com frequência devido à variabilidade de alguns fatores, como a dinâmica dos microrganismos, troca de colaboradores, sazonalidade e inovações tecnológicas.

A adoção dessas medidas de controle e prevenção da mastite bovina é essencial para garantir a saúde do rebanho e a produção de leite de qualidade, contribuindo para o sucesso da atividade leiteira na propriedade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOSTA, A. C. E. A. Mastites em ruminantes no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 36, n. 7, 2016., p. 565-573
- ARCANJO, A. H. M. *et al.* Programa dos seis pontos de controle da mastite em rebanhos leiteiros. **Global Science and Technology**, 10, n. 1, 2017.
- AVANZA, M. F. B. *et al.* Mastite bovina. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária**, n. 2, 2008.
- AZHAR, A. *et al.* Detection of high levels of resistance to linezolid and vancomycin in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Medical Microbiology**, 66, n. 9, 2017.
- BETTANIN, J. Frequência de Isolamentos dos Agentes Etiológicos da Mastite Bovina no Sudoeste Paranaense. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, Fortaleza, 13, n. 4, 2019., p. 440-451
- BRASIL. Instrução Normativa n. 9, de 27 junho de 2003. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2003.
- BRASIL. **Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 6: Detecção e identificação de bactérias de importância médica.** Brasília: Anvisa, v. 9, 2013.
- BRASIL. **Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 6: Detecção e identificação de bactérias de importância médica.** Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, v. 9, 2013. p. 150.
- BRASIL. Instrução Normativa n. 76, de 26 de novembro de 2018. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento., 2018., p. 9.
- BRCAST; EUCAST. Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos. **Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing**, 2023. Disponível em: <https://brcast.org.br/>.
- CALIMAN, M. D. F.; GASPAROTTO, P. H. G.; RIBEIRO, L. F. PRINCIPAIS IMPACTOS DA MASTITE BOVINA: REVISÃO DE LITERATURA. **Getec**, 12, n. 37, 2023., p. 91-102
- CAMERON, M. *et al.* Evaluation of selective dry cow treatment following on-farm culture: Milk yield and somatic cell count in the subsequent lactation. **J. Dairy Sci.**, 98, 2015., p. 2427-2436
- CARDOSO, H. F. T.; CARMO, L. S.; SILVA, N. Detecção da toxina-1 da síndrome do choque tóxico em amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, Belo Horizonte, 52, n. 1, 2000.
- CDC. **Antibiotic resistance threats in the United States.** [S.l.]: Centers for Disease Control and Prevention, 2013.
- CLSI. Performance Standard for Antimicrobial Susceptibility Testing, M100-S29. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2019. Disponível em: <https://clsi.org/>.
- COELHO, S. D. M. D. O. *et al.* Profile of virulence factors of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of dairy science**, 94, n. 7, 2011., p. 3305-3310
- COSER, S. M.; LOPES, M. A.; COSTA, G. M. Mastite bovina: controle e. **Boletim Técnico**, Lavras, MG, n. 93, 2012., p. 1-30
- COSTA, G. M. D. *et al.* Resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite em bovinos leiteiros de Minas Gerais, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, 80, n. 3, 2013., p. 297-302
- COSTA, G. M. E. A. Resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite em bovinos leiteiros de Minas Gerais, Brasil. **Arq. Inst. Biol**, 80, 2014., p. 297-302
- COSTA, P. D.; DIAS, R. S. Ocorrência de Linhagens Enterotoxigênicas de *Staphylococcus spp.* em Leite e Derivados Envolvidos em Doenças Transmitidas por Alimentos. **Periódico Científico Do Núcleo de Biotecnologia**, 3, n. 5, 2013., p. 32-38
- DURAN, N. *et al.* Antibiotic resistance genes & susceptibility patterns in *Staphylococci*.

Indian Journal of Medical Research, 135, n. 3, 2012., p. 389-396

EMBRAPA. **Anuário Leite**. Embrapa Gado de Leite. [S.l.], p. 116. 2022.

FONSECA, M. E. B. D. *et al.* Mastite bovina: Revisão. **PUBVET**, 15, n. 2, 2021., p. 1-18

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. D. S.; PUPO, M. T. ANTIBIÓTICOS: IMPORTÂNCIA TERAPÊUTICA E PERSPECTIVAS PARA A DESCOBERTA E DESENVOLVIMENTO DE NOVOS AGENTES. **Química Nova**, 33, n. 3, 2010., p. 667-679

HILLERTON, E.; BOOTH, J. The Five-Point Mastitis Control Plan-A Revisory Tutorial. **National Mastitis Council**, Washington, p. 3-19, 2018.

HOOKEY, J. V.; RICHARDSON, J. F.; COOKSON, B. D. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on PCR restriction fragment length polymorphism and DNA sequence analysis of the coagulase gene. **Journal of Clinical Microbiology**, 36, 1998., p. 1083-1089

JESUS, R. A.; COUTINHO, C. A. Uso de medicamentos homeopáticos para o tratamento da mastite bovina: Revisão. **PUBVET**, 12, n. 3, 2018., p. 1-10

JUSKO, M. *et al.* Staphylococcal proteases aid in evasion of the human complement system. **J. Innate Immun**, 6, 2014., p. 31-46

KONEMAN, E. W. *et al.* **Diagnóstico Microbiológico – Texto e atlas colorido**. 5. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001. p. 1465.

KONG, C.; NEOH, H.; NATHAN, S. Targeting *Staphylococcus aureus* Toxins: A Potential form of Anti-Virulence Therapy. **Toxins**, 8, n. 3, 2016., p. 72

KREWER, C. C. E. A. Etiology, antimicrobial susceptibility profile of *Staphylococcus* spp. and risk factors associated with bovine mastitis in the states of Bahia and Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 33, n. 5, 2013., p. 601-606

LANGONI, H. *et al.* Utilização da enrofloxacin (Baytril®) no tratamento da mastite bovina estafilocócica. **Ciência Rural**, 30, n. 1, 2000., p. 167-170

LANGONI, H. Qualidade do leite: utopia sem um programa sério de monitoramento da ocorrência de mastite bovina. **Pesq. Vet. Bras**, 33, 2013., p. 620-626

LANGONI, H. E. A. Considerações sobre o tratamento das mastites. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 37, n. 11, 2017., p. 1261-1269

LEMONS, E. T. **Sistema de monitoramento de leite para detecção de mastite**. [S.l.]: Universidade de Passo Fundo, 2018.

LOPES, B. C.; MANZI, M. P.; LANGONI, H. Etiologia das mastites: pesquisa de micro-organismos da classe Mollicutes. **Veterinária e Zootecnia**, 25, n. 2, 2018.

LOWY, F. D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **The Journal of Clinical Investigation**, 111, n. 9, May 2003., p. 1265-1273

MAHMOUDI, H. *et al.* Molecular analysis of the coagulase gene in clinical and nasal carrier isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by restriction fragment length polymorphism. **Journal of global antimicrobial resistance**, 8, 2017., p. 41-45

MAIOCHI, R.; RODRIGUES, R.; & WOSIACKI, S. Principais métodos de detecção de mastites clínicas e subclínicas de bovinos. **Enciclopédia Biosfera**, 16, n. 29, 2019., p. 1237-1251

MARCOS, J. Y. *et al.* pid identification and typing of *Staphylococcus aureus* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *aroA* gene. **Journal of Clinical Microbiology**, 37, 1999., p. 570-574

MARQUES, V. F. *et al.* Análise fenotípica e genotípica da virulência de *Staphylococcus* spp. e de sua dispersão clonal como contribuição ao estudo da mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 33, n. 2, 2013., p. 161-170

MASSOTE, V. P. *et al.* Diagnóstico e controle de mastite bovina: uma revisão de literatura. **Revista Agroveterinária Do Sul de Minas**, 1, n. 1, 2019., p. 41-54

MCADOW, M. *et al.* Coagulases as determinants of protective immune responses against *Staphylococcus aureus*. **Infect. Immun**, 80, 2012., p. 3389-3398

MEYER, N. S. *et al.* Microrganismos isolados de quartos mamários com mastite sub-clínica em unidades de produção leiteira de Pelotas/RS. **Congresso de Iniciação Científica da**

Universidade Federal, 2013.

MOUSSALLEM, B. C.; KURY, C. M. H.; MEDINA-ACOSTA, E. Detecção dos genes *mecA* e *femA*, marcadores moleculares de resistência a meticilina, em *Staphylococcus* spp. isolados de pacientes admitidos em uma Unidade Neonatal de Tratamento Intensivo. **Revista Científica da FMC**, 2, n. 2, 2007.

MUSHTAQ, S.; AL., E. Bovine mastitis: an appraisal of its alternative herbal cure. **Microbial Pathogenesis**, Londres, 114, 2018., p. 357-361

NETO, F. P.; ZAPPA, V. Mastite em vacas leiteiras - revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, 16, 2011., p. 1679-7353

NOGUEIRA, F. R. B. *et al.* ermografia infravermelha: uma ferramenta para auxiliar no diagnóstico e prognóstico de mastite em ovelha. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, 35, n. 3, 2013., p. 289-297

OLIVEIRA, D.; BORGES, A.; SIMÕES, M. *Staphylococcus aureus* Toxins and Their Molecular Activity in Infectious Diseases. **Toxins**, 10, n. 6, 2018., p. 252

OLIVEIRA, G. C. *et al.* Perfil microbiológico de *Streptococcus* spp. Como agentes causadores de mastites clínicas em diversas regiões do Brasil. **Revista de Educação Continuada Em Medicina Veterinária e Zootecnia Do CRMV-SP**, 14, n. 3, 2016., p. 74

OLIVEIRA, S. C. C. *et al.* Extratos de plantas brasileiras no controle da bactéria *Staphylococcus aureus* causadora da mastite contagiosa em bovinos leiteiros. **Revista Tecnológica**, 27, n. 1, 2019., p. 48-58

OLIVEIRA, S. J. **Microbiologia Veterinária: Guia bacteriológico prático**. 2. ed. Canoas: Ulbra, 2000. p. 237.

PEREIRA, C. T. M. *et al.* Microbiology quality, detection of enterotoxin genes and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from milk and Coalho cheese. **Semina: Ciências Agrárias**, 39, n. 5, 2018., p. 1957-1968

POLL, P. S. E. M. **GENOTIPIFICAÇÃO DE *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE QUEIJO MINAS FRESCAL E LEITE DE BOVINOS COM MASTITE SUBCLÍNICA**. Universidade de Brasília. Brasília, p. 107. 2020.

POLLITT, E. J. *et al.* *Staphylococcus aureus* infection dynamics. **PLoS pathogens**, 14, n. 6, 2018., p. e1007112

QU, Y. *et al.* Molecular epidemiology and distribution of antimicrobial resistance genes of *Staphylococcus* species isolated from Chinese dairy cows with clinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, 102, n. 2, 2019., p. 1571–1583

QUINN, P. J. *et al.* **Clinical Veterinary Microbiology**. Londres: Wolfe-Mosby, 1994. p. 648.

QUINN, P. J. *et al.* **Veterinary Microbiology and Microbial Disease**. 2. ed. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2011. p. 928.

RAGBETLI, C. *et al.* Evaluation of Antimicrobial Resistance in *Staphylococcus aureus* Isolates by Years. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, 2016, 2016.

RAMOS, F. S. *et al.* Importância do diagnóstico da mastite subclínica e seus impactos econômicos em propriedades leiteiras–revisão de literatura. **Faculdade de Ciências da Saúde de Unaí - MG**, 2017., p. 44

REINOSO, E. B. *et al.* Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from humans, bovine subclinical mastitis and food samples in Argentina. **Microbiological Research**, 163, n. 3, 2008., p. 314-322

REINOSO, E. B. *et al.* Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from humans, bovine subclinical mastitis and food samples in Argentina. **Microbiological Research**, 163, n. 3, 2008., p. 314-322

REIS, I. J. D.; AL., E. Identificação dos principais agentes causadores da mastite clínica e avaliação dos perfis de sensibilidade e resistência. **Encontro Nacional de Patologia Clínica Veterinária - ENPCV**, 16, n. 3, 2017. Disponível em:

<http://publicacoes.unifran.br/index.php/investigacao/article/view/1968>.

RIBEIRO, M. G.; LANGONI, H.; DOMINGUES, P. F. & P. J. C. F. Mastite em animais

domésticos. In: J.; RIBEIRO, M. G.; PAES **Doenças Infecciosas em Animais de Produção e de Companhia**. Roca. Rio de Janeiro: ROCA, 2016., p. 1155-1205.

SAAB, A. B. *et al.* revalência e etiologia da mastite bovina na região de Nova Tebas, Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, 35, n. 2, 2014., p. 835-843

SANTOS, M. V. D. *et al.* **Controle da mastite e qualidade do leite - Desafios e soluções**. 1. ed. Pirassununga: [s.n.], 2019. p. 301. ISBN 978-85-915913-1-2.

SANTOS, W. B. R. Mastite bovina: uma revisão. **Colloquium Agrariae**, São Paulo, 13, 2017., p. 301-314

SANTOS, W. B. R. Mastite bovina: Uma revisão. **Colloquium Agrariae**, São Paulo, 13, 2017., p. 301-314

SCHVARZ, D. W.; SANTOS, J. M. G. Mastite bovina em rebanhos leiteiros: Ocorrência e métodos de controle e prevenção. **Revista Em Agronegócio e Meio Ambiente**, 5, n. 3, 2012., p. 453-473

SHALLCROSS, L. *et al.* The role of the Pantone-Valentine leucocidin toxin in staphylococcal disease: a systematic review and meta-analysis. **Lancet Infect Dis**, 13, n. 1, 2013., p. 43-54

SHARUN, K. E. A. Advances in therapeutic and management approaches of bovine mastitis: a comprehensive review. **Veterinary Quarterly**, 41, n. 1, 2021., p. 107-136

SHUKKEN, Y. E. A. The “other” Gram-negative bacteria in mastitis, *Klebsiella*, *Serratia*, and more. **Veterinary Clinics Food Animal Practice**, 28, 2012., p. 239-256

SILVEIRA-FILHO, V. M. *et al.* Molecular epidemiologic study of *Staphylococcus*. **Revista NAPGAMA**, 8, n. 1, 2005., p. 12-17

SOMPOL, N. *et al.* Prevalence and Genetic Profiles of *Staphylococcus aureus* Isolated from Milk in Mastitic Dairy Cows Based on Conventional and Multiplex PCR Assays in Khon Kaen Province, Thailand. **Pawarun Agriculture Journal**, 15, n. 1, 2018., p. 278-288

SOUZA, K. S. S. *et al.* Resistência a antimicrobianos de bactérias isoladas de vacas leiteiras com mastite subclínica. **Caderno de Ciências Agrárias**, Belo Horizonte, 8, n. 2, 2016., p. 83-89

TONG, S.; CHEN, L.; FOWLER, V. Colonization, pathogenicity, host susceptibility, and therapeutics for *Staphylococcus aureus*: what is the clinical relevance? **Seminars in Immunopathology**, 34, n. 2, 2012., p. 185-200

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre: ARTMED, 2008. p. 894.

VITORINO, D. H. L. C. *Escherichia coli* produtora da toxina shiga em bovinos: revisão. **Higiene Alimentar**, Londrina, 32, 2018., p. 57-61

YILMAZ, E. S.; ASLANTAS, Ö. Antimicrobial resistance and underlying mechanisms in *Staphylococcus aureus* isolates. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, 10, n. 11, Nov 2017., p. 1059-1064

ZAPOTOCZNA, M.; O'NEILL, E.; O'GARA, J. P. Untangling the diverse and redundant mechanisms of *Staphylococcus aureus* biofilm formation. **PLoS pathogens**, 12, n. 7, 2016.

ZECCONI, A.; SCALI, F. *Staphylococcus aureus* virulence factors in evasion from innate immune defenses in human and animal diseases. **Immunol. Lett.**, 150, 2013., p. 12-22

CAPÍTULO II

RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE MASTITE BOVINA.

Resumo

O *Staphylococcus aureus* é frequentemente encontrado na mastite subclínica em bovinos, causando danos consideráveis aos tecidos produtores de leite devido à liberação de toxinas e sua resistência ao tratamento. A mastite bovina é uma doença de grande impacto econômico na produção de leite, levando a perdas significativas para os produtores devido à sua complexidade e caráter multifatorial, comumente associada ao envolvimento de vários patógenos, especialmente grupos de bactérias, estafilococos e estreptococos. Além das perdas na produção e no descarte de animais, o uso de antibióticos no tratamento pode resultar em efeitos residuais no leite, prejudicando a qualidade do produto e a saúde pública. Isso está associado a surtos de toxinfecções alimentares e pode favorecer o desenvolvimento de resistência antimicrobiana. A análise do perfil de resistência antimicrobiana demonstrou maior resistência às bases farmacológicas claritromicina (100%), doxiciclina (92,9%), linezolidina (92,9%) e clindamicina (89,3%), e menor resistência à nitrofurantoína (10,7%); gentamicina (17,9%), vancomicina (17,9%), oxacilina (25%), cefotaxima (32,1%), ciprofloxacino (32,1%), e trimetoprim-sulfametoxazol (39,3%). A nitrofurantoína mostrou o maior perfil de sensibilidade, atingindo 89,3%, seguida da gentamicina e vancomicina com 82,1%. Quanto à identificação molecular das cepas, todas foram confirmadas pelo gene espécie-específico AroA. Para o gene CoA, observaram-se tamanhos de fragmentos amplificados. Não foi detectado o gene MecA em nenhuma amostra, mas o gene blaZ de resistência à β -lactâmicos esteve presente em 89,7% das amostras. Os genes tetK, tetM, vanA e vanB apresentaram reações positivas sendo 10/28 (34,5%), 10/28 (34,5), 5/28 (17,2%) e 9/28 (31%), respectivamente. Os resultados demonstram um elevado perfil de resistência antimicrobiana a algumas classes antibióticas e evidenciam a importância de um diagnóstico adequado que auxilie na tomada de decisão quanto ao tratamento aplicado, uma vez que, são microrganismos de alta diversidade genética e elevado

teor de genes de resistência.

Palavras chave: Mastite bovina, *Staphylococcus aureus*, Sensibilidade antimicrobiana, Genes de resistência, Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Abstract

Staphylococcus aureus is commonly isolated in cases of subclinical mastitis in cattle, leading to significant damage to milk-producing tissues due to toxin release and resistance to treatment. Bovine mastitis poses a substantial economic impact on milk production, resulting in substantial losses for producers due to its complex and multifactorial nature, often involving various pathogens, notably staphylococci and streptococci bacterial groups. In the context of Brazil, bovine mastitis represents a relevant health issue, with production losses, animal disposal, and antibiotic usage potentially leading to residual effects in milk, compromising product quality and public health. This situation is associated with outbreaks of foodborne infections and the development of antimicrobial resistance. Antimicrobial resistance analysis indicated higher resistance to clarithromycin (100%), doxycycline (92.9%), linezolid (92.9%), and clindamycin (89.3%), and lower resistance to nitrofurantoin (10.7%), gentamicin (17.9%), vancomycin (17.9%), oxacillin (25%), cefotaxime (32.1%), ciprofloxacin (32.1%), and trimethoprim-sulfamethoxazole (39.3%). Nitrofurantoin exhibited the highest sensitivity profile, reaching 89.3%, followed by gentamicin and vancomycin reaching 82,1%. Regarding molecular identification, all strains were confirmed by the species-specific AroA gene. Amplified fragment sizes were observed for the CoA gene. The MecA gene was not detected in any sample, while the β -lactam resistance gene blaZ was present in 89.7% of samples. The tetK, tetM, vanA, and vanB genes showed positive reactions at 10/28 (34.5%), 10/28 (34.5%), 5/28 (17.2%), and 9/28 (31%) respectively. The results highlight a high profile of antimicrobial resistance to specific antibiotic classes and emphasize the importance of an accurate diagnosis to guide treatment decisions, given the microorganisms' genetic diversity and abundance of resistance genes.

Keywords: Bovine mastitis, *Staphylococcus aureus*, Antimicrobial sensitivity, Resistance genes, Polymerase Chain Reaction (PCR).

INTRODUÇÃO

A resistência antimicrobiana representa uma das maiores preocupações globais em saúde pública, afetando não apenas o tratamento de infecções em humanos, mas também em animais, como é o caso da mastite bovina causada por *Staphylococcus aureus*. A mastite bovina é uma doença de grande impacto econômico na indústria leiteira, causando perdas significativas aos produtores e prejudicando a qualidade do produto final. A presença de *Staphylococcus aureus* na mastite bovina é particularmente problemática, pois esse patógeno é conhecido por liberar toxinas e desenvolver resistência antimicrobiana, tornando-o difícil de ser erradicado e tratado com eficácia (SANTOS, 2017; NETO; ZAPPA, 2011; FONSECA *et al.*, 2021).

O perfil de resistência antimicrobiana dos estafilococos isolados de mastite bovina assume papel central nesse contexto, uma vez que o uso inadequado de antibióticos no tratamento da doença pode resultar em seleção de cepas resistentes e comprometer o sucesso terapêutico (FONSECA *et al.*, 2021).

A presença de genes de resistência antimicrobiana nesses estafilococos é outro aspecto relevante a ser considerado. A detecção de genes espécie-específicos, coagulase e genes de resistência à β -lactamases, tetraciclinas e vancomicina por meio da técnica de PCR aponta para uma preocupante carga genética de resistência nesses microrganismos. A elevada diversidade genética e a presença de genes de resistência podem contribuir para a disseminação dessas características em outras bactérias, agravando ainda mais o problema da resistência antimicrobiana (LOWY, 2003; GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

Esses achados são de extrema relevância para a saúde pública e para a indústria leiteira, uma vez que a presença de cepas resistentes de *Staphylococcus aureus* na mastite bovina pode levar a problemas adicionais, como surtos de toxinfecções alimentares e a disseminação de resistência a outros patógenos. Além disso, a resistência antimicrobiana compromete a eficácia dos tratamentos, prolongando a duração das infecções e aumentando os custos de produção (COSTA; DIAS, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2019).

Dessa forma, estudos voltados ao perfil de resistência e à presença genética de mecanismos de resistência são imprescindíveis e devem ser levados em

consideração na formulação de políticas de saúde animal e no estabelecimento de estratégias para o controle da mastite bovina. É fundamental que os produtores e os profissionais de saúde veterinária tenham acesso a essas informações para a tomada de decisões embasadas em dados científicos, visando ao uso responsável de antibióticos e à preservação da eficácia desses medicamentos. Além disso, são necessários investimentos contínuos em pesquisa e desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas, bem como na implementação de práticas adequadas de manejo e higiene na produção de leite, a fim de minimizar o impacto da resistência antimicrobiana e garantir a segurança dos alimentos e a saúde pública.

OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é correlacionar o perfil de resistência a antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* isolados de mastites subclínicas com a presença de genes de resistência a algumas das principais bases farmacológicas utilizadas no tratamento.

Oriundas do banco de germoplasma do Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária da Universidade de Brasília, as amostras de *Staphylococcus aureus* foram descongeladas, recultivadas e caracterizadas bioquimicamente. Utilizando a técnica de kirby-bauer foi realizado o antibiograma por disco-difusão para determinar um perfil de sensibilidade dos *S. aureus* viáveis frente aos antimicrobianos: Azitromicina, Ciprofloxacina, Claritromicina, Clindamicina, Cloranfenicol, Cefotaxima, Doxiciclina, Eritromicina, Gentamicina, Linezolida, Levofloxacina, Minociclina, Moxifloxacino, Nitrofurantoína, Oxacilina, Penicilina G, Rifampicina, Trimetoprim-Sulfametoxazol, Tetraciclina, Trimetoprim e Vancomicina.

O DNA foi extraído e submetido a reações de PCR a fim de detectar nas bactérias viáveis a presença do gene espécie-específico (*AroA*) e da coagulase (*CoA*), bem como, detectar a presença de genes de resistência aos β -lactâmicos (*mecA*, *blaZ*), tetraciclinas (*tetK* e *tetM*) e glicopeptídeos (*vanA* e *vanB*).

Este estudo tem como objetivo principal fornecer informações valiosas para a compreensão e o combate eficaz à resistência antimicrobiana em casos de mastite bovina, contribuindo assim para a promoção da saúde animal, a segurança dos

alimentos e a saúde pública.

MATERIAIS E MÉTODOS

Características das cepas bacterianas e seu cultivo

Para esse estudo, foram selecionadas cepas de *Staphylococcus aureus* isolados de quadros de mastite bovina clínica e subclínica e armazenados no banco de germoplasma do laboratório para pesquisas posteriores. Foram recultivadas 26 amostras datadas do ano de 2012 e três amostras recentes, do ano de 2023. As cepas utilizadas como controle positivo também são pertencentes ao banco de germoplasma do laboratório.

As cepas bacterianas, mantidas à -20°C em caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI, Kasvi™) contendo 20% glicerol, foram inoculadas em meio BHI, incubadas a 37°C por 24h e, posteriormente, transpassadas em meio ágar sangue de cordeiro 5% (AS, TM Media®), a 37°C por mais 24h.

As cepas foram submetidas à identificação bioquímica, para a qual foram realizados testes de catalase, coagulase, fermentação de ágar sal manitol, teste fermentativo oxidativo (O/F), provas de vermelho de metila e Voges-Proskauer cujos resultados foram consistentes com a bactéria da espécie *S. aureus*, conforme relatado nas tabelas de identificação por autores como KONEMAN *et al.*(2001), OLIVEIRA (2000) e QUINN *et al.*(1994, 2011).

Teste de suscetibilidade antimicrobiana

A análise de sensibilidade a antibióticos foi realizada por disco difusão conforme as recomendações do Clinical and Laboratory Standards Institute, Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing e European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (CLSI, 2019; BRCAS; EUCAST, 2023).

As cepas caracterizadas como *S. aureus* foram transferidas para o caldo Müeller-Hinton (MH, IonLab®) e incubadas a 37°C, por 3h, para que alcançassem a turbidez de 0,5 na escala padrão McFarland. Foram então inoculadas, utilizando *swab* estéril, por toda a superfície do ágar Müeller-Hinton (Kasvi™), método de Kirby-Bauer.

Os discos de antimicrobianos utilizados foram: azitromicina (15 µg), ciprofloxacina (5 µg), claritromicina (15 µg), clindamicina (2 µg), cloranfenicol (30 µg), cefotaxima (30 µg), doxiciclina (30 µg), eritromicina (15 µg), gentamicina (10 µg), linezolida (10 µg), levofloxacina (5 µg), minociclina (30 µg), moxifloxacino (5 µg), nitrofurantoína (300 µg), oxacilina (1 µg), penicilina G (10U), rifampicina (5 µg), trimetoprim-sulfametoxazol (25 µg), tetraciclina (30 µg), trimetoprim (5 µg) e vancomicina (30 µg). Após a colocação dos discos, as placas foram incubadas a 37°C por 18h, a leitura foi realizada com o auxílio de um paquímetro e os diâmetros dos halos foram comparados com a tabela padrão de interpretação do *BrCAST*® (BRCAST; EUCAST, 2023).

Identificação de genes espécie-específico, coagulase e resistência antimicrobiana por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As amostras foram reinoculadas em caldo BHI e incubadas a 37° por 24h para extração do DNA. Após esse período foram transferidos 200 µl do caldo para microtubos, a extração foi feita utilizando o kit comercial *QIAamp*® *DNA minikit* (Qiagen, Hilden®) seguindo as recomendações do fabricante.

As amplificações foram realizadas em volume final de 25 µl, utilizando o *Taq pol – Master mix 2x* (Cellco Biotec®). Cada reação consistiu em 12,5 µl do *Master mix* (0,05U/µl de *Taq* DNA polimerase, solução tampão, 0,3mM MgCl₂, 0,4mM de cada dNTP); 4 µl de DNA extraído; 5,5 µl de água ultrapura (milli-Q®) e 1,5 µl (10 pmol) de cada *primer*. As sequências de nucleotídeos, o tamanho dos fragmentos amplificados, bem como as referências correspondentes estão listadas na tabela 1.

As reações foram feitas em termociclador *SimpliAmp*™ *Thermal Cycler* (Thermo Fisher Scientific®), seguindo os seguintes programas: AroA¹ – desnaturação inicial a 94°C por 2 min, 40 ciclos de 92°C por 60 s, 58°C por 60 s e 72°C por 90 s, seguidos por uma extensão final a 72°C por 10 min (Marcos et al., 1999); CoA² - desnaturação inicial a 94°C por 45 s, 30 ciclos de 94°C por 20 s, 57°C por 15 s e 70°C por 15 s, seguidos por uma extensão final a 72°C por 2 min; blaZ³, mecA⁴, tetK⁵, tetM⁵, vanA⁶, vanB⁶ - desnaturação inicial a 95°C por 5 min, 30 ciclos de 95°C por 20 s, as

¹ AroA – gene espécie-específico; ² CoA – gene da coagulase; ³ blaZ – gene de resistência à penicilina; ⁴ mecA – gene de resistência à meticilina; ⁵ tetK e tetM – gene de resistência à tetraciclina; ⁶ vanA e vanB – gene de resistência à vancomicina.

temperaturas de anelamento estão especificadas na tabela 1 por 30 s e 70°C por 15 s, seguidos por uma extensão final a 72°C por 2 min.

Tabela 1: Sequências de oligonucleotídeos iniciadores de PCR utilizados para amplificação dos genes espécie-específico, presença da enzima coagulase e genes de resistência antimicrobiana

Gene de resistência	Sequência do <i>primer</i> * (5'-3')	Temperatura de anelamento (°C)	Tamanho do fragmento (pb)	GenBank
aroA	F - AAG GGC GAA ATA GAA GTG CCG GGC R - CAC AAG CAA CTG CAA GCA T	58	1192 - 1174 (1153)	
CoA	F- ATAGAGATGCTGGTACAGG R - GCTTCCGATTGTTTCGATGC	57	490 / 570 / 680 / 780 / 850	
mecA	F - GTA GAA ATG ACT GAA CGT CCG ATA A R - CCA ATT CCA CAT TGT TTC GGT CTA A	59	310	
blaZ	F - ACTTCAACACCTGCTGCTTTC R - TGACCACTTTTATCAGCAACC	57	240	M60253
vanA	F - GGGAAAACGACAATTGC R - GTACAATGCGGCCGTTA	54	732	
vanB	F - ATGGGAAGCCGATAGTC R - GATTTTCGTTCCCTCGACC	55	635	
tet(K)	F - GTA GCG ACA ATA GGT AAT AGT R - GTA GTG ACA ATA AAC CTC CTA	54	360	S67449
tet(M)	F - AGT GGA GCG ATT ACA GAA R - CAT ATG TCC TGG CGT GTC TA	58	158	X56353

* F: *forward*; R: *reverse*. Fonte: adaptado de QU et al., 2011.

Para cada reação, foram utilizados controles negativos, com água milli-Q® no lugar do DNA, e controles positivos, com cepas específicas de *S. aureus*. Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (Ludwig Biotec®) a 1,5% para o gene AroA e a 1% para os demais genes em solução tampão 0,5 x TAE [Tris-acetato-EDTA] e corado com brometo de etídio (1 µg/µl).

Os controles positivos utilizados foram USA 400 para o gene AroA, ATCC® 27664 e ATCC® 29213 para detecção do gene CoA. O ATCC® 13585, para o gene mecA. A cepa controle positivo para a reação do gene blaZ foi o ATCC® 14468.

A eletroforese foi realizada em cuba horizontal (BioRad®) ajustada para 70V até que o tampão de corrida chegasse ao terço final do gel, e então submetido à luz ultravioleta em transiluminador (UVP®) para visualização dos fragmentos de tamanhos correspondentes (Tabela 1).

RESULTADOS

Teste de suscetibilidade antimicrobiana

O antibiograma possibilitou a análise do perfil de resistência aos diferentes antibióticos testados. Observou-se que as bases farmacológicas com maior porcentagem de resistência por parte do *S. aureus* foram a claritromicina (100%), doxiciclina (92,9%), linezolida (92,9%) e clindamicina (89,3%). Em contraste, as bases que apresentaram menor resistência foram a nitrofurantoína (10,7%); gentamicina (17,9%), vancomicina (17,9%), oxacilina (25%), cefotaxima (32,1%) ciprofloxacino (32,1%), e trimetoprim-sulfametoxazol (39,3%). Ao avaliar individualmente cada cepa frente às bases farmacológicas, a cefalosporina, nitrofurantoína demonstrou o maior perfil de sensibilidade, atingindo 89,3%, seguida da gentamicina e vancomicina com 82,1%, enquanto a claritromicina apresentou o maior perfil de resistência, com 100% das amostras. Detalhes completos das porcentagens podem ser encontrados na tabela 2.

Tabela 2: Amostras resistentes aos antimicrobianos como determinado pelo método de disco-difusão

ATB ¹	n. de amostras resistentes (%)		
	2012 (n = 25)	2023 (n = 3)	Total (n = 28)
AZI	10 (40)	3 (100)	13 (46,4)
CIP	8 (32)	1 (33,3)	9 (32,1)
CLA	25 (100)	3 (100)	28 (100)
CLI	23 (92)	2 (66,7)	25 (89,3)
CLO	12 (48)	0 (0)	12 (42,9)
CTX	7 (28)	2 (66,7)	9 (32,1)
DOX	24 (96)	2 (66,7)	26 (92,9)
ERI	22 (88)	1 (33,3)	23 (82,1)
GEN	5 (20)	0 (0)	5 (17,9)
LNZ	23 (92)	3 (100)	26 (92,9)
LVX	14 (56)	1 (33,3)	15 (53,6)
MIN	16 (64)	3 (100)	19 (67,9)
MFX	22 (88)	1 (33,3)	23 (82,1)
NIT	3 (12)	0 (0)	3 (10,7)
OXA	7 (28)	0 (0)	7 (25)
PEN	15 (60)	1 (33,3)	16 (57,1)
RIF	13 (52)	2 (66,7)	15 (53,6)
SUT	11 (44)	0 (0)	11 (39,3)
TET	16 (64)	2 (66,7)	18 (64,3)
TRI	18 (72)	2 (66,7)	20 (71,4)
VAN ²	3 (12)	2 (66,7)	5 (17,9)

¹ ATB, antimicrobianos; AZI, azitromicina; CIP, ciprofloxacina; CLA, claritromicina; CLI, clindamicina; CLO, cloranfenicol; CTX, cefotaxima; DOX, doxiciclina; ERI, eritromicina; GEN, gentamicina; LNZ, linezolida ; LVX, levofloxacina; MIN, minociclina; MFX, moxifloxacino; NIT, nitrofurantoína; OXA, oxacilina; PEN, penicilina G; RIF, rifampicina; SUT, trimetoprim-sulfametoxazol; TET, tetraciclina; TRI,

trimetoprim; VAN, vancomicina.

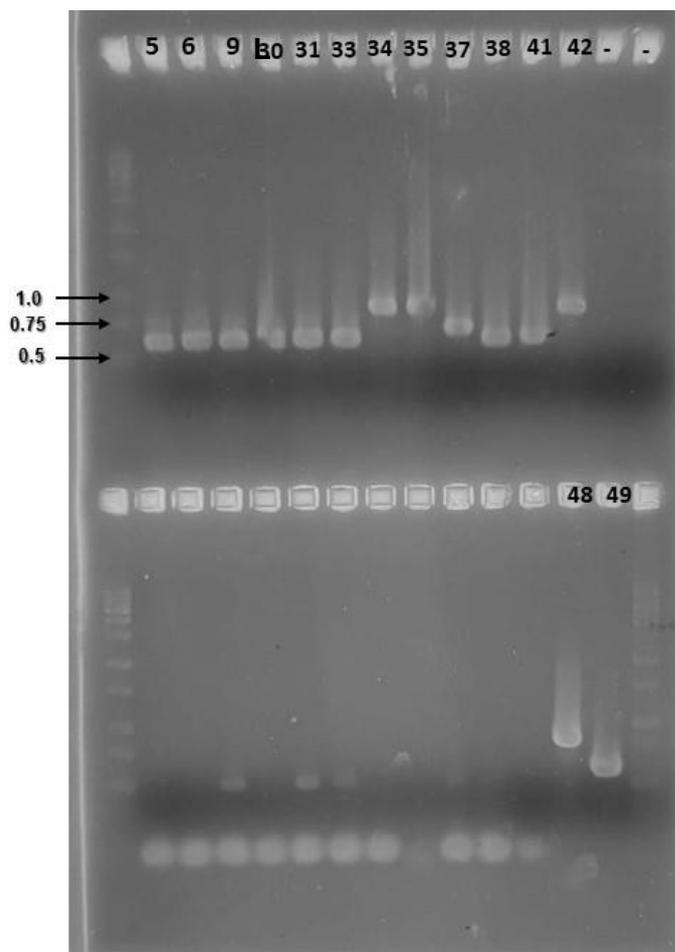
Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Performance Standard for Antimicrobial Susceptibility Testing, M100-S29, Jan 2019; Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (BrCAST), Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos, Mar 2023.

Fonte: criado pela autora, 2023.

Identificação de genes espécie-específico, coagulase e resistência antimicrobiana por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Todas as amostras (28/28), pré-identificadas pela bioquímica, foram confirmadas pelo gene espécie-específico *AroA*, demonstrando amplificação com altura aproximada de 1.153pb (MARCOS *et al.*, 1999). Para o gene *CoA*, todas as amostras apresentaram amplificação. No entanto, as alturas aproximadas dos fragmentos se distinguem, sendo elas: 500pb, com 7,14%; 600pb, com 50%; 700pb, com 21,43% e 800pb, com 21,43% (Figura 5) (HOOKEY; RICHARDSON; COOKSON, 1998).

Figura 5: Eletroforese em gel de agarose demonstrando a amplificação dos genes da coagulase.



L – Marcador *ladder* 1kb; 5 – controle positivo (ATCC®27664) com 600pb; 37 – 700pb; 34 – 800bb; (-) (-) representa o controle negativo. Fonte: foto feita pela autora, 2023.

As amostras estudadas (28/28) não apresentaram presença de gene *mecA*,. Para o gene *bla_Z*, de resistência à penicilina, a positividade foi de 26 amostras dentre as 28, o que corresponde à 92,9%.

Os genes *tetK*, *tetM*, *vanA* e *vanB* apresentaram reações positivas sendo 10/28 (35,7%), 10/28 (35,7), 5/28 (17,9%) e 9/28 (32,1%), respectivamente. A tabela 3 demonstra a resistência fenotípica, bem como os genes cuja presença foi detectada em cada amostra.

Tabela 3: Resistência fenotípica aos antimicrobianos e genes de resistência detectados nas amostras

N° da amostra	Resistência aos antimicrobianos ¹	Genes de resistência ²
6	TRI, CLA, CLI, DOX, ERI, LVX, LNZ, MFX	<i>blaZ, tetK, tetM, vanA</i>
9	AZI, CIP, MIN, RIF, TET, CLA, DOX, ERI, MFX	<i>blaZ</i>
30	AZI, CIP, CLO, OXA, PEN, RIF, TET, TRI, CLA, CLI, DOX, ERI, LNZ, MFX	<i>blaZ, tetK</i>
31	AXI, CIP, GEN, TET, TRI, CTF, CLA, CLI, DOX, ERI, LVX, LNZ, MFX	<i>blaZ, vanA</i>
33	CLO, TRI, CLA, LVX, LNZ, MFX, SUT	<i>blaZ, tetM, vanA</i>
34	PEN, TET, TRI, CLA, CLI, DOX, ERI, LNZ, MFX	<i>blaZ, tetK, tetM, vanB</i>
35	MIN, PEN, RIF, TET, TRI, CLA, CLI, DOX, ERI, LVX, LNZ, MFX	<i>blaZ, tetK, vanB</i>
37	AZI, CIP, CLO, MIN, OXA, PEN, TET, CLA, CLI, DOX, ERI, LVX, LNZ, MFX	<i>blaZ, tetK, vanB</i>
38	AZI, CIP, CLO, MIN, PEN, RIF, TET, CLA, CLI, DOX, ERI, LNX, LNZ, MFX, SUT	<i>blaZ</i>
41	CLO, MIN, TRI, CLA, CLI, DOX, ERI, LNZ, MFX	<i>blaZ, tetM, vanA</i>
42	OXA, PEN, CTX, CLA, CLI, DOX, ERI	<i>blaZ, tetM, vanB</i>
43	AZI, CLI, GEN, MIN, OXA, PEN, RIF, TET, TRI, VAN, CTX, CLA, CLI, DOX, ERI, LVX, LNZ, MFX, SUT	-
48	AZI, CIP, CLO, MIN, OXA, PEN, TET, CLA, CLI, DOX, ERI, LVX, LNZ, MFX	<i>blaZ, tetK, vanB</i>
49	CLO, GEN, MIN, NIT, PEN, RIF, TET, CLA, CLI, DOX, LNZ	<i>blaZ, tetK, tetM</i>
52	AZI, PEN, TET, TRI, CLA, CLI, DOX, ERI, LNZ, MFX, SUT	<i>blaZ, tetK, tetM, vanB</i>
53	MIN, NIT, OXA, PEN, TET, TRI, CLA, CLI, DOX, ERI, LVX, LNZ, MFX	<i>blaZ, tetK, vanB</i>
55	AZI, CIP, CLO, GEN, MIN, PEN, RIF, TET, VAN, CTX, CLA, CLI, DOX, ERI, LVX, LNZ, MFX, SUT	<i>blaZ, tetM, vanB</i>
56	CLO, GEN, MIN, OXA, PEN, RIF, TET, TRI, CLA, CLI, DOZ, ERI, LVX, LNZ, MFX	<i>blaZ, tetK, vanA</i>
60	TRI, CTX, CLA, CLI, DOX, ERI	<i>blaZ</i>
61	CLO, MIN, NIT, RIF, TRI, VAN, CLA, CLI, DOX, ERI, LNZ, MFX, SUT	<i>blaZ</i>
62	CLO, RIF, TRI, CTX, CLA, CLI, DOX, ERI, LVX, LNZ, MFX, SUT	<i>blaZ, tetM</i>
63	AZI, CIP, MIN, PEN, TRI, CLA, CLI, DOX, ERI, LNZ, MFX, SUT	<i>blaZ</i>
64	MIN, RIF, TRI, CLA, CLI, DOX, ERI, LNZ, MFX, SUT	<i>blaZ, vanB</i>
65	MIN, RIF, TET, TRI, CLA, CLI, DOX, ERI, LVX, LNZ, MFX, SUT	<i>blaZ</i>
70	MIN, PEN, TRI, CTX, CLA, CLI, DOX, ERI, LVX, LNZ, MFX, SUT	<i>blaZ</i>
Pascoinha	AZI, MIN, TRI, VAN, CTX, CLA, LNZ	<i>blaZ, tetM, vanA</i>
21158	AZI, MIN, PEN, RIF, TET, CLA, CLI, DOX, LNZ	<i>blaZ</i>
V133	AZI, CIP, MIN, RIF, TET, TRI, VAN, CTX, CLA, CLI, DOX, ERI, LVX, LNZ, MFX	-

¹antimicrobianos; AZI, azitromicina; CIP, ciprofloxacina; CLA, claritromicina; CLI, clindamicina; CLO, cloranfenicol; CTX, cefotaxima; DOX, doxiciclina; ERI, eritromicina; GEN, gentamicina; LNZ, linezolida ; LVX, levofloxacina; MIN, minociclina; MFX, moxifloxacino; NIT, nitrofurantoína; OXA, oxacilina; PEN, penicilina G; RIF, rifampicina; SUT, trimetoprim-sulfametoxazol; TET, tetraciclina; TRI, trimetoprim; VAN, vancomicina.

²genes de resistência, *blaZ*, gene de resistência à penicilina; *tetK*, gene de resistência à tetraciclina K; *tetM*, gene de resistência à tetraciclina M; *vanA*, gene de resistência à vancomicina A; *vanB*, gene de resistência à vancomicina B. Fonte: criado pela autora, 2023.

DISCUSSÃO

A presença do gene *AroA* (1.153pb) foi observada em todas as amostras (28/28) testadas determinando que eram *Staphylococcus aureus*. O gene *CoA* também foi detectado em todas as amostras, apresentando fragmentos que variam de 500-800pb, sendo o tamanho de 600pb o mais frequente (14/28) (Tabela 4).

Tabela 4: Resultados dos produtos de PCR para o gene *CoA*

	Tamanho do amplicon (pb)				Total
	500	600	700	800	
N° de amostras	2	14	6	6	28
%	7,14	50	21,43	21,43	100

Fonte: criado pela autora, 2023.

Os fragmentos encontrados nesse estudo variam entre 500 e 800pb, o que se assemelham aos resultados encontrados por COELHO *et al.*, 2011, com uma variedade entre 540 a 900pb, em leite bovino. REINOSO *et al.*, 2008, também apresentam amplicons variando de 900pb a 500pb em amostras de leite bovino. Isso pode indicar que as cepas de 600pb têm se disseminado por diferentes países e se trata de uma estirpe capaz de colonizar e se alastrar pelo rebanho se tornando fontes de infecção, apresentando um perfil mais agressivo e persistente (MARQUES *et al.*, 2013; POLL, 2020).

Esse estudo apresenta uma taxa relativamente alta de resistência à penicilina (57,1%), a literatura evidencia grandes diferenças nos padrões de resistência à penicilina. YILMAZ; ASLANTAS (2017) apresentam uma resistência de 83.5% e mencionam ainda um estudo que avaliou a resistência de *S. aureus* a Penicilina G durante os anos de 2009 a 2014, revelando uma resistência de 100%, para patógenos humanos (RAGBETLI *et al.*, 2016). COSTA *et al.*, (2014) apresentam níveis altos de resistência à penicilina na Irlanda (71,4%), Inglaterra (57,3%), na Finlândia (52,1%) e nos Estados Unidos (50%), mas também retrata baixa resistência na Dinamarca (18,7%) e na Suécia (28,5%). A alta resistência encontrada na medicina veterinária pode ser justificada pelo uso indiscriminado e em subdosagens no controle de mastite. A resistência à oxacilina (25%) foi mais alta do que as taxas relatadas por YILMAZ; ASLANTAS (2017) (13,4%) e DURAN *et al.*(2012) (16,5), COSTA *et al.* (2014) não

encontrou resistência à oxacilina e ainda descreve sua ocorrência como incomum em algumas bacias leiteiras do Brasil. Já SILVEIRA-FILHO *et al.*(2005), verificaram uma resistência superior a 50% em Pernambuco. Não houve amplificação para o gene *mecA* nas amostras estudadas, apesar da alta resistência à oxacilina. A literatura sugere que a presença de outros genes, como *mecR1* e *mecl*, também pode ser responsável pela resistência à meticilina (AZHAR *et al.*, 2017).

O gene de resistência à penicilina, *blaZ*, foi encontrado em (15/16) 93,8% das amostras resistentes à PEN, (6/7) 85,7% das resistentes à OXA e (8/9) 88,9% para CTX, esses números condizem com a alta prevalência (98%) do gene descrita por QU *et al.*(2019) A alta prevalência associada à alta resistência aos β -lactâmicos isolados, reiteram a importância do uso consciente desses antimicrobianos, tão comumente utilizados para o tratamento de mastite.

O perfil de resistência à tetraciclina (64,3%) foi menor do que os achados (41,0%) de DURAN *et al.*, (2012) mas maior do que os achados (11,0%) de RAGBETLI *et al.* (2016) e de COSTA *et al.* (2014) que apresentam taxas inferiores a 20%. Condiz ainda com a resistência superior à 50% encontrada por SILVEIRA-FILHO *et al.*. (2005) O aumento da resistência à tetraciclina também pode estar associado ao uso rotineiro de formulações intramamárias para o tratamento da mastite.

A doxiclina (92,9%) e a minocilina (67,9%) também apresentaram altos índices de resistência. A resistência às tetraciclinas é mediada principalmente por quatro mecanismos diferentes entre estafilococos: bomba de efluxo ativa, proteção do sítio de ligação, modificação do fármaco e modificação do sítio de ligação (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010; YILMAZ; ASLANTAS, 2017). Neste estudo, o gene *tetM*, responsável pela proteção ribossomal, e o gene *tetK*, responsável pela bomba de efluxo, foram detectados em 35,7% dos isolados. O gene *tetK* foi detectado em (9/17) ou 52,9% das amostras resistentes à TET, (10/26) ou 38,5% das amostras resistentes à DOX e (6/19) ou 31,6% das MIN. Enquanto o *tetM* estava presente em (4/17) 23,5%, (8/26) 30,8% e (4/19) 21,1% das amostras resistentes à TET, DOX e MIN, respectivamente. Estudos similares indicam prevalências maiores de *tetM* em relação ao *tetK*, YILMAZ; ASLANTAS (2017) reportam 56,3% e 43,7% de resistência, enquanto DURAN *et al.* (2012), descreve prevalências de 63,2% para *tetM* e 36,8% para *tetK* e ainda QU *et al.* (2019) detectou prevalências de 31% e 33% para *tetK* e

tetM, respectivamente.

A resistência à linezolida detectada nesse estudo foi de 92,9%, muito mais alta do que a prevalência detectada por AZHAR *et al.*, (2017) 48,1% para MRSA e 29,2% para MSSA. Esse é um composto da classe das oxazolidinonas que atua inibindo a síntese de proteínas bacterianas ao se ligar à subunidade 50S do ribossomo, o que bloqueia a formação do complexo de iniciação. A linezolida é um dos principais antimicrobianos utilizados contra *S. aureus* e sua resistência tem sido relatada como crescente constantemente, apesar de se tratar de um fármaco recente, disponibilizado no mercado no ano 2000. Os números constatados por AZHAR *et al.*, (2017) em 2017 já eram sem precedentes, a resistência encontrada nesse estudo é ainda maior.

A nitrofurantoína demonstrou sensibilidade em 89,3% das amostras. A alta suscetibilidade aos antimicrobianos pode estar associada à proibição do uso de cloranfenicol e nitrofuranos para uso veterinário e na produção de alimentos, instituído pela Instrução Normativa nº 9 de 27/06/2003 do MAPA. Sugerindo que a ausência da pressão seletiva do uso contínuo de determinados princípios ativos, ou seja, o uso criterioso da antibioticoterapia, auxilia na preservação da eficácia dos antimicrobianos disponíveis para uso veterinário (BRASIL, 2003).

A prevalência da resistência à vancomicina encontrada nesse estudo foi de 17,9%, um número alto quando comparado aos resultados de AZHAR *et al.* (2017), que descreve a significativa resistência de 14,8% em MRSA e a baixa resistência de 3,1% encontrada em MSSA. A presença dos genes *vanA* e *vanB* foi detectada em (1/5) 20% das amostras resistentes, para ambos. Isso pode ser explicado pelo fato de, apesar do *vanA* ser o gene de resistência considerado mais importante, existem outros quatro genes de resistência possíveis que podem justificar os resultados negativos (AZHAR *et al.*, 2017).

CONCLUSÃO

As cepas de *S. aureus* estudadas apresentaram uma variabilidade marcante em sua sensibilidade aos antimicrobianos testados. Os antibióticos claritromicina, doxiciclina, linezolida e clindamicina mostraram as maiores taxas de resistência, com percentagens variando de 89,3% a 100%. Em contrapartida, antibióticos como

nitrofurantoína, gentamicina, vancomicina, oxacilina, cefotaxima, ciprofloxacino e trimetoprim-sulfametoxazol apresentaram menor resistência, com taxas variando de 10,7% a 39,3%. Ao avaliar individualmente cada cepa em relação às bases farmacológicas, observou-se que a nitrofurantoína demonstrou o maior perfil de sensibilidade, com 89,3%, seguida da gentamicina e vancomicina, com 82,1%. Por outro lado, a claritromicina apresentou o maior perfil de resistência, com 100% das amostras resistentes.

O gene CoA foi detectado em todas as amostras, com diferentes tamanhos de fragmentos, sendo o tamanho de 600pb o mais frequente. Surpreendentemente, não foi detectada a presença do gene mecA nas amostras, apesar da resistência observada à oxacilina. Isso sugere a possibilidade de outros mecanismos de resistência à meticilina, como a presença dos genes mecR1 e mecl. O gene de resistência à penicilina, blaZ, foi encontrado em uma alta proporção das amostras resistentes a penicilina, oxacilina e cefotaxima, reforçando a importância do uso responsável desses antibióticos no tratamento de infecções, especialmente a mastite. Os genes tetK e tetM, responsáveis pela resistência às tetraciclinas, foram detectados em algumas amostras, indicando a presença desses mecanismos de resistência. A resistência à linezolida e vancomicina foi observada em altas taxas, destacando a necessidade de vigilância contínua da resistência a esses antibióticos.

Os resultados deste estudo revelam um cenário complexo de resistência a antibióticos em cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de amostras de mastite. Essas descobertas ressaltam a importância da utilização criteriosa de antibióticos na medicina veterinária e a necessidade de estratégias eficazes de controle da resistência antimicrobiana. Além disso, enfatizam a importância da pesquisa contínua para entender os mecanismos de resistência e desenvolver abordagens terapêuticas mais eficazes no tratamento de infecções causadas por essas cepas resistentes, buscando melhorar as opções atuais para evitar o cenário de *S. aureus* não tratável.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOSTA, A. C. E. A. Mastites em ruminantes no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 36, n. 7, 2016., p. 565-573
- ARCANJO, A. H. M. *et al.* Programa dos seis pontos de controle da mastite em rebanhos leiteiros. **Global Science and Technology**, 10, n. 1, 2017.
- AVANZA, M. F. B. *et al.* Mastite bovina. **Revista científica eletônica de medicina veterinária**, n. 2, 2008.
- AZHAR, A. *et al.* Detection of high levels of resistance to linezolid and vancomycin in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Medical Microbiology**, 66, n. 9, 2017.
- BETTANIN, J. Frequência de Isolamentos dos Agentes Etiológicos da Mastite Bovina no Sudoeste Paranaense. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, Fortaleza, 13, n. 4, 2019., p. 440-451
- BRASIL. Instrução Normativa n. 9, de 27 junho de 2003. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2003.
- BRASIL. **Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 6: Detecção e identificação de bactérias de importância médica.** Brasília: Anvisa, v. 9, 2013.
- BRASIL. **Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 6: Detecção e identificação de bactérias de importância médica.** Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, v. 9, 2013. p. 150.
- BRASIL. Instrução Normativa n. 76, de 26 de novembro de 2018. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento., 2018., p. 9.
- BRCAS; EUCAST. Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos. **Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing**, 2023. Disponível em: <https://brcast.org.br/>.
- CALIMAN, M. D. F.; GASPAROTTO, P. H. G.; RIBEIRO, L. F. PRINCIPAIS IMPACTOS DA MASTITE BOVINA: REVISÃO DE LITERATURA. **Getec**, 12, n. 37, 2023., p. 91-102
- CAMERON, M. *et al.* Evaluation of selective dry cow treatment following on-farm culture: Milk yield and somatic cell count in the subsequent lactation. **J. Dairy Sci.**, 98, 2015., p. 2427-2436
- CARDOSO, H. F. T.; CARMO, L. S.; SILVA, N. Detecção da toxina-1 da síndrome do choque tóxico em amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, Belo Horizonte, 52, n. 1, 2000.
- CDC. **Antibiotic resistance threats in the United States**. [S.l.]: Centers for Disease Control and Prevention, 2013.
- CLSI. Performance Standard for Antimicrobial Susceptibility Testing, M100-S29. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2019. Disponível em: <https://clsi.org/>.
- COELHO, S. D. M. D. O. *et al.* Profile of virulence factors of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of dairy science**, 94, n. 7, 2011., p. 3305-3310
- COSER, S. M.; LOPES, M. A.; COSTA, G. M. Mastite bovina: controle e. **Boletim Técnico**, Lavras, MG, n. 93, 2012., p. 1-30
- COSTA, G. M. D. *et al.* Resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite em bovinos leiteiros de Minas Gerais, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, 80, n. 3, 2013., p. 297-302
- COSTA, G. M. E. A. Resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite em bovinos leiteiros de Minas Gerais, Brasil. **Arq. Inst. Biol**, 80, 2014., p. 297-302
- COSTA, P. D.; DIAS, R. S. Ocorrência de Linhagens Enterotoxigênicas de *Staphylococcus* spp. em Leite e Derivados Envolvidos em Doenças Transmitidas por Alimentos. **Periódico Científico Do Núcleo de Biociências**, 3, n. 5, 2013., p. 32-38
- DURAN, N. *et al.* Antibiotic resistance genes & susceptibility patterns in *Staphylococci*. **Indian Journal of Medical Research**, 135, n. 3, 2012., p. 389-396
- EMBRAPA. **Anuário Leite**. Embrapa Gado de Leite. [S.l.], p. 116. 2022.

FONSECA, M. E. B. D. *et al.* Mastite bovina: Revisão. **PUBVET**, 15, n. 2, 2021., p. 1-18

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. D. S.; PUPO, M. T. ANTIBIÓTICOS: IMPORTÂNCIA TERAPÊUTICA E PERSPECTIVAS PARA A DESCOBERTA E DESENVOLVIMENTO DE NOVOS AGENTES. **Química Nova**, 33, n. 3, 2010., p. 667-679

HILLERTON, E.; BOOTH, J. The Five-Point Mastitis Control Plan-A Revisory Tutorial. **National Mastitis Council**, Washington, p. 3-19, 2018.

HOOKEY, J. V.; RICHARDSON, J. F.; COOKSON, B. D. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on PCR restriction fragment length polymorphism and DNA sequence analysis of the coagulase gene. **Journal of Clinical Microbiology**, 36, 1998., p. 1083-1089

JESUS, R. A.; COUTINHO, C. A. Uso de medicamentos homeopáticos para o tratamento da mastite bovina: Revisão. **PUBVET**, 12, n. 3, 2018., p. 1-10

JUSKO, M. *et al.* Staphylococcal proteases aid in evasion of the human complement system. **J. Innate Immun**, 6, 2014., p. 31-46

KONEMAN, E. W. *et al.* **Diagnóstico Microbiológico – Texto e atlas colorido**. 5. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001. p. 1465.

KONG, C.; NEOH, H.; NATHAN, S. Targeting *Staphylococcus aureus* Toxins: A Potential form of Anti-Virulence Therapy. **Toxins**, 8, n. 3, 2016., p. 72

KREWER, C. C. E. A. Etiology, antimicrobial susceptibility profile of *Staphylococcus* spp. and risk factors associated with bovine mastitis in the states of Bahia and Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 33, n. 5, 2013., p. 601-606

LANGONI, H. *et al.* Utilização da enrofloxacina (Baytril®) no tratamento da mastite bovina estafilocócica. **Ciência Rural**, 30, n. 1, 2000., p. 167-170

LANGONI, H. Qualidade do leite: utopia sem um programa sério de monitoramento da ocorrência de mastite bovina. **Pesq. Vet. Bras**, 33, 2013., p. 620-626

LANGONI, H. E. A. Considerações sobre o tratamento das mastites. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 37, n. 11, 2017., p. 1261-1269

LEMONS, E. T. **Sistema de monitoramento de leite para detecção de mastite**. [S.l.]: Universidade de Passo Fundo, 2018.

LOPES, B. C.; MANZI, M. P.; LANGONI, H. Etiologia das mastites: pesquisa de micro-organismos da classe Mollicutes. **Veterinária e Zootecnia**, 25, n. 2, 2018.

LOWY, F. D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **The Journal of Clinical Investigation**, 111, n. 9, May 2003., p. 1265-1273

MAHMOUDI, H. *et al.* Molecular analysis of the coagulase gene in clinical and nasal carrier isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by restriction fragment length polymorphism. **Journal of global antimicrobial resistance**, 8, 2017., p. 41-45

MAIOCHI, R.; RODRIGUES, R.; & WOSIACKI, S. Principais métodos de detecção de mastites clínicas e subclínicas de bovinos. **Enciclopédia Biosfera**, 16, n. 29, 2019., p. 1237-1251

MARCOS, J. Y. *et al.* pid identification and typing of *Staphylococcus aureus* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *aroA* gene. **Journal of Clinical Microbiology**, 37, 1999., p. 570-574

MARQUES, V. F. *et al.* Análise fenotípica e genotípica da virulência de *Staphylococcus* spp. e de sua dispersão clonal como contribuição ao estudo da mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 33, n. 2, 2013., p. 161-170

MASSOTE, V. P. *et al.* Diagnóstico e controle de mastite bovina: uma revisão de literatura. **Revista Agroveterinária Do Sul de Minas**, 1, n. 1, 2019., p. 41-54

MCADOW, M. *et al.* Coagulases as determinants of protective immune responses against *Staphylococcus aureus*. **Infect. Immun**, 80, 2012., p. 3389-3398

MEYER, N. S. *et al.* Microrganismos isolados de quartos mamários com mastite sub-clínica em unidades de produção leiteira de Pelotas/RS. **Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal**, 2013.

MOUSSALLEM, B. C.; KURY, C. M. H.; MEDINA-ACOSTA, E. Detecção dos genes *mecA* e *femA*, marcadores moleculares de resistência a metilina, em *Staphylococcus* spp. isolados de pacientes admitidos em uma Unidade Neonatal de Tratamento Intensivo. **Revista Científica da FMC**, 2, n. 2,

2007.

- MUSHTAQ, S.; AL., E. Bovine mastitis: an appraisal of its alternative herbal cure. **Microbial Pathogenesis**, Londres, 114, 2018., p. 357-361
- NETO, F. P.; ZAPPA, V. Mastite em vacas leiteiras - revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, 16, 2011., p. 1679-7353
- NOGUEIRA, F. R. B. *et al.* ermografia infravermelha: uma ferramenta para auxiliar no diagnóstico e prognóstico de mastite em ovelha. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, 35, n. 3, 2013., p. 289-297
- OLIVEIRA, D.; BORGES, A.; SIMÕES, M. Staphylococcus aureus Toxins and Their Molecular Activity in Infectious Diseases. **Toxins**, 10, n. 6, 2018., p. 252
- OLIVEIRA, G. C. *et al.* Perfil microbiológico de Streptococcus spp. Como agentes causadores de mastites clínicas em diversas regiões do Brasil. **Revista de Educação Continuada Em Medicina Veterinária e Zootecnia Do CRMV-SP**, 14, n. 3, 2016., p. 74
- OLIVEIRA, S. C. C. *et al.* Extratos de plantas brasileiras no controle da bactéria Staphylococcus aureus causadora da mastite contagiosa em bovinos leiteiros. **Revista Tecnológica**, 27, n. 1, 2019., p. 48-58
- OLIVEIRA, S. J. **Microbiologia Veterinária: Guia bacteriológico prático**. 2. ed. Canoas: Ulbra, 2000. p. 237.
- PEREIRA, C. T. M. *et al.* Microbiology quality, detection of enterotoxin genes and antimicrobial resistance of Staphylococcus aureus isolated from milk and Coalho cheese. **Semina: Ciências Agrárias**, 39, n. 5, 2018., p. 1957-1968
- POLL, P. S. E. M. **GENOTIPIFICAÇÃO DE Staphylococcus aureus ISOLADOS DE QUEIJO MINAS FRESCAL E LEITE DE BOVINOS COM MASTITE SUBCLINICA**. Universidade de Brasília. Brasília, p. 107. 2020.
- POLLITT, E. J. *et al.* Staphylococcus aureus infection dynamics. **PLoS pathogens**, 14, n. 6, 2018., p. e1007112
- QU, Y. *et al.* Molecular epidemiology and distribution of antimicrobial resistance genes of Staphylococcus species isolated from Chinese dairy cows with clinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, 102, n. 2, 2019., p. 1571–1583
- QUINN, P. J. *et al.* **Clinical Veterinary Microbiology**. Londres: Wolfe-Mosby, 1994. p. 648.
- QUINN, P. J. *et al.* **Veterinary Microbiology and Microbial Disease**. 2. ed. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2011. p. 928.
- RAGBETLI, C. *et al.* Evaluation of Antimicrobial Resistance in Staphylococcus aureus Isolates by Years. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, 2016, 2016.
- RAMOS, F. S. *et al.* Importância do diagnóstico da mastite subclínica e seus impactos econômicos em propriedades leiteiras—revisão de literatura. **Faculdade de Ciências da Saúde de Unai - MG**, 2017., p. 44
- REINOSO, E. B. *et al.* Genotyping of Staphylococcus aureus isolated from humans, bovine subclinical mastitis and food samples in Argentina. **Microbiological Research**, 163, n. 3, 2008., p. 314-322
- REINOSO, E. B. *et al.* Genotyping of Staphylococcus aureus isolated from humans, bovine subclinical mastitis and food samples in Argentina. **Microbiological Research**, 163, n. 3, 2008., p. 314-322
- REIS, I. J. D.; AL., E. Identificação dos principais agentes causadores da mastite clínica e avaliação dos perfis de sensibilidade e resistência. **Encontro Nacional de Patologia Clínica Veterinária - ENPCV**, 16, n. 3, 2017. Disponível em: <http://publicacoes.unifran.br/index.php/investigacao/article/view/1968>.
- RIBEIRO, M. G.; LANGONI, H.; DOMINGUES, P. F. & P. J. C. F. Mastite em animais domésticos. In: J.; RIBEIRO, M. G.; PAES **Doenças Infecciosas em Animais de Produção e de Companhia**. **Roca**. Rio de Janeiro: ROCA, 2016., p. 1155-1205.
- SAAB, A. B. *et al.* revalência e etiologia da mastite bovina na região de Nova Tebas, Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, 35, n. 2, 2014., p. 835-843
- SANTOS, M. V. D. *et al.* **Controle da mastite e qualidade do leite - Desafios e soluções**. 1. ed. Pirassununga: [s.n.], 2019. p. 301. ISBN 978-85-915913-1-2.
- SANTOS, W. B. R. Mastite bovina: uma revisão. **Colloquium Agrariae**, São Paulo, 13, 2017., p. 301-

- SANTOS, W. B. R. Mastite bovina: Uma revisão. **Colloquium Agrariae**, São Paulo, 13, 2017., p. 301-314
- SCHVARZ, D. W.; SANTOS, J. M. G. Mastite bovina em rebanhos leiteiros: Ocorrência e métodos de controle e prevenção. **Revista Em Agronegócio e Meio Ambiente**, 5, n. 3, 2012., p. 453-473
- SHALLCROSS, L. *et al.* The role of the Pantón-Valentine leucocidin toxin in staphylococcal disease: a systematic review and meta-analysis. **Lancet Infect Dis**, 13, n. 1, 2013., p. 43-54
- SHARUN, K. E. A. Advances in therapeutic and management approaches of bovine mastitis: a comprehensive review. **Veterinary Quarterly**, 41, n. 1, 2021., p. 107-136
- SHUKKEN, Y. E. A. The “other” Gram-negative bacteria in mastitis, Klebsiella, Serratia, and more. **Veterinary Clinics Food Animal Practice**, 28, 2012., p. 239-256
- SILVEIRA-FILHO, V. M. *et al.* Molecular epidemiologic study of Staphylococcus. **Revista NAPGAMA**, 8, n. 1, 2005., p. 12-17
- SOMPOL, N. *et al.* Prevalence and Genetic Profiles of Staphylococcus aureus Isolated from Milk in Mastitic Dairy Cows Based on Conventional and Multiplex PCR Assays in Khon Kaen Province, Thailand. **Pawarun Agriculture Journal**, 15, n. 1, 2018., p. 278-288
- SOUZA, K. S. S. *et al.* Resistência a antimicrobianos de bactérias isoladas de vacas leiteiras com mastite subclínica. **Caderno de Ciências Agrárias**, Belo Horizonte, 8, n. 2, 2016., p. 83-89
- TONG, S.; CHEN, L.; FOWLER, V. Colonization, pathogenicity, host susceptibility, and therapeutics for Staphylococcus aureus: what is the clinical relevance? **Seminars in Immunopathology**, 34, n. 2, 2012., p. 185-200
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre: ARTMED, 2008. p. 894.
- VITORINO, D. H. L. C. Eschechiria coli produtora da toxina shiga em bovinos: revisão. **Higiene Alimentar**, Londrina, 32, 2018., p. 57-61
- YILMAZ, E. S.; ASLANTAS, Ö. Antimicrobial resistance and underlying mechanisms in Staphylococcus aureus isolates. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, 10, n. 11, Nov 2017., p. 1059-1064
- ZAPOTOCZNA, M.; O'NEILL, E.; O'GARA, J. P. Untangling the diverse and redundant mechanisms of Staphylococcus aureus biofilm formation. **PLoS pathogens**, 12, n. 7, 2016.
- ZECCONI, A.; SCALI, F. Staphylococcus aureus virulence factors in evasion from innate immune defenses in human and animal diseases. **Immunol. Lett.**, 150, 2013., p. 12-22