EVELINE ZUNIGA

Resistência antimicrobiana de *Staphylococcus* spp. isolados de mastite clínica e subclínica bovina: análise fenotípica, detecção de genes e relação com presença de genes codificadores de adesinas e biofilme

São Paulo

2017

EVELINE ZUNIGA

Resistência antimicrobiana de *Staphylococcus* spp. isolados de mastite clínica e subclínica bovina: análise fenotípica, detecção de genes e relação com presença de genes codificadores de adesinas e biofilme

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:
Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:
Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:
Prof. Dr. Nilson Roberti Benites

De acordo:_____
Orientador

São Paulo
2017

Obs: A versão original encontra-se disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

VERSÃO CORRIGIDA

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3512
FMVZ

Zuniga, Eveline
Resistência antimicrobiana de *Staphylococcus* spp. isolados de mastite clínica e subclínica bovina: análise fenotípica, detecção de genes e relação com presença de genes codificadores de adesinas e biofilme. / Eveline Zuniga. -- 2017.
102 f.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2017.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Nilson Roberti Benites.

1. Mastite bovina. 2. *Staphylococcus* spp. 3. Adesinas. 4. Biofilme. 5. Resistência antimicrobiana. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Resistência Antimicrobiana avaliada pelos métodos fenotípico e genotípico por intermédio da Detecção e Expressão de genes em Staphylococcus spp. isolados de mastite clínica e subclínica bovina.", protocolada sob o CEUA nº 8515270415, sob a responsabilidade de **Nilson Roberti Benites** *e equipe; Eveline Zuniga* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 17/06/2015.

We certify that the proposal "Antimicrobial Resistance evaluated by phenotypic and genotypic methods through the detection and gene expression in Staphylococcus spp. isolated from clinical and subclinical bovine mastitis ", utilizing 300 Bovines (300 females), protocol number CEUA 8515270415, under the responsibility of **Nilson Roberti Benites** *and team; Eveline Zuniga* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 06/17/2015.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 15/06/1 a 15/06/1 Área: Laboratório de Bacteriologia E Micologia

Origem:	Animais provenientes de estabelecimentos comerciais						
Espécie:	Bovinos	sexo:	Fêmeas	idade:	a	N:	300
Linhagem:	holandês e mestiços			Peso:	a		

Resumo: Este estudo irá possibilitar um maior conhecimento do perfil de resistência antimicrobiana aos Staphylococcus spp. isolados em casos de mastite bovina (clínica e subclínica), por intermédio do perfil fenotípico (antibiograma) e genotípico (detecção e expressão de genes pela reação em cadeia pela polimerase PCR).

Local do experimento:

São Paulo, 11 de janeiro de 2017

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: ZUNIGA, Eveline.

Título: Resistência antimicrobiana de *Staphylococcus* spp. isolados de mastite clínica e subclínica bovina: análise fenotípica, detecção de genes e relação com presença de genes codificadores de adesinas e biofilme

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do titulo de Doutor em Ciências

Data: _____/_____/_____

Banca Examinadora

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

DEDICATÓRIA

Aos meus Amados

"Pai e Marido"

Magníficos incentivadores

...

AGRADECIMENTOS

Sem dúvida alguma o maior agradecimento é para meu querido Amigo, Deus! Aquele que me auxilia para seguir o melhor caminho e me transforma todos os dias.

À FAPESP pelo apoio financeiro ao projeto de pesquisa N° 15/14209-4.

Ao meu orientador, Nilson Benites pela oportunidade e ensinamentos.

À minha co-orientadora Aline Dahora por todo carinho e ajuda.

À minha amiga, de trabalho e vida, Priscila, por toda confiança.

À "Biga" por toda ajuda, fofura e palavras de incentivo.

À Sheila e Sueli por todo auxílio com o "temido" mundo do sequenciamento genético...

À Camila, funcionária da Biblioteca pela atenção.

Aos funcionários do VPS, principalmente Danival, Carol e Cris, por todo auxílio, carinho e "cafézinhos" matinais.

Aos professores Paulo Brandão e Fábio Gregory pelos ensinamentos nesses sete anos de pós-graduação.

Aos produtores rurais, pela oportunidade, amizade e confiança.

Aos meus amigos: Ju, Amália ,Herbert, Fernanda, Monize ,Sol e Bru, pela ajuda física, mental e espiritual. Pelas palavras de carinho e consolo sempre que precisei... Amo vocês!

Aos meus amados pais pelo amor e apoio nesses 33 anos de vida.

Às minhas irmãs e sobrinhos que tanto amo.

Aos meus filhos de pelos e penas, por me fazerem sentir tão amada! Os amo sem limites podem acreditar... (Nescau, Peludo, Pitchuco, Base, Nina).

Ao Homem da minha vida, por tantos anos de incentivo, carinho e Amor infinito nesses 13 anos juntos! NEOQUEAV!

E por fim, às estrelas deste trabalho, às minhas amadas mimosas...

Cows are amongst the gentlest of breathing creatures; none show more passionate tenderness to their young when deprived of them; and, in short, I am not ashamed to profess a deep love for these quiet creatures.

Thomas de Quincey

RESUMO

ZUNIGA, E. **Resistência antimicrobiana de *Staphylococcus* spp. isolados de mastite clínica e subclínica bovina: análise fenotípica, detecção de genes e relação com presença de genes codificadores de adesinas e biofilme.** [Antimicrobial resistance evaluated by phenotypic and genotypic methods through the detection and gene expression in *Staphylococcus spp*. isolated from clinical and subclinical bovine mastitis]. 2017. 102 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

A mastite representa um grande desafio na pecuária leiteira, visto que é uma das afecções que mais acometem o rebanho bovino ocasionando grande impacto econômico. As bactérias são importantes agentes associados à enfermidade, sendo que as mais comumente encontradas são as do gênero *Staphylococcus*, associadas tanto às manifestações clínicas quanto subclínicas. A terapia antimicrobiana é usualmente requerida como tratamento, auxiliando as defesas do animal para a eliminação do agente invasor, sendo assim, de suma importância monitorar a sensibilidade dos patógenos aos antimicrobianos. Visto que a resistência aos medicamentos utilizados tem se tornado frequente, há a necessidade de estudos mais abrangentes sobre o assunto. Desta forma, o presente estudo avaliou 300 isolados de *Staphylococcus* provenientes de amostras de leite de bovinos com mastite clínica e/ou subclínica de propriedades de exploração leiteira. A espécie mais detectada nas análises foi *S. aureus,* e dentre os genes que codificam para adesinas e biofilmes os mais frequentes foram (*eno, fib e fnb*A) e (*bap, ica*A, *ica*D). A combinação mais frequente no tocante às adesinas foi *eno-fib-fnbA*, e para os biofilmes foram *bap* e *bap-icaD.* Os maiores índices de resistência foram verificados para os antimicrobianos betalactâmicos (amoxicilina, ampicilina e penicilina). Identificou-se as maiores frequências de sensibilidade para cefalotina, seguida pela oxacilina e gentamicina, e não foi detectada relação de concordância da oxacilina com os betalactâmicos. Avaliou-se a concentração mínima inibitória (MIC) para ampicilina, gentamicina, oxacilina e penicilina, para todas as cepas resistentes no antibiograma. Posteriormente, investigou-se os genes responsáveis pela codificação de resistência antimicrobiana, com os genes f*em*A e *fem*B sendo os mais comuns, porém o gene *fem*A não foi detectado em todas as cepas de *S. aureus*. Os genes *mec*A e *bla*Z foram identificados, porém em baixa frequência, e o homólogo de *mec*A, o *mec*A_{LGA251}, somente em duas cepas. As informações obtidas podem

ajudar em diferentes aspectos acerca dos perfis dos microrganismos no tocante aos fatores de virulência dos mesmos, permitindo novas abordagens relativas a terapias e medidas de prevenção à mastite.

Palavras-chave: Mastite bovina, *Staphylococcus* spp., Adesinas, Biofilme, Resistência Antimicrobiana.

ABSTRACT

ZUNIGA, E. **Antimicrobial resistance evaluated by phenotypic and genotypic methods through the detection and gene expression in *Staphylococcus spp.* isolated from clinical and subclinical bovine mastitis.** [Resistência antimicrobiana de *Staphylococcus* spp. isolados de mastite clínica e subclínica bovina: análise fenotípica, detecção de genes e relação com presença de genes codificadores de adesinas e biofilme]. 2017. 102 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Mastitis represents a major challenge in dairy farming, since it is one of the affections that most impact the cattle herd, causing great economic distress. Bacteria are important agents associated with the disease, and the most commonly found are those of the genus *Staphylococcus*, associated with both clinical and subclinical manifestations. Antimicrobial therapy is usually required as a treatment, assisting the animal's defenses to eliminate the invading agent, and it is therefore of paramount importance to monitor the susceptibility of pathogens to antimicrobials. Since resistance to drugs commonly used has become frequent, there is a need for more comprehensive studies on the subject. Thus, the present study evaluated 300 isolates of *Staphylococcus* from samples of dairy cattle from dairy farms. The most prevalent species in the analyses were *S. aureus*, and among the genes coding for adhesins and biofilms the most frequent combinations were (*eno, fib* and *fnb*A) and (*bap, ica*A, *ica*D). The most frequent combination for adhesins was *eno-fib-fnb*A, and for biofilms they were *bap* and *bap-ica*D. The highest resistance indices were verified for betalactam antibiotics (amoxicillin, ampicillin and penicillin). The highest frequencies of sensitivity were identified for cephalothin, followed by oxacillin and gentamicin, and no concordance relationship was found between oxacillin and betalactam. Minimum inhibitory concentration (MIC) for ampicillin, gentamicin, oxacillin and penicillin were performed for all strains resistant to the antibiogram. Subsequently, the genes responsible for the encoding of antimicrobial resistance were investigated, with the *fem*A and *fem*B genes being the most common, but the *fem*A gene was not detected in all strains of *S. aureus*. The *mec*A and *bla*Z genes were identified, but at low frequency, and the *mec*A homolog, $mecA_{LGA251}$, was only found in two strains. The information obtained can help in different aspects about the

microorganisms' profiles regarding their virulence factors, allowing new approaches to therapies and mastitis prevention measures.

Key words: Bovine mastitis, *Staphylococcus* spp., Adhesins, Biofilm, Antimicrobial resistance.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Frequência de ocorrência (em número absoluto e porcentagem) das espécies de SCP e SCN isoladas de amostras de mastite clínica e subclínica bovina pelo método fenotípico e genotípico – 2017 48

Tabela 2 - Frequência de ocorrência (em número absoluto e porcentagem) das espécies de *Staphylococcus* isoladas de amostras de leite oriundas de mastite clínica e subclínica bovina – 2017 49

Tabela 3 - Frequência de ocorrência (em número absoluto) das espécies de *Staphylococcus* isoladas de mastite clínica e subclínica bovina nas 11 propriedades avaliadas – 2017 50

Tabela 4 - Classificação (em número absoluto e porcentagem) das estirpes de *Staphylococcus* isoladas de bovinos com mastite clínica de acordo com a presença de genes codificadores de adesinas, considerando um total de 57 isolados.– 2017 51

Tabela 5 - Classificação (em número absoluto e porcentagem) das estirpes de *Staphylococcus* isoladas de bovinos com mastite subclínica de acordo com a presença de genes codificadores de adesinas, considerando um total de 243 isolados.– 2017 52

Tabela 6 - Combinações possíveis entre os genes codificadores de adesinas em 300 *Staphylococcus* spp. isolados de mastite clínica e subclínica bovina. – 2017 55

Tabela 7 - Classificação (em número absoluto e porcentagem) das estirpes de *Staphylococcus* isoladas de mastite clínica bovina de acordo com a presença de genes de biofilme, considerando um total de 57 isolados.– 2017 57

Tabela 8 - Classificação (em número absoluto e porcentagem) das estirpes de *Staphylococcus* isoladas de mastite subclínica bovina de acordo com a presença de genes de biofilme, considerando um total de 243 isolados.– 2017 57

Tabela 9 - Combinações possíveis entre os genes codificadores de biofilmes em 300 *Staphylococcus* spp. isolados de mastite clínica e subclínica bovina. – 2017 60
Tabela 10 - Classificação (em número absoluto e porcentagem) das estirpes de *Staphylococcus* isoladas de mastite clínica bovina de acordo com a sensibilidade *in vitro* aos antimicrobianos testados, considerando um total de 57 isolados. – 2017 63
Tabela 11 - Classificação (em número absoluto e porcentagem) das estirpes de *Staphylococcus* isoladas de mastite subclínica bovina de acordo com a sensibilidade *in vitro* aos antimicrobianos testados, considerando um total de 243 isolados.– 2017 63
Tabela 12 - Relação de concordância, índice Kappa e Pabak entre os antimicrobianos pertencentes ao grupo dos betalactâmicos com a oxacilina, número absoluto e porcentagem de sensíveis e resistentes ao antibiograma das 300 cepas de *Staphylococcus* spp. oriundas de mastite clínica e subclínica bovina. – 2017 64
Tabela 13 - Distribuição das MICs de Amoxicilina e Ampicilina pela técnica de E-test® 67
Tabela 14 - Distribuição das MICs de Gentamicina pela técnica de E-test® 67
Tabela 15 - Distribuição das MICs de Oxacilina pela técnica de E-test® 68
Tabela 16 - Distribuição das MICs de Penicilina pela técnica de E-test®. 68
Tabela 17 - Sensibilidade in vitro dos *Staphylococcus* spp. obtidos de mastite bovina que se mostraram resistentes ao antibiograma e ao MIC, número absoluto, concentrações e intervalos correspondentes - 2017 69
Tabela 18 - Classificação (em número absoluto e porcentagem) das estirpes de *Staphylococcus* isoladas de mastite clínica bovina de acordo com a presença de genes de resistência aos antimicrobianos, considerando um total de 57 isolados.– 2017 71
Tabela 19 - Classificação (em número absoluto e porcentagem) das estirpes de *Staphylococcus* isoladas de mastite subclínica bovina de acordo com a presença de genes de resistência, considerando um total de 243 isolados.– 2017 72

Tabela 20 - Classificação (em número absoluto e porcentagem) das 300 estirpes de *Staphylococcus* spp. isoladas de mastite clínica e subclínica bovina de acordo com a presença ou ausência do gene *fem*A – 2017 73
Tabela 21 - Relação entre a presença do gene e a resistência demonstrada por intermédio do antibiograma das 300 cepas de *Staphylococcus* spp. isolados de mastite clínica e subclínica bovina. – 2017 74
Tabela 22 - Combinações dos genes de resistência (dois a dois), a concordância entre os mesmos e a relação com cada antimicrobiano pesquisado nas cepas que se apresentaram resistentes ao antibiograma de *Staphylococcus* spp. isolados de mastite clínica e subclínica bovina. – 2017 79
Tabela 23 - Combinações dos genes de resistência (dois a dois), concordância pelos índices Kappa e Pabak, e a relação com cada antimicrobiano pesquisado nas cepas que se apresentaram resistentes ao antibiograma de Staphylococcus spp. isolados de mastite clínica e subclínica bovina. – 2017 80
Tabela 24 - Combinações possíveis entre os genes que conferem resistência antimicrobiana em 300 *Staphylococcus* spp. isolados de mastite clínica e subclínica bovina. – 2017 81

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Organograma representando o delineamento experimental do estudo 35

Quadro 1 - Sequências das bases, tamanho dos produtos amplificados e referências dos genes codificadores de adesinas e biofilme 41

Quadro 2 - Sequências das bases, tamanho dos produtos amplificados e referências dos genes relacionados à resistência antimicrobiana e controle endógeno..... 43

Quadro 3 - Caracterização das coletas relativas às amostras de leite proveniente de mastite subclínica (quantidade de animais avaliados, de glândulas mamárias, amostras coletadas com e sem crescimento bacteriano e microrganismos isolados)..... 46

SUMÁRIO

1 **INTRODUÇÃO** 18

2 **REVISÃO DE LITERATURA**..... 19

2.1 PRODUÇÃO LEITEIRA E A MASTITE..... 19

2.2 MASTITE POR *Staphylococcus* spp.....21

2.2.1 ***Staphylococcus* coagulase positivas (SCP)** 23

2.2.2 ***Staphylococcus* coagulase negativas (SCN)** 24

2.2.3 **Identificação das espécies** 25

2.3 FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Staphylococcus* spp.....25

2.3.1 ***Microbial surface components recognising adhesive matrix molecules* (MSCRAMM)**..... 26

2.3.2 **Biofilmes** 28

2.4 SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS 29

3 **OBJETIVOS** 33

4 **MATERIAIS E MÉTODOS** 34

4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL..... 34

4.1.1 **Descrição das propriedades leiteiras** 36

4.1.2 **Amostras de leite**..... 36

4.1.3 **Isolamento e identificação de *Staphylococcus* spp.**.....37

4.1.4 **Testes de sensibilidade *in vitro* das estirpes de *Staphylococcus* spp. frente aos antimicrobianos**..... 37

4.1.5 **Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) dos isolados resistentes pelo método de E-test™**..... 38

4.1.6 **Extração de DNA** 39

4.1.7 **Detecção do gene *rpob***.....39

4.1.8 **Sequenciamento genético**.....39

4.1.9 **Pesquisa de genes codificadores de adesinas e biofilme em cepas de *Staphylococcus* spp. utilizando a reação em cadeia da polimerase**.....41

4.1.9 **Análise estatística**.....44

5 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**.....45

5.1 DESCRIÇÃO DOS DADOS.....45

5.2 IDENTIFICAÇÃO E COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS FENOTÍPICO E GENOTÍPICO DAS ESPÉCIES DE *Staphylococcus* spp. ISOLADAS.....47

5.3 PESQUISA DO CONTROLE ENDÓGENO E DOS GENES CODIFICADORES DE ADESINAS NAS ESTIRPES DE *Staphylococcus* spp. UTILIZANDO-SE A REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE.....50

5.4 PESQUISA DE GENES CODIFICADORES DE BIOFILME EM ESTIRPES DE *Staphylococcus* spp. UTILIZANDO-SE A REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE56

5.5 AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE *IN VITRO* DAS ESTIRPES DE *Staphylococcus* spp. ISOLADAS FRENTE AOS ANTIMICROBIANOS.....62

5.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (MIC) AOS ANTIMICROBIANOS PELO MÉTODO DE E-TEST REFERENTES AOS ISOLADOS QUE APRESENTARAM RESISTÊNCIA NOS ANTIBIOGRAMAS.....66

5.7 PESQUISA DE GENES QUE CONFEREM RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM ESTIRPES DE *Staphylococcus* spp. UTILIZANDO-SE A REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE.....70

6 **CONCLUSÕES**.....83

REFERÊNCIAS.....85

1 INTRODUÇÃO

Um dos principais problemas no universo da pecuária leiteira, responsável por perdas econômicas consideráveis, é a mastite, doença caracterizada por um processo inflamatório na glândula mamária e que interfere diretamente na produção, tanto em qualidade quanto em quantidade de leite. A etiologia é complexa e multifatorial, mas a mastite infecciosa é considerada a mais importante devido aos aspectos econômicos e de saúde pública a ela relacionados, tendo em vista a veiculação de microrganismos mediante o consumo de leite. As bactérias mais comumente isoladas são as do gênero *Staphylococcus* associadas às formas clínicas e/ou subclínicas da afecção.

O estudo dos fatores envolvidos na patogênese das mastites, sejam clínicas ou subclínicas por *Staphylococcus* spp., é de fundamental importância, pois permite melhor orientação de medidas de controle e tratamento. Dentre os fatores, devem ser considerados os elementos intrínsecos aos patógenos envolvidos no desenvolvimento da enfermidade, cada qual com suas características particulares, diferentes fatores de virulência representados por componentes estruturais, como adesinas, bem como pela capacidade de produzir toxinas, enzimas e biofilmes.

Tendo em vista a relevância do gênero *Staphylococcus* como agente causador de mastite, são necessários estudos mais abrangentes acerca da resistência do mesmo aos antimicrobianos, particularmente aqueles comumente utilizados para o tratamento das mastites bovina clínica e subclínica. Embora as características de resistência aos antimicrobianos do grupo *Staphylococcus* coagulase positiva sejam mais frequentemente estudadas, sobretudo devido à presença de *Staphylococcus aureus*, há crescente importância no conhecimento acerca do perfil de resistência ao grupo dos *Staphylococcus* coagulase negativa (KREDIET et. al., 2001). A utilização de métodos fenotípicos (avaliação *in vitro* da sensibilidade aos antimicrobianos) e genotípicos (técnicas moleculares para detecção de genes) com o intuito de identificar o perfil de resistência dos *Staphylococcus* pode auxiliar no desenvolvimento de estratégias de controle da disseminação de cepas resistentes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PRODUÇÃO LEITEIRA E A MASTITE

A pecuária leiteira é extremamente importante para a economia agrária do país, com papel de destaque na geração de empregos em certas regiões, bem como na produção de alimentos. Conforme Zoccal (2017) apesar de uma queda em 2016, o Brasil hoje é o 6º maior produtor do mundo, com produção de cerca de 35 milhões de leite por ano. No período de 2000 a 2015, a produção total cresceu 72,3%, por conta tanto do aumento do rebanho (+ 28,7%), e da produtividade (+33,8%). Ainda assim, sua produtividade é bastante baixa, com cerca de 1.500 litros/vaca/ano, um dos menores índices entre os principais países produtores de leite (como comparativo, os EUA produzem cerca de 10.000 litros/vaca/ano) (USDA, 2017).

O estado de Minas Gerais (MG) é o estado brasileiro com maior número de fazendas, contemplando 44 propriedades dentre as 100 maiores propriedade de leite no Brasil. Com relação às dez maiores fazendas produtoras três delas estão no estado de (MG), e dentre as que apresentaram aumento na produtividade diária em 2016, três são mineiras (VALOR ECONÔMICO, 2017),

O Brasil apresenta grandes possibilidades de se tornar um importante exportador de produtos lácteos, devido a diversas qualidades inerentes ao país, tais como a grande disponibilidade de terra, água, tecnologias e custo de produção competitivo, o que ilustra grande potencial de melhoria. Segundo projeções realizadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil (MAPA), para o período 2008/09 a 2018/19, os produtos mais dinâmicos do agronegócio brasileiro deveriam ser a soja, milho, trigo, carnes, etanol, farelo de soja, óleo de soja e leite (BRASIL, 2012).

Dentro da pecuária leiteira, a mastite é a doença que causa maiores prejuízos ao produtor. Esta enfermidade é caracterizada por um processo inflamatório na glândula mamária e que interfere diretamente na produção. As transformações mais importantes observadas no leite são a sua descoloração, aparecimento de coágulos, e a presença de grande quantidade de leucócitos (OTTO et al., 2004). Este processo prejudica a produção leiteira tanto no aspecto qualitativo quanto quantitativo, sendo

capaz de promover alterações de natureza física, química e microbiológica do leite e derivados lácteos, devendo-se salientar ainda a ocorrência de alterações patológicas teciduais na glândula mamária e a possibilidade de presença de resíduos de antimicrobianos no leite (RADOSTITIS et al., 2000; COSTA et al., 2002). De acordo com Santos e Fonseca (2006), a mastite é responsável pela redução em 15% na produção anual de leite no Brasil e suas perdas duas vezes mais elevadas do que as relativas à infertilidade e doenças reprodutivas.

Os custos relacionados aos casos de mastite estão, não somente ligados ao volume de leite descartado, mas também o quanto o animal deixa de produzir, bem como as alterações na composição do leite devido à baixa qualidade do produto final. Os prejuízos econômicos são numerosos, como gastos com medicamentos, treinamento de pessoal e até descarte e reposição de animais. Os custos relacionados à afecção são variáveis e dependem do tipo de mastite, gravidade, duração, bem como o nível da produção de cada rebanho. A perda mais importante, embora geralmente imperceptível, é a redução da produção de leite, provocada pelos casos de mastite subclínica (PHILPOT; NICKERSON, 2002), e os gastos se elevam ano a ano, podendo chegar em 15-24% da renda bruta. O dispêndio diário com casos de mastite é de cerca de 0,99 US$/vaca/dia, custo elevado em relação à estudos mais antigos em que já foram reportados (0,39-0,46 US$/vaca/dia) (VISSIO et al., 2015).

As mastites são classificadas, ainda quanto à sua manifestação, em clínica e subclínica. A mastite clínica é caracterizada por modificações visíveis no leite e alterações na glândula mamária. A mastite subclínica, por sua vez, não apresenta sintomatologia evidente caracterizando-se pela diminuição da produção leiteira sem que sejam observados sinais clínicos de processo inflamatório ou fibrose da glândula mamária. Estima-se que para cada vaca com mastite clínica existam até nove, ou mais, com mastite subclínica (RADOSTITIS et al., 2000; COSTA, 2002).

O teste realizado para detecção dos casos clínicos é a prova de Tamis ou “caneca telada”, em que são analisados os primeiros jatos de leite para verificar a presença de grumos, coágulos de pus ou sangue, mas deve ser realizada também a inspeção e palpação minuciosa da glândula mamária. Para os casos subclínicos, são necessários testes que indiquem aumento de celularidade como o *California mastitis test* (CMT), *Wisconsin mastitis test* (WMT), contagem de células somáticas (CCS), pois a enfermidade não pode ser detectada por intermédio de observações

visuais do úbere ou do leite, em que na grande maioria das vezes apresentam aparência normal (SCHALM, 1971; PHILPOT, NICKERSON, 2002; SANTOS e FONSECA, 2006).

A etiologia da mastite é multifatorial, mas a infecciosa é considerada a mais importante devido aos aspectos econômicos e de saúde pública a ela relacionados, tendo em vista a veiculação de microrganismos mediante do consumo de leite. Diversos são os agentes etiológicos da mastite bovina, com relatos de mais de 137 espécies de microrganismos pertencentes a 35 gêneros, observando-se a predominância de bactérias do gênero *Staphylococcus* associadas às formas clínicas e/ou subclínicas da afecção (COSTA et al., 1996; SILVA, 2008). Diante da diversidade de agentes, o diagnóstico é fundamental para o estabelecimento de estratégias de controle e prevenção, assim como para o monitoramento da saúde dos rebanhos.

2.2 MASTITE POR *Staphylococcus* spp.

Os microrganismos do gênero *Staphylococcus* são os principais agentes responsáveis pela mastite no gado leiteiro (HONKANEN-BUZALSKI; MYLLYS; PYÖRÄLÄ, 1994; LOPES et al., 1999; BERGONIER et al., 2003; AIRES-DE-SOUSA et al. 2007; PYORALA e TAPONEN, 2009). Este gênero, pertencente à família Staphylococcaceae, está distribuído no ambiente, fazendo parte da microbiota da mucosa e pele de mamíferos. São bactérias consideradas cocos gram-positivos, imóveis, anaeróbios facultativos, de metabolismo fermentativo com produção de ácido e não gás, catalase-positivas e capazes de crescer em meios contendo 10% de cloreto de sódio. São microrganismos mesófilos, com temperatura ótima de crescimento de 30 - 37°C, pH na faixa de 4-10, com diâmetro variando de 0,5 a 1,5µm, não formadores de esporos, resistentes a bacitracina. Suas células podem ser visualizadas por meio de microscopia óptica como cocos isolados, aos pares, tétrades, pequenas cadeias (3 ou 4 células) ou em arranjos irregulares em forma de cachos. As colônias são geralmente opacas ou podem ter tonalidade branca, creme e, algumas vezes, podem variar de amarelo à laranja (KLOOS; BANNERMAN, 1999; MURRAY et al., 2006).

Staphylococcus são classificados de acordo com sua origem e modo de transmissão, em microrganismos contagiosos, transmitidos de animal para animal, principalmente durante a ordenha, por meio do equipamento de ordenha ou das mãos do ordenhador, (RADOSTITIS et al., 2000; COSTA, 2002; SANTOS e FONSECA, 2006).

A infecção é iniciada pela penetração bacteriana através do orifício do teto em direção ao interior da glândula mamária, que pode ocorrer no período entre as ordenhas ou durante a mesma, seja esta manual ou mecânica. Posteriormente, os agentes instalam-se e multiplicam-se no parênquima mamário, associados às condições favoráveis no interior da glândula. As bactérias do gênero *Staphylococcus,* uma vez no interior da glândula ou no canal do teto, se fixam às células do órgão e promovem infecção por mecanismos patológicos, como produção de toxinas que interferem na secreção glandular e como consequência na redução na produção de leite. Deste modo, os produtos originários do crescimento bacteriano por *Staphylococcus* e de seu metabolismo, desencadeiam uma resposta inflamatória que culmina com a destruição das células secretoras (RADOSTITIS et al., 2000).

O potencial de invasão dos microrganismos é aumentado pela presença dos mesmos na superfície externa do teto, fator que ocorre tanto durante a lactação quanto no período seco. O orifício e canal do teto constituem as barreiras primárias para a penetração de patógenos na cisterna da glândula. Ao vencer estas barreiras, o agente pode aderir à superfície mucosa e produzir fatores de virulência, como capacidade de produzir toxinas, enzimas, adesinas e/ou biofilmes, que permitam seu estabelecimento e multiplicação no interior dos ductos e cisternas, para invasão do tecido interacinar (DEGO et al., 2002).

Conforme Radostitis et al. (2000), o processo entre a penetração do microrganismo e a mastite instalada se inicia após o alojamento e multiplicação do agente bacteriano, seguido de produção de citotoxinas que estimulam uma reação neutrofílica. A agregação de neutrófilos resulta na formação de grumos no leite e edema interalveolar. A presença de grande quantidade de bactérias e neutrófilos promove a obstrução dos lóbulos que começam a involuir, ocorrendo um acúmulo de fibroblastos, macrófagos e linfócitos que vão promover o aumento da quantidade de tecido conjuntivo interalveolar. O tipo de evolução do quadro está relacionado com a quantidade de tecido mamário envolvido e com a eficácia dos mecanismos de defesa para eliminar o agente. Nos casos em que a concentração bacteriana é

elevada e existe produção de toxinas, pode ocorrer a forma aguda. Quando a infecção está amplamente disseminada pela glândula, grande parte da mesma pode ser lesada, mas se houver poucos e pequenos focos, os efeitos serão menos severos, reduzindo a produção leiteira, mas havendo a possibilidade de fibrose e involução.

A permanência de um animal infectado por *Staphylococcus* spp. pode potencializar a contaminação no rebanho e, por este motivo a importância de se reduzir a duração dessas infecções com programas de controle na fase de secagem dos animais, elevando o nível de cura, que pode variar de 3,6 a 92% (MARQUES, 2006). Mesmo assim, em algumas situações o descarte de vacas infectadas é considerado o meio mais efetivo de reduzir o nível de infecções por *Staphylococcus* spp. dentro do rebanho, o que não é muito comum na grande maioria das propriedades (SPINNOSA, 1999; VON EIFF, 2002; SANTOS e FONSECA, 2006).

A classificação do gênero *Staphylococcus* em espécies é importante para a determinação das fontes de infecção, caracterização da patologia, bem como para a condução de estudos. Mellman et al. (2006) reportam que o gênero *Staphylococcus* é composto por 36 espécies e 21 subespécies, resultado semelhante ao de Hennekinne et al. (2010), que relatam 50 espécies e subespécies. As espécies de *Staphylococcus* spp. mais frequentemente isoladas são *S. aureus*, *S. epidermidis, S. chromogenes, S. hyicus, S. xylosus, S. simulans* e *S. cohnii,* embora outras também sejam detectadas (PYÖRÄLÄ e TAPONEN, 2009; SUPRÉ et al. 2010). Conforme Iorio et al. (2005), com base no teste da coagulase em plasma de coelho, o gênero tem sido dividido em *Staphylococcus* coagulase positivas (SCP) e *Staphylococcus* coagulase negativas (SCN).

2.2.1 *Staphylococcus* coagulase positivas (SCP)

Dentre os estafilococos coagulase positivas, *S. aureus* é o agente mais frequentemente associado às mastites, e está presente em aproximadamente 50% das infecções das glândulas mamárias de bovinos leiteiros (FERREIRA et al., 2006). Outros *Staphylococcus* como *S. intermedius, S. hyicus* (coagulase variável),

S. schleiferi subsp. *coagulans*, *S. lutrae* e *S. delphini* também podem ser detectados (KLOOS e BANNERMAN, 1999; THIMOTHY, 2000).

Kumar et al. (2011) relatam que *S. aureus* são reconhecidos como importantes agentes etiológicos causadores de mastite e podem levar ao completo dano da glândula mamária. Conforme Middleton (2013), a principal via de transmissão de *S. aureus* ocorre via animal-animal no momento das ordenhas (via fômites), sendo considerado o patógeno contagioso mais frequentemente isolado em casos de mastite clínica e subclínica, por estar presente na pele, quartos mamários e úbere (ROBERTSON et al., 1994), este último considerado o principal reservatório de infecções por *S. aureus* (MIDDLETON, et al., 2013).

2.2.2 *Staphylococcus* coagulase negativas (SCN)

Staphylococcus coagulase negativas (SCN) eram classificados, há algumas décadas, como bactérias de natureza secundária relativamente aos processos infecciosos (VERHOEFF et al., 1981). Pyorala e Taponen (2009), referiram-se ao grupo como sendo emergente, enquanto Ergun et al. (2009) os consideram como principais patógenos causadores de mastite em ruminantes. Os SCN podem causar mastite subclínica persistente, aumentar significativamente a contagem de células somáticas (CCS) e diminuir a produção de leite, além de causar mastite clínica. Algumas espécies pertencentes a esse grupo são: *S. epidermidis, S. chromogenes*, *S. xylosus, S. sciuri, S. saprophyticus, S. warneri, S. schleiferi, S. simulans,* sendo algumas isoladas da pele dos bovinos e outras de amostras de leite (MYLLYS; HONKANEM-BUZLADKI; VIRTANEN, 1994).

A presença destes agentes tem sido verificada mais frequentemente em propriedades que reduziram o número de infecções causadas por outros patógenos, sendo mais comuns em animais de primeira lactação (SILVA, 1999; LAFFRANCHI et al., 2001). Tal fato é atribuído à eficiência da terapia da vaca seca no controle desses microrganismos. Na maioria dos casos, as infecções por SCN ocorrem imediatamente após a parição, declinam no meio da lactação, no entanto, os índices aumentam novamente no final da lactação até que a vaca receba terapia para o período seco (HONKANEM-BUZALSKI et al.,1994).

Apesar de serem considerados menos patogênicos que os *S. aureus*, as infecções têm sido associadas a perdas consideráveis de leite por lactação e tendem a persistir durante todo o período da produção. Além disso, tais micro-organismos contribuem muito para os fenômenos de resistência aos antimicrobianos (SILVA, 1999).

2.2.3 Identificação das espécies

Diversos testes comerciais para identificação fenotípica de *Staphylococcus* têm sido desenvolvidos e muitos deles apresentam custo elevado, fornecendo resultados muitas vezes não definitivos. De acordo com Barry et al. (1991) e Couto et al. (2001), muitos dos problemas associados a estes kits de identificação são os parâmetros fenotípicos colorimétricos utilizados, bem como a subjetividade na interpretação, que pode levar à ambiguidade. Assim sendo, as técnicas moleculares têm contribuído para a obtenção de resultados mais precisos quanto à identificação das espécies. Mellmann et al. (2006) avaliaram diferentes genes em busca de um alvo molecular que permitisse a discriminação dos estafilococos e propuseram a detecção do gene *rpob,* que segundo Drancourt e Raoult (2002) codifica uma região altamente conservada da RNA polimerase bacteriana, posteriormente foi realizado o sequenciamento para identificação de espécies e subespécies de *Staphylococcus* spp.

2.3 FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Staphylococcus* spp.

A patogênese do microrganismo depende de diversos fatores relacionados ao hospedeiro, como *status* imune, traumas, etc., e fatores de virulência dos agentes etiológicos como aqueles ligados à capacidade de produção de adesinas e biofilmes. Fischetti et al. (2006) reportam que a regulação da produção de fatores de virulência ocorre por meio de um sistema complexo e eficiente, que produz uma resposta coordenada da bactéria frente às alterações ambientais durante o curso da doença.

Com relação aos *Staphylococus,* diversos fatores de virulência foram descritos, a maioria deles em *S. aureus*. Tais fatores podem ser codificados por genes cromossômicos e elementos genéticos extracromossômicos como bacteriófagos e ilhas genômicas, componentes estruturais, toxinas e algumas enzimas. Assim sendo, os fatores de virulência estão relacionados à patogenicidade do agente bacteriano, sendo importantes no desenvolvimento da doença. O significado patogênico de alguns fatores ainda não está devidamente esclarecido (FISCHETTI et al., 2006; KALOREY et al., 2007).

2.3.1 *Microbial surface components recognising adhesive matrix molecules* (MSCRAMM)

A infecção por *Staphylococcus* tem início a partir da adesão do microrganismo ao tecido do hospedeiro, a qual é favorecida pela presença de fatores de virulência - adesinas - que estão agrupadas em uma família denominada *microbial surface components recognising adhesive matrix molecules* (MSCRAMM) (FISCHETTI et al., 2006). Estas adesinas constituem proteínas presentes na superfície bacteriana que possuem habilidade de se ligar à matriz extracelular e componentes plasmáticos do hospedeiro (LOWY, 2003; CHEUNG et al., 2002). Estes componentes da superfície bacteriana geralmente estão ligados ao peptideoglicano da parede celular e reconhecem colágeno (proteína ligadora de colágeno, codificada pelo gene *cna*), fibronectina (proteína ligadora de fibronectina, gene *fnb*A *e fnb*B), fibrinogênio (proteína ligadora de fibrinogênio, gene *fib*), elastina (proteína ligadora de elastina, gene *ebp*S) e laminina (proteína ligadora de laminina, gene *eno*) (FOSTER; HOOK, 1998).

A reação do hospedeiro pode ser iniciada pelas adesinas bem como pelo peptideoglicano e os ácidos lipoteicóicos presentes na parede celular bacteriana, sendo traduzida por um processo inflamatório. Sendo assim, a sobrevivência e multiplicação da bactéria no hospedeiro dependem da resistência bacteriana à fagocitose, mediada por proteínas, cápsulas e/ou leucocidinas e ainda pela produção de biofilme, dependendo da quantidade de microrganismos no local. No momento em que ocorre a adesão e multiplicação do microrganismo, aumenta a

população e colonização bacteriana bem como intensificação do processo de invasão tecidual mediado por enzimas (proteases, lipases, hialuronidases) e toxinas, geralmente resultando em processos supurativos ou formação de abscessos, condições estas bastante peculiares nas infecções por *Staphylococcus* spp. (FISCHETTI et al., 2006).

Os dados na literatura acerca das adesinas em *Staphylococcus* coagulase positivas e principalmente dos negativas, bem como sobre seu papel na patogenia das mastites, não está completamente elucidado. Pouco se sabe, por exemplo, sobre a proteína ligadora de colágeno codificada pelo gene *cna* e a sua atuação no processo de colonização da glândula mamária, embora o gene já tenha sido detectado em *S. aureus* isolados de quadros de mastite subclínica bovina (REINOSO et al., 2008; ZUNIGA et al., 2015).

Pesquisadores têm detectado a presença de genes que conferem aderência em diversas doenças, bem como nos casos de mastite bovina. Tristan et al. (2003) avaliaram amostras de *Staphylococcus* provenientes de diferentes origens e detectaram os genes *eno, fib, ebp*S, *fnbB, cna e fnb*A. Smeltzer et al. (1997), relataram que os genes codificadores da proteína ligadora de fibronectina (*fnb*B) foram encontrados na maioria das linhagens de *S. aureus*. Kumar et al. (2010), avaliaram amostras de mastite bovina por *Staphylococcus* e encontraram os genes como *ebp*S*, fib, fnb*B e *cna* e associações dos mesmos como *fib/eno/fnb*A, *ebp/fib/eno/fnbA,* dentre outras combinações. Sutra e Poutrel (1994) acreditam que estas proteínas estejam envolvidas na patogênese das mastites bovinas por *S. aureus*. Brouillette et al. (2003) por sua vez, demonstraram que a capacidade de aderência às células, conferida pela proteína ligadora de fibronectina presente na bactéria, pode evitar a eliminação de *S. aureus* durante a lactação. Simojoki et al. reportam a presença dos genes que conferem aderência, com alta frequência para o gene *eno.* Salasia et al. (2004) e Reinoso et al. (2008) reportam a relevância da caracterização molecular bacteriana, principalmente por *S. aureus* em casos de mastite bovina.

2.3.2 Biofilmes

O biofilme consiste em agregados de células bacterianas ligadas entre si por intermédio de polissacarídeos produzidos pelas próprias bactérias, formando camadas bacterianas que ficam aderidas à superfície de um biomaterial, como os equipamentos de ordenha. Sua estrutura se adere à superfície das células dos hospedeiros, gerando proteção aos microrganismos. Nele há partículas de proteínas, lipídeos, carboidratos, sais minerais e vitaminas, que formam uma camada viscosa, sob a qual os agentes crescem, formando um cultivo puro ou uma associação com outros agentes (MELCHIOR et al. 2006).

Em geral, o biofilme é a base para a persistência ou infecção crônica bacteriana. Dois passos estão envolvidos neste processo: a ligação da bactéria à superfície e a adesão intercelular mediada pela família de componentes de superfície microbiana que reconhece a matriz molecular (MSCRAMMs). Este padrão de adesão é mediado por estruturas da parede celular bacteriana como fibronectina, fibrinogênio e colágeno (adesinas). A produção de uma estrutura viscosa (*slime*) aumenta a colonização no tecido do hospedeiro e protege contra opsonização e fagocitose (YARWOOD; SCHLIEVERT, 2003; VASUDEVAN et al., 2003; DUBRAVKA et al., 2010).

A habilidade de produzir biofilme é um importante fator de virulência e também adaptável às influências do ambiente e ainda induzido por estresse e concentração de certos antimicrobianos. Há diversos relatos sobre a proteção que os biofilmes conferem contra a ação de antimicrobianos bem como contra os mecanismos de defesa do organismo (DONLAN; COSTERTON, 2002; STOODLEY et al., 2002; ARCIOLA et al., 2005; ZUNIGA et al., 2015).

Diferentes genes podem estar envolvidos na formação dos biofilmes, dentre os quais *ica*A*, ica*B*, ica*C*, ica*D (*ica – intercellular adhesion*) que codificam para quatro proteínas necessárias para a síntese do PIA (polissacarídeo de adesão intercelular) também chamado de *ica*ADBC *cluster*, citado em diferentes estudos (BASELGA et al. 1993; ARCIOLA et al., 2001). A ocorrência dos genes *icas*, tipos A e D associados à formação de biofilme foram referidos por diversos autores (ARCIOLA et al., 2001; VASUDEVAN et al., 2003; VANCRAEYNEST et al. 2004; FISCHETTI et al., 2006).

Cucarella et al. (2001) referem a presença do gene *bap* (*biofilm-associated protein*) que codifica para uma proteína que contribui para a estrutura dos biofilmes e *bhp* (*bap homologue protein*) que codifica para uma proteína que induz um mecanismo de formação de biofilme independente de PIA, e semelhante a *bap*, tanto na estrutura quanto na função (TORMO et al., 2005).

2.4 SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS

O controle da mastite é de suma importância e deve ter como base as medidas terapêuticas e de prevenção. A terapia medicamentosa auxilia as defesas do animal para a eliminação do agente invasor. Por sua vez, os microrganismos muitas vezes procuram anular a resposta de defesa do hospedeiro, utilizando-se dos mais diversos mecanismos de resistência, os quais têm sido alvos de amplos estudos. A resistência bacteriana está relacionada à existência de genes que codificam para diferentes mecanismos bioquímicos, impedindo a ação dos fármacos. A utilização de métodos diagnósticos fenotípicos e genotípicos para a avaliação do perfil de resistência de *Staphylococcus* spp. têm sido realizada por diversos pesquisadores, principalmente quando considerados os rebanhos, tendo em vista a possibilidade de transferência de patógenos multirresistentes aos humanos e outros animais, bem como a importância dos prejuízos econômicos associados a este fenômeno (STROMMENGER et al., 2003; GARCÍA-ALVAREZ et al., 2011; CUNY et al. 2011; FRANÇA et al., 2012; DURAN et al., 2012; MU et al. 2014).

Cohn e Middleton (2010) relatam que a resistência antimicrobiana pode ocorrer por mutação espontânea ou aquisição de genes de resistência de outro organismo por meio de conjugação (transferência de DNA), transdução (transferência de genes mediante um bacteriófago), ou transformação (aquisição e incorporação de DNA liberado no ambiente por lise de outras bactérias). O uso excessivo e muitas vezes indiscriminado dos antimicrobianos constitui um fator de risco para a ocorrência de infecção por cepas resistentes a diversas classes de antibióticos. Assim sendo, o evidente aumento nos índices de resistência bacteriana está, muito provavelmente, associado ao aumento exponencial na frequência de cepas multirresistentes e falhas nos tratamentos, resultando em um grande

percentual de morbidade e mortalidade em humanos e animais, sendo que a transmissão de linhagens de *Staphylococcus* resistentes via consumo de alimentos de origem animal também evidencia a importância deste fenômeno quando considerada a saúde pública (FRANÇA et al., 2012; DURAN et al., 2012).

A resistência bacteriana aos betalactâmicos tem sido descrita em isolados de leite de vacas com mastite clínica e subclínica (GENTILINI et al., 2002). Tais antibióticos têm ação bactericida, pois inibem a síntese da parede celular. Dentre os antimicrobianos pertencentes ao grupo dos betalactâmicos estão as penicilinas (ex. penicilina, amoxicilina, ampicilina, oxacilina) e cefalosporinas (ex. cefalotina, cefalexina, cefoperazone, cefoxitina, ceftiofur). Embora as penicilinas não apresentem uma distribuição adequada no tecido da glândula mamária inflamada, estes antimicrobianos foram e ainda são constantemente utilizados para tratar mastites causadas por *Staphylococccus* spp. (COSTA, 2011). Por sua vez, diversas cefalosporinas têm sido utilizadas como antimicrobianos para tratamento da mastite, apresentando resultados satisfatórios (COSTA, 2011).

A resistência aos betalactâmicos deve-se principalmente a dois mecanismos distintos. O primeiro deles está relacionado à produção da enzima extracelular betalactamase, a qual inativa o antibiótico mediante a hidrólise do anel betalactâmico. A produção desta enzima é codificada pelo gene *bla*Z, geralmente alocado em plasmídeos, podendo também ser cromossomal **(**LOWY, 2003). Um segundo mecanismo de resistência está associado à produção de PBP2a (*penicillin binding protein*), uma proteína alterada que se liga aos betalactâmicos e codificada pelo gene *mec*A (KURODA et al. 2001). Os betalactâmicos se ligam às proteínas PBP, que constituem transpeptidases integrais de membrana que participam da fase inicial da síntese da parede celular, alterando sua conformação e desencadeando um processo ainda pouco esclarecido, que resulta na destruição bacteriana. Por sua vez, as proteínas PBP2a, produtos do gene *mec*A, substituem as PBPs responsáveis pela ligação normal às penicilinas, conferindo uma defesa eficiente contra os fármacos, sendo que tais mecanismos estão ausentes em cepas sensíveis à meticilina (MOUSSALLEM et al., 2007). O gene *mecA* está localizado em um cassete cromossômico móvel denominado *Staphylococcal Cassette Chromosome mec* (SCCmec) (LOWY, 2003).

A meticilina foi a primeira penicilina semissintética resistente à betalactamase, que surgiu no início da década de 1960. Por sua vez, o primeiro relato de resistência

à meticilina em animais foi relatado em 1975, quando foi detectada uma cepa de *Staphylococcus aureus* isolada de uma amostra de leite de animal com mastite (KAWANO et al., 1996). Kobayashi et al. (1994), Ryffel et al. (1990), Ubukata et al. (1990), Suzuki et al. (1992) e Manikandan et al. (2011) também referem a presença do gene *mec*A em amostras de SCN. Existem diversos relatos de detecção de cepas de *Staphylococcus* spp. resistentes aos betalactâmicos (STROMMENGER et al. 2003; SAWANT et al. 2009; FRANÇA et al. 2012). De acordo com Lowy (2003), a resistência à meticilina estende-se a outros betalactâmicos, incluindo cefalosporinas. A elevada ocorrência de resistência para este grupo de antimicrobianos tem sido relatada em diversos países (BAGCIGIL et al., 2012). Walther e Perreten (2007) relatam que a oxacilina constitui um indicador utilizado para detectar a presença de resistência à meticilina a qual, por sua vez, indica resistência a outros antibióticos betalactâmicos.

Staphylococcus spp. resistentes à meticilina (MRS) têm sido descritos como agentes causadores de mastite. Tais bactérias também ocasionam problemas de saúde pública e, por este motivo, é necessário controlar o uso indiscriminado de antimicrobianos e avaliar o perfil de resistência na tentativa de formular estratégias de controle e prevenção. Desde a introdução da meticilina na prática clínica, houve um aumento na detecção de *Staphylococcus* resistentes aos betalactâmicos (SEIXAS et al. 2014).

García-Alvarez et al. (2011), em uma pesquisa a respeito de MRSA (*Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina) em humanos e bovinos leiteiros, assim como Cuny et al. (2011), que estudaram o mesmo assunto em humanos, referem que os MRSAs podem conter um gene homólogo, chamado *mec*A_{LGA251}, também conhecido como *mec*C*,* não detectado pela PCR convencional para o gene *mec*A. Em ambos os estudos citados, foi detectada a presença do homólogo *mec*A_{LGA251} nos isolados tanto positivos quanto negativos para a presença do gene *mec*A, ressaltando sua importância como gene associado à resistência aos betalactâmicos.

Por sua vez, os genes *fem*A e *fem*B, (*factor essential for methicillin resistance*) codificam para proteínas que influenciam no nível de resistência à meticilina. Estes genes estão envolvidos na formação da parede celular, sendo que *fem*A é o responsável pela formação das glicinas 2 e 3 e *fem*B pela formação das glicinas 4 e 5, essenciais na constituição da camada de peptideoglicano da parede,

pois formam a pentaglicina que auxilia na ligação entre os resíduos de ácido *N*-acetilmurâmico (STRANDÉN et al., 1997). Desta forma, os genes regulatórios *fem*A e *fem*B, inseridos no cromossomo de *Staphylococcus*, juntamente com *mec*A, são considerados indicadores importantes para identificação de MRSA (KOBAYASHI et al., 1994). Santos et al. (2005), ao estudarem a resistência à oxacilina em cepas de *S. aureus*, detectaram a presença do gene *fem*B, em detrimento do gene *mec*A, demonstrando a importância de se avaliar a ocorrência de diferentes genes de resistência associados a esta classe de antimicrobianos.

Desde a década de 1960, os aminoglicosídios são utilizados no tratamento das mastites, sendo muitas vezes empregados em combinação aos betalactâmicos. Os aminoglicosídios são agentes bactericidas, responsáveis por inibirem a síntese de proteínas. Tais antimicrobianos possuem um uso clínico limitado, devido aos efeitos colaterais a eles associados, como nefrotoxicidade porém, possuem potente atividade bactericida (RAIA JÚNIOR, 2006). Dentre os antimicrobianos pertencentes à classe dos aminoglicosídios utilizados no Brasil, a gentamicina se destaca no tratamento das mastites (COSTA, 2011). Costa et al. (1996) e Langoni et al. (2000) avaliaram a eficácia da utilização da gentamicina por via intramamária e obtiveram como resultados, respectivamente, a cura de 83,9% e 84,6%, dos animais acometidos.

O principal mecanismo de resistência aos aminoglicosídios consiste na modificação enzimática do antimicrobiano com consequente inativação do mesmo. As enzimas responsáveis pela inativação destes antibióticos são as fosfotransferases (APH), adeniltransferases (ANT) ou acetiltransferases (AAC), que atuam modificando os grupos amino e hidroxila dos mesmos, impedindo sua ligação com os ribossomos e inibindo a síntese proteica; os genes que as codificam estão geralmente situados em plasmídeos. A resistência à gentamicina e, concomitantemente, à tobramicina e canamicina, é mediada por uma enzima bifuncional que apresenta atividade de AAC e APH, sendo codificada pelo gene *aac*A-*aph*D (STROMENGER et al., 2003).

3 OBJETIVOS

O presente estudo teve como principal objetivo avaliar características de resistência de *Staphylococcus* spp. isolados de mastites clínicas e subclínicas bovina aos antimicrobianos mais comumente utilizados na prática clínica, relacionando informações sobre fenótipo (testes de sensibilidade *in vitro* aos antimicrobianos) e genótipo (detecção de genes que codificam para resistência), e correlacionando estes dados com outras características de virulência dos microrganismos, particularmente aquelas relativas à presença de genes codificadores de adesinas e biofilmes.

Como objetivos específicos:

1. Caracterização fenotípica e genotípica das espécies de *Staphylococcus* em isolados de leite de vacas que apresentarem mastite clínica e subclínica;
2. Determinar a sensibilidade bacteriana *in vitro* a antibióticos betalactâmicos e gentamicina mais comumente utilizados no tratamento da afecção;
3. Avaliar a concentração inibitória mínima (MIC) para oxacilina, penicilina, ampicilina, amoxicilina e gentamicina em linhagens de *Staphylococcus* spp. resistentes a estes antimicrobianos;
4. Pesquisar nos isolados de *Staphylococcus* spp. a presença de genes codificadores de adesinas (*cna*, *eno*, *ebpS*, *fib*, *fnb*A, *fnb*B) e biofilmes (*ica*A*, ica*B*, ica*C*, ica*D*, bap, bhp*);
5. Detectar a ocorrência e avaliar a expressão de genes associados à resistência aos antimicrobianos em SCP e SCN:
    - Betalactâmicos (genes: *mec*A, $mecA_{LGA251}$, *bla*Z, *fem*A e *fem*B),
    - Aminoglicosídeos (gene *aac*A-*aph*D);
6. Correlacionar os dados sobre as características dos microrganismos considerando as diferentes espécies de *Staphylococcus*, a presença de genes codificadores de adesinas e biofilmes, bem como a detecção de genes de resistência aos antimicrobianos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

As análises microbiológicas e moleculares foram realizadas no Laboratório de Bacteriologia e Micologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS).

4.1 Delineamento Experimental

O estudo foi realizado conforme o organograma (Figura 1) a seguir.

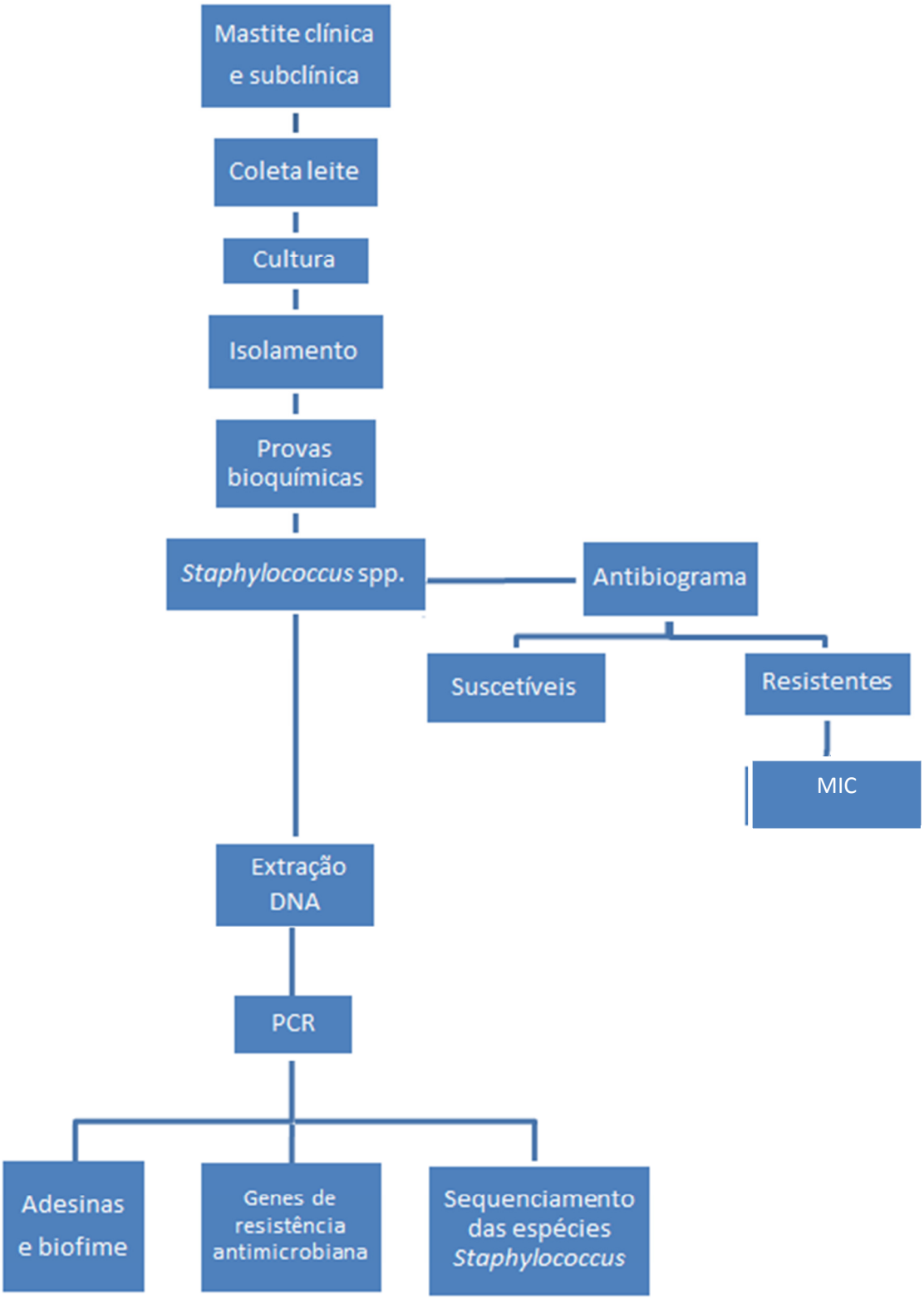

Figura 1 – Organograma representando o delineamento experimental do estudo.

4.1.1 Descrição das propriedades leiteiras

Onze propriedades (pequenas e médias) avaliadas estão localizadas no sul do estado de Minas Gerais, eram compostas por gado puro holandês e mestiços "girolando" (holandês/gir) na grande maioria 3/4 e 7/8 holandês. Os animais são criados no sistema semi-intensivo, como na maior parte das propriedades da região. A alimentação dos animais baseia-se no consumo de pastagem e suplementação com silagem de milho e concentrado. Os ingredientes básicos do concentrado foram milho, polpa de laranja, soja, caroço de algodão e sais minerais, e ainda receberam suplementação mineral a pasto.

O fornecimento de suplementação baseia-se no volume de produção de leite de cada animal. Em média, a cada três litros de leite era fornecido um quilo de concentrado. Com relação ao tipo de produção de leite, as propriedades com as melhores médias foram as mais tecnificadas (Fazenda 1, 4, 5 e 11), com médias entre 25-35L/animal/dia, e as demais apresentaram médias entre 8-25L/animal/dia.

Os animais eram ordenhados mecanicamente duas vezes ao dia, uma ordenha no período da manhã e outra no período da tarde. Antes da ordenha de cada animal, em todas as propriedades foi realizada a higienização dos tetos e o teste da caneca telada ou também chamado de teste da caneca de fundo escuro. Ao nascerem, os bezerros foram separados das mães e confinados em bezerreiros individuais, por sistema de casinhas ou barracões, e o colostro administrado em mamadeiras. Todas as propriedades realizavam terapia da vaca-seca com dois meses de antecedência ao parto.

4.1.2 Amostras de leite

Para o experimento foram utilizadas 300 cepas de *Staphylococcus* spp. (SCP e SCN) provenientes de amostras de leite de bovinos apresentando mastite clínica ou subclínica. Os animais em lactação foram submetidos a provas de campo, Tamis ou Teste da caneca telada (RADOSTITS et al., 2000) e *California Mastitis Test*

(CMT) escore 1+ a 3+ (SCHALM e NOORLANDER, 1957), para detecção de mastites clínica e subclínica, respectivamente.

Conforme Bramley et al. (1996), a cultura de amostras de leite de quartos mamários individuais é importante para se determinar qual o agente causador da infecção. Portanto, amostras positivas para mastites clínica e subclínica foram coletadas para realização de exame microbiológico, sendo obtidas da seguinte maneira: após a devida higienização dos tetos com algodão e álcool iodado (2,5%), foram colhidos, assepticamente, 5mL de leite em tubos estéreis. As amostras foram transportadas ao laboratório em condição de refrigeração e submetidas aos exames microbiológicos.

4.1.3 Isolamento e identificação de *Staphylococcus* spp.

A partir de cada amostra, foram semeados 10µL de leite na superfície de placas de Petri contendo ágar-sangue ovino a 5%. As placas foram incubadas em aerobiose a 37°C, com leitura realizada após 24 horas. As espécies de *Staphylococcus* isoladas foram identificadas por intermédio de provas bioquímicas de acordo com Murray et al. (2006) e Cunha et al. (2004) tendo sido realizados testes como: prova de catalase, prova da coagulase lenta em plasma de coelho, urease, produção de acetoína em caldo VP ("Voges Proskauer"), lactose, trealose, maltose, sacarose, xilose e manitol. Posteriormente, as cepas foram semeadas em caldo BHI (Brain Heart Infusion – DIFCO, Detroit, EUA) acrescido de glicerol na concentração de 5%, e acondicionadas em nitrogênio líquido para posterior extração do DNA.

4.1.4 Testes de sensibilidade *in vitro* das estirpes de *Staphylococcus* spp. frente aos antimicrobianos

Para avaliação do perfil de sensibilidade das cepas em estudo, utilizou-se a técnica de difusão descrita por Bauer et al. (1966). As concentrações, bem como os

critérios de interpretação utilizados foram os padronizados pela "*Clinical and Laboratory Standards Institute*" (CLSI, 2008; CLSI, 2013). Avaliou-se a sensibilidade frente aos seguintes antimicrobianos: amoxicilina (10µg), ampicilina (10µg), oxacilina (10µg), penicilina (10 U.I.), cefalotina (30µg) e gentamicina (10µg). De acordo com o CLSI (2013) a sensibilidade ou resistência para os betalactâmicos podem ser deduzidas a partir dos resultados para penicilina, cefoxitina ou oxacilina. Vale ressaltar que os resultados obtidos para cefoxitina devem ser reportados para oxacilina, de acordo com orientação do CLSI (2013).

4.1.5 Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) dos isolados resistentes pelo método de E-test™

Os isolados que apresentaram resistência nos testes de difusão foram submetidos à avaliação da concentração inibitória mínima (MIC) relativamente aos antimicrobianos aos quais apresentaram resistência, pelo método de E-test™. Utilizou-se o kit comercial E-test™, assim como o ágar Mueller Hinton. A suspensão do microrganismo foi realizada em solução fisiológica com concentração final equivalente à escala 0,5 de Mac Farland. O volume de 0,2mL da suspensão foi distribuído em placas de ágar Mueller Hinton, na qual também foi adicionada a fita contendo um gradiente de concentração do antibiótico selecionado. As placas foram então incubadas em aerobiose a 37°C com avaliações em 24 e 48 horas. A leitura foi realizada pela verificação das elipses de inibição, de acordo com orientações do fabricante (Thermo Scientific®). Os critérios utilizados para a determinação da sensibilidade dos isolados foram os descritos pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008; CLSI, 2013). Como controles positivos foram utilizados cepas padrão ATCC (*American Type Culture Collection*) sensíveis e resistentes aos antimicrobianos estudados.

4.1.6 Extração de DNA

O DNA foi extraído de cepas de *Staphylococcus* cultivadas em ágar sangue e incubadas a 37°C por 24 horas. A extração de DNA foi realizada utilizando-se um kit comercial (Ilustra Bacteria Genomic Prep Mini Spin Kit, GE Healthcare®) de acordo com as instruções do fabricante. O extraído foi então armazenado a -20°C, para posterior realização da reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção do gene *rpob*, bem como dos genes codificadores de adesinas, biofilme e de resistência aos antimicrobianos pesquisados.

4.1.7 Detecção do gene *rpob*

O gene *rpob* foi utilizado para a confirmação das espécies de SCP e SCN com sequenciamento da região amplificada. Amplicons de 899pb foram gerados com os *primers rpob*1418F 5'- CAATTCATGGACCAAGC- 3' e *rpob*3554R 5'- CCGTCCAAGTCATGAAAC-3' (MELLMANN et al., 2006). As reações de PCR foram realizadas utilizando-se de kit comercial Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen®) e água ultrapura q.s.p. 25µL. As amplificações foram realizadas no Applied Biosystems® 2720 Thermal Cycler (Life Technologies®). As reações de PCR foram dispostas em gel de agarose a 1,5% e coradas com SYBR® Safe DNA gel *stain* (Life Technologies®), conforme instruções do fabricante. A visualização das bandas esperadas foi realizada sob luz UV em aparelho de foto documentação de géis (Syngene Bioimaging, Syngene®).

4.1.8 Sequenciamento genético

Os amplicons das regiões do gene *rpob* foram submetidos à purificação utilizando o kit comercial GFX™ PCR DNA and gel band Purification Kit (GE Healthcare), de acordo com as recomendações do fabricante. Posteriormente a

purificação do DNA, foi realizada a quantificação utilizando o NanoDrop 2000 Spectrophotometers (ThermoFisher Scientific®) segundo instruções do fabricante.

A reação de sequenciamento de DNA consistiu em 4µL de Big Dye 3.1 (Life Technologies®), 4µL de 1x Sequencing buffer (Life Technologies), 0,5µM de cada primer em reações separadas, 30ng do DNA alvo e água ultrapura esterilizada q.s.p. para uma reação final de 10µL. As reações foram incubadas no termociclador Master cycler Gradient (Eppendorf™): 35 ciclos de 96ºC/10 segundos, 50ºC/5 segundos e 60ºC/4 minutos, com rampa de 1ºC/segundo entre cada temperatura. O produto desta reação foi precipitado à temperatura ambiente com 2,5µL de EDTA a 125mM e 30µL de etanol absoluto, seguido de homogeneização e incubação por 15 minutos, em temperatura ambiente. Em seguida, a solução foi centrifugada a 3500xg, durante 30 minutos a 15ºC e posterior remoção do sobrenadante. Foram adicionados 30µL de etanol 70% e o material centrifugado a 3500xg, durante 15 minutos a 15ºC; em seguida, o sobrenadante desprezado. O *pellet* permaneceu por 10 minutos a 95ºC para a secagem completa. Após a precipitação, as sequências serão obtidas em sequenciador capilar Genetic Analyser 3500™ (Applied Biosystems®, Foster City, CA, EUA).

Os cromatogramas gerados para cada uma das sequências senso e antisenso de cada amostra foram avaliados com relação à qualidade das bases sequenciadas no aplicativo Phred online (http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/). Assim, foram utilizados apenas os fragmentos com escore superior a 20 (probabilidade de um erro a cada 100 nucleotídeos). Posteriormente os cromatogramas foram analisados e editados manualmente com o programa FinchTV v.1.4 (http://www.geopiza.com/finchtv) com o objetivo de se observar e corrigir possíveis erros de interpretação e discrepâncias entre cada uma das fitas sequenciadas. As sequências finais de cada amostra foram obtidas com o aplicativo Cap-contig do programa computacional BioEdit v. 7.0.9.0 (HALL, 1999). Todas as sequências obtidas serão depositadas no GenBank.

A pesquisa de similaridade dentre as sequências deste estudo com outras sequências depositadas no GenBank foi realizada utilizando-se o programa Blast 2.0.10 (http://www.ncbi.nmL.nih.gov/blast/) para se determinar a espécie de *Staphylococcus*.

4.1.9 Pesquisa de genes codificadores de adesinas e biofilme em cepas de *Staphylococcus* spp. utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR)

A pesquisa de genes codificadores de adesinas e biofilme em estirpes de *Staphylococcus* spp. isoladas das amostras de leite foi realizada mediante PCR. Assim, diferentes pares de oligonucleotídeos foram utilizados para detectar os genes que codificam para proteína ligadora de colágeno (*cna*), proteína ligadora de laminina (*eno*), proteína ligadora de elastina (*ebp*S), proteína ligadora de fibrinogênio (*fib*), proteína B ligadora de fibronectina (*fnb*B) conforme descrito por Tristan et al. (2003) e proteína A ligadora de fibronectina (*fnb*A) conforme descrito por Kumar et al. (2011). Para a pesquisa de genes codificadores de proteína associada à formação de biofilme (*bap*) foi utilizado o protocolo descrito por Cucarella et al. (2004) e, para detecção do gene codificador da proteína homóloga ao bap (*bhp*) foi utilizado o protocolo de Qin et. al. (2007). Para a pesquisa de genes codificadores de proteínas associadas à adesão intercelular (*ica*) utilizou-se o protocolo descrito por Arciola et al. (2005). O tamanho dos amplicons e referências relevantes estão apresentados no Quadro 1.

Quadro 1. Sequências das bases, tamanho dos produtos amplificados e referências dos genes codificadores de adesinas e biofilme.

(continua)

Proteína	***Primer***	**Sequência (5´- 3´)**	**Tamanho do produto amplificado**	**Referência**
Ligadora de colágeno	*cna*-S *cna*-AS	GTCAAGCAGTTATTAACACCAGAC AATCAGTAATTGCACTTTGTCCACTG	423pb	Tristan et al. (2003)
Ligadora de laminina	*eno*-S *eno*-AS	ACGTGCAGCAGCTGACT CAACAGCATCTTCAGTACCTTC	302pb	
Ligadora de elastina	*ebp*S-S *ebp*S-AS	CATCCAGAACCAATCGAAGAC CTTAACAGTTACATCATCATGTTTATCTTTTG	186pb	
B ligadora de fibronectina	*fnb*B-S *fnb*B-AS	GTAACAGCTAATGGTCGAATTGATACT CAAGTTCGATAGGAGTACTATGTTC	524pb	
Ligadora de fibrinogênio	*fib*-S *fib*-AS	CTACAACTACAATTGCCGTCAACAG GCTCTTGTAAGACCATTTTTCTTCAC	404pb	
A ligadora de fibronectina	*fnb*A-S *fnb*A-AS	GCGGAGATCAAAGACAA CCATCTATAGCTGTGTGG	1280pb	Kumar et al. (2011)

(conclusão)

Proteína	*Primer*	Sequência (5´- 3´)	Tamanho do produto amplificado	Referência
Adesão intercelular A	*ica*A - S *ica*A - AS	ACAGTCGCTACGAAAAGAAA GGAAATGCCATAATGACAAC	103pb	Arciola et al. (2005)
Adesão Intercelular B	*ica*B- S *ica*B - AS	CTGATCAAGAATTTAAATCACAAA AAAGTCCCATAAGCCTGTTT	302pb	
Adesão Intercelular C	*ica*C - S *ica*C - AS	TAACTTTAGGCGCATATGTTTT TTCCAGTTAGGCTGGTATTG	400pb	
Adesão Intercelular D	*ica*D - S *ica*D - AS	ATGGTCAAGCCCAGACAGAG CGTGTTTTCAACATTTAATGCAA	198pb	
Associada à formação de biofilme	*bap*-S *bap*-AS	CCCTATATCGAAAGGTGTAGAATTG GCTGTTGAAGTTAATACTGTACCTGC	971pb	Cucarella et al. (2001)
Homóloga à *bap*	*bhp-S* *bhp-AS*	TGAAAAATAAACAAGGATTTC GCCTAAGCTAGATAATGTTTG	1300pb	Qin et al. (2007)

Para os genes relacionados à resistência antimicrobiana, bem como o controle endógeno para as estirpes de *Staphylococcus* spp. isoladas de amostras de leite, foi realizada pela PCR, a pesquisa de diferentes pares de oligonucleotídeos. Para o controle endógeno dos *Staphylococcus* spp. (16S rRNA) utilizou-se os primers descritos por Monday e Bohach (1999). Para os genes que codificam resistência à MRSA, foi realizada a pesquisa de *mec*A segundo García-Álvarez et al. (2011), para o homólogo de *mec*A, o *mec*A_{LGA251} conforme Cuny et al. (2011) e para os genes *fem*A e *fem*B (KOBAYASHI et al., 1994), e por fim para o gene *bla*Z que codifica resistência aos betalactâmicos (SAWANT et al., 2009). Para a pesquisa do gene que codifica resistência aos aminoglicosídeos (*aac*A-*aph*D) utilizou-se o protocolo descrito por Strommenger et al. (2003). O tamanho dos amplicons e referências relevantes estão apresentados no Quadro 2.

Quadro 2. Sequências das bases, tamanho dos produtos amplificados e referências dos genes relacionados à resistência antimicrobiana e controle endógeno.

Função	**Genes**	**Sequência (5´- 3´)**	**Tamanho do Produto Amplificado**	**Referência**
controle endógeno	16S rRNA - S 16S rRNA - AS	GTAGGTGGCAAGCGTTATCC CGCACATCAGCGTCAG	228pb	Monday e Bohach (1999)
Codifica Resistência aos Betalactâmicos	*bla*Z- S *bla*Z - AS	AAGAGATTTGCCTATGCTTC GCTTGACCACTTTTATCAGC	517pb	Sawant et al. (2009)
Codifica resistência à MRSA	*mec*A- S *mec*A - AS	TCACCAGGTTCAAC[Y]CAAAA CCTGAATC[W]GCTAATAATATTTC	356pb	García-Álvarez et al. (2011)
Codifica resistência à MRSA	*mec*AL$_{GA251}$- S *mec*A$_{LGA251}$ - AS	GCTCCTAATGCTAATGCA TAAGCAATAATGACTACC	304pb	Cuny et al. (2011)
Codifica resistência à MRSA	*fem*A-S *fem*A - AS	AGACAAATAGGAGTAATGAT AAATCTAACACTGAGTGATA	509pb	Kobayashi et al. (1994)
Codifica resistência à MRSA	*fem*B - S *fem*B - AS	TTACAGAGTTAACTGTTACC ATACAAATCCAGCACGCTCT	651pb	Kobayashi et al. (1994)
Codifica Resistência aos Aminoglicosídios	*aac*A-*aph*D - S *aac*A-*aph*D - AS	TAATCCAAGAGCAATAAGGGC GCCACACTATCATAACCACTA	227pb	Strommenger et al. (2003)

As reações de PCR foram realizadas utilizando-se de kit comercial Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen®), dNTP Set 100mM (Invitrogen®), primer Senso e Anti-Senso e água ultrapura q.s.p. 25µL. A cada amplificação realizada foi adicionado um controle positivo para os genes em estudo bem como um controle negativo. Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, para amplicons de até 1000pb e agarose de 1% para amplicons maiores que 1000pb. Posteriormente os géis foram corados com SYBR® Safe DNA gel *stain* (Life Technologies®), conforme instruções do fabricante, e com relação à voltagem foi utilizado 110V. Na sequência os géis foram fotografados sob luz ultravioleta (Syngene Bioimaging, Syngene®). Os tamanhos dos produtos foram determinados por marcadores de pares de bases de 100bp e de 1kb DNA ladder (Invitrogen®).

4.1.9 Análise estatística

Para realizar a comparação entre os resultados fenotípicos e genotípicos quanto à resistência aos antimicrobianos e avaliação de concordância dos mesmos com presença de genes codificadores de adesinas e biofilme, foi realizada a análise estatística pelo software GRAPHPAD INSTAT (*Statistical Analysis Systems for Personal Computers*, 1990-1993), empregando-se o teste de concordância e teste de Fisher, e ainda os testes Kappa e Pabak (FEINSTEIN e COMENIC 1990a e b; BYRT, BISHOP, CARLIN, 1993; CHEN et al. 2009). O índice Kappa, é amplamente utilizado por ser mais robusto que a concordância simples, pois leva em consideração a possibilidade da concordância ocorrer pelo mero acaso. conforme as medidas de Landis e Koch (1977). Os cálculos do índice Pabak, uma correção do Kappa, são elaboradados a fim de corrigir um viés em casos em que há uma elevada concordância em apenas um dos casos "positivo-positivo" ou "negativo-negativo".

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Descrição dos dados

A mastite bovina é uma doença infecciosa, multifatorial e tem impacto significativo na economia ao redor do mundo (MELCHIOR et al., 2006; AWALE et al. 2012). Conforme Pol e Ruegg (2007) é a enfermidade mais prevalente em rebanhos leiteiros sendo a razão mais comum de descarte de animais da produção.

Foram coletadas 139 amostras de leite apresentando mastites clínicas que se apresentaram reagentes ao teste de *Tamis* ou caneca de fundo escuro, em 7 propriedades no Sul do estado de Minas Gerais. Dentre as amostras coletadas foram isoladas 57 amostras positivas para *Staphylococcus* spp., sendo obtidas 7 amostras sem crescimento bacteriano e nas 75 restantes foram isolados outros agentes, sendo os mais frequentes *Streptococcus* spp. e *Corynebacterium* spp.

Com relação às mastites subclínicas foram avaliadas 8 propriedades leiteiras no Sul do estado de Minas Gerais, totalizando 10 coletas em um período de 3 anos. Desta forma, foram avaliadas 2509 glândulas mamárias de 633 vacas leiteiras. O teste de CMT (1+ a 3+) foi realizado e coletadas 910 amostras que se apresentaram reagentes ao teste, sendo que destas, 233 amostras não apresentaram crescimento bacteriano e, em 677 amostras foi isolado algum microrganismo. Para as amostras com crescimento bacteriano, 243 foram isolados *Staphylococcus* spp. e em 434 foram isolados outros agentes, dentre eles os mais frequentes foram *Streptococcus* spp. e *Corynebacterium* spp. No Quadro 3 obsserva-se os dados referentes a cada coleta.

Quadro 3 – Caracterização das coletas relativas às amostras de leite proveniente de mastite subclínica bovina (quantidade de animais avaliados, de glândulas mamárias, amostras coletadas com e sem crescimento bacteriano e microrganismos isolados).

	1 COLETA	2 COLETA	3 COLETA	4 COLETA	5 COLETA	6 COLETA	7 COLETA	8 COLETA	9 COLETA	10 COLETA	TOTAL
Vacas avaliadas	36	17	58	23	155	36	38	62	82	126	633
Glândulas mamárias	144	68	232	92	606	144	152	246	327	498	2509
CMTs positivos	34	27	89	47	106	66	68	91	112	270	910
Sem crescimento bacteriano	15	8	16	11	78	11	21	24	22	27	233
Com crescimento bacteriano	19	19	73	36	28	55	47	67	90	243	677
***Staphylococcus* spp.**	13	5	33	10	18	13	14	19	27	91	243
Outros agentes	6	14	40	26	10	42	33	48	63	152	434

CMT: *California Mastitis Test*.

Diversos estudos têm sido realizados para avaliar a frequência de ocorrência de mastites clínicas e subclínicas bem como dos microrganismos envolvidos. Karahan e Çetinkaya (2007) avaliaram 700 amostras de leite positivas ao exame de CMT em 32 localidades na Turquia tendo isolado 200 (28,6%) cepas de *S. aureus.* Kumar et al. (2011) avaliaram um total de 185 bovinos entre 2007-2008 e coletaram amostras de leite oriundas de mastite clínica e subclínica, isolando 128 *S. aureus*, sendo 83 isolados de mastite subclínica e 45 de mastite clínica. Costa et al. (2012) isolaram 59 cepas de *S. aureus* de leite de mastite clínica e 293 de mastite subclínica em 38 rebanhos bovinos brasileiros, em um período de 4 anos. Chandrasekaran et al. (2014) avaliaram patógenos causadores de mastite clínica, dentre eles 162 (40,4%) *S. aureus*, provenientes de 401 amostras de leite, na Índia.

No presente estudo foram isolados outros agentes que não *Staphylococcus,* dentre eles os mesmos encontrados por Martins et al. (2016), *Corynebacterium,* e *Streptococcus* spp, que corroboram com os resultados de Mendonça et al. (1999), Brito et al. (1999) e Fagundes et al. (2010) que ainda descrevem o gênero *Staphylococcus* como um dos principais patógenos isolados de mastite bovina, sendo o *S. aureus* a espécie mais importante.

5.2 Identificação e comparação entre os métodos fenotípico e genotípico das espécies de *Staphylococcus* spp. isoladas

Conforme o levantamento de Guimarães et al. (2016), as infecções intra-mamárias causadas pelo gênero *Staphylococcus* se tornaram um sério problema em rebanhos leiteiros. Com o passar do tempo percebeu-se a importância em se identificar as espécies envolvidas na infecção, para um melhor diagnóstico epidemiológico e implantação da forma adequada de tratamento. Para o diagnóstico fenotípico foram utilizadas provas bioquímicas descritas por Murray et al. (2006) e Cunha et al. (2004). Com relação ao dignóstico genotípico Mollet et al. (1997) descrevem o gene *rpoB* como uma ferramenta universal para a identificação bacteriana. Assim sendo, foi realizada a detecção do gene *rpob* (MELLMAN et al., 2006), que codifica para uma beta subunidade do gene RNA polimerase, também utilizado por Drancourt e Raoult (2002) e classificado como fragmento eficiente para a identificação das espécies de *Staphylococcus.*

Dessa maneira, foram realizados os testes fenotípicos por intermédio de série bioquímica, e em seguida foi realizado o sequenciamento do gene *rpob* para confirmação e identificação das 300 espécies de *Staphylococcus* spp. isoladas, bem como para confirmação da identificação das cepas utilizadas como controles positivos das reações de detecção dos diferentes genes estudados.

Na Tabela 1 pode-se verificar as frequências de ocorrência (em número absoluto e porcentagem) de espécies de *Staphylococcus* isoladas e identificadas pelos métodos fenotípico e genotípico. Pelo método fenotípico o *S. aureus* foi o agente mais frequentemente isolado com 67,3% ($p<0,0001$) seguido por *S. hyicus* com 13,3%, mais frequente quando avaliado em relação a todas outras espécies ($p<0,002$). O grupo dos SCP apresentaram uma frequência de isolamento de 81,6% em relação aos isolados do gênero *Staphylococcus,* sendo maior que a observada para SCN (18,4%) ($p<0,0001$). *Staphylococcus epidermidis* e *S. haemolyticus* apresentaram frequência de 6,7% e 5,7% respectivamente, não havendo diferença estatística entre ambos ($p<0,05$), porém com frequências maiores que as observadas para as outras espécies encontradas no grupo de SCN.

Os resultados para o método genotípico de identificação também estão reportados na Tabela 1 em que se observa uma frequência de isolamento de SCP

(85%) maior que de SCN (15%) (p<0,0001). *Staphylococcus aureus* foi a espécie mais frequentemente isolada com 68,3% (p<0,0001) seguido por *S. hyicus* mais frequente quando avaliado em relação a todas outras espécies de *Staphylococcus* (p=0,001). *Staphylococcus epidermidis* e *S. haemolyticus* apresentaram frequência de ocorrência 6,7% e 5,7% respectivamente, sem diferença estatística entre ambos (p<0,05), porém mais frequente que todas as outras espécies encontradas. A concordância simples, Kappa e Pabak entre os métodos de identificação (fenotípico e genotípico) foram de 92%, 71% e 84%, respectivamente, para os o grupo SCP e SCN. Para *S. aureus* as frequências foram de 97%, 93%, 94%, *S. hyicus* 94%, 76%, 88% e para os *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* de 100% em todos testes de concordância, concluindo, portanto, alta concordância entre os métodos de avaliação para identificação das espécies de *Saphylococcus* spp.

Tabela 1. Frequência de ocorrência (em número absoluto e porcentagem) das espécies de SCP e SCN isoladas de amostras de mastite clínica e subclínica bovina pelo método fenotípico e genotípico – 2017.

Grupo	Espécies	Fenotípico		Genotípico	
		N	%	N	%
SCP	*S. aureus*	202	67,3%	205	68,3%
	S. hyicus	40	13,3%	46	15,3%
	S. agnetis	0	0,0%	4	1,3%
	S. intermedius	1	0,3%	0	0,0%
	S. schleiferi subsp. *coagulans*	2	0,7%	0	0,0%
	Staphylococcus sp.	2	0,7%	0	0,0%
SCN	*S. epidermidis*	20	6,7%	20	6,7%
	S. haemolyticus	17	5,7%	17	5,7%
	S. equorum	2	0,7%	2	0,7%
	S. sciuri	2	0,7%	2	0,7%
	S. chromogenes	2	0,7%	1	0,3%
	S. saprophyticus	2	0,7%	1	0,3%
	S. simulans	1	0,3%	1	0,3%
	S. xylosus	1	0,3%	1	0,3%
	S. hominis	4	1,3%	0	0,0%
	S. warneri	2	0,7%	0	0,0%
	Total	**300**	**100,0%**	**300**	**100,0%**

SCP: *Staphylococcus* coagulase-positivas; SCN: *Staphylococcus* coagulase-negativas.

A respeito das espécies de *Staphylococcus* identificadas por ambos métodos, Guimarães et al. (2016), em um estudo com 300 cepas de *Staphylococcus* oriundos

de mastite bovina, avaliaram a concordância entre os métodos fenotípico e genotípico para a identificação das cepas, tendo sido relatada uma concordância de 96-98% entre os métodos. Os mesmos autores obtiveram 70% de isolamento de *S. aureus* seguido por 14% de *S. hyicus.* Tais pesquisadores relatam que o alto valor de concordância entre as técnicas diagnósticas evidencia que quaisquer das duas metodologias de identificação para as espécies do gênero *Staphylococcus* é válida. No presente estudo, optou-se pela utilização da identificação utilizando-se o sequenciamento genético como referência para as demais análises.

Na Tabela 2 os isolados estão divididos de acordo com sua ocorrência em amostras de mastite bovina, clínica e subclínica, tendo-se observado a ausência de diferença estatística entre as frequências de isolamentos de *Staphylococus* em ambas manifestações (p<0,05).

Tabela 2. Frequência de ocorrência (em número absoluto e porcentagem) das espécies de *Staphylococcus* isoladas de amostras de leite oriundas de mastite clínica e subclínica bovina – 2017.

Espécies	**CLÍNICA**		**SUBCLÍNICA**	
	N	**%**	**N**	**%**
S. aureus	41	71,9%	164	67,5%
S. hyicus	6	10,5%	40	16,5%
S. epidermidis	2	3,5%	18	7,4%
S. haemolyticus	3	5,3%	14	5,8%
outros *Staphylococcus*	5	8,8%	7	2,9%
Total	**57**	**100,0%**	**243**	**100,0%**

*Outros *Staphylococcus* = *S. agnetis* (N=2 clínica e N= 2 subclínica), *S. chromogenes* (N= 1 subclínica), *S. equorum,* (N=2 clínica) *S. saprophyticus* (N=1 subclínica), *S. sciuri* (N=2 subclínica), *S. simulans* (N=1 subclínica) e *S. xylosus* (N=1 clínica).

Na Tabela 3 observa-se os resultados referentes à frequência, em número absoluto, em que as espécies de *Staphylococcus* foram isoladas nas diferentes propriedades. O agente mais isolado em 10 das 11 propriedades foi o *S. aureus*, sendo que apenas na propriedade 9 o agente mais comum foi o *S. hyicus*. Esta maior frequência do *S. aureus* foi confirmada estatisticamente (p<0,05), corroborando com o resultado de Lange et al. (2011), que avaliaram 100 isolados *Staphylococcus* spp. de mastite clínica e subclínica bovina também no estado de Minas Gerais e encontraram maior frequência de *S. aureus* (83%), seguido por *S. chromogenes* e *S. hyicus.*

Tabela 3. Frequência de ocorrência (em número absoluto) das espécies de *Staphylococcus* isoladas de mastite clínica e subclínica bovina nas 11 propriedades avaliadas – 2017.

Espécies	Propriedades											Total por espécie
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
S. agnetis	1	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0	4
S. aureus	80	10	9	8	5	7	3	3	0	15	65	205
S. chromogenes	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
S. epidermidis	11	3	0	0	0	1	0	1	0	4	0	20
S. equorum	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
S. haemolyticus	8	0	0	0	2	0	0	1	0	3	3	17
S. hyicus	16	1	0	0	3	0	0	2	18	2	4	46
S. saprophyticus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
S. sciuri	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	2
S. simulans	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
S. xylosus	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Total por propriedade	**119**	**14**	**11**	**8**	**12**	**9**	**3**	**7**	**19**	**25**	**73**	**300**

Conforme Brito et al. (2001) e Freitas et al. (2005), *Staphylococcus* spp. são os agentes etiológicos mais frequentemente isolados das mastites, sendo *S. aureus* a espécie mais detectada (WATTS, 1988; BRITO et al., 1999). Porém, de acordo com Waage et al. (1999), Gentilini et al. (2002), Freitas et al. (2005) e Cunha et al. (2006), há também a presença dos SCN cuja importância como agentes causadores de infecções intramamárias em bovinos leiteiros têm aumentado em todo o mundo. De Vliegher et al. (2005) e López et al. (2015), relatam que o grupo SCN promovem infecções moderadas e queda na produção com baixo potencial de virulência.

5.3 Pesquisa do controle endógeno e dos genes codificadores de adesinas nas estirpes de *Staphylococcus* spp. utilizando-se a reação em cadeia da polimerase

Assim como no estudo de Kumar et al. (2011), foi realizada a amplificação do 16S rRNA dos *Staphylococcus* spp. isolados e confirmada a presença do gene em todas as 300 estirpes de *Staphylococcus* pesquisadas. Fitzgeral et al. (2000), descrevem que os *S. aureus* estão dentre os agentes infecciosos causadores de

mastite bovina mais frequentemente encontrados e Tristan et al. (2003) os citam como agentes comensais e patogênicos que iniciam a infecção com a adesão da bactéria ao tecido do hospedeiro. Este patógeno extracelular é capaz de causar infecções persistentes, pelos numerosos mecanismos de aderência e estratégias para conter a defesa do sistema imunológico, pois, possuem alta capacidade de produção de diversos fatores de virulência, tais como fibronectina, colágeno, proteínas e enzimas (REINOSO et al., 2008). Pyorala e Taponen (2009) descreveram similaridade na capacidade de invasão dos SCP e SCN, porém a eficiência dos *S. aureus* de invasão celular é considerada superior.

Com o intuito de avaliar a presença dos genes que conferem adesão, foram pesquisadas a presença de *cna, eno, ebp*S*, fnb*B*, fnb*A e *fib* nas 57 estirpes de *Staphylococcus* spp. isoladas de amostras de leite provenientes de animais com mastites clínicas (Tabela 4). Os genes que apresentaram maiores frequências foram *eno* (N=48; 84%), *fnb*A (N=41; 72%) e *fib* (N=34; 60%), resultados semelhantes foram verificados para *S. aureus*, sendo que a maior frequência foi verificada para *eno* (N=40; 98%), *fnb*A (N=40; 98%) e *fib* (N=34; 83%) ($p<0,05$). Os isolados de *S. chromogenes, S. saprophyticus, S. sciuri e S. simulans* não apresentaram nenhum dos genes pesquisados e por este motivo não foram incluídos na tabela.

Tabela 4. Classificação (em número absoluto e porcentagem) das estirpes de *Staphylococcus* isoladas de bovinos com mastite clínica de acordo com a presença de genes codificadores de adesinas, considerando um total de 57 isolados.– 2017.

Isolados clínicos	N	*cna*		*eno*		*ebpS*		*fnbB*		*fib*		*fnbA*	
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
S. aureus	41	22	54%	40	98%	21	51%	1	2%	34	83%	40	98%
S. haemolyticus	3	0	0%	3	100%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
S. equorum	2	0	0%	2	100%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
S. hyicus	6	1	17%	1	17%	1	17%	0	0%	0	0%	0	0%
S. epidermidis	2	0	0%	1	50%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
S. xylosus	1	0	0%	1	100%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
S. agnetis	2	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	1	50%
Total	**57**	**23**	**40%**	**48**	**84%**	**22**	**39%**	**1**	**2%**	**34**	**60%**	**41**	**72%**

Na tabela 5 estão descritas as espécies de *Staphylococcus* isoladas dos casos de mastite subclínica e os respectivos genes codificadores de adesinas

detectados. Nas espécies *S. equorum* e *S. xylosus* não foram detectados os genes pesquisados. Os genes com as maiores frequências de ocorrência, tanto para *S. aureus* quanto para as demais espécies foram *eno, fnb*A e *fib*, porém com frequências diferentes (p<0,0001).

Tabela 5. Classificação (em número absoluto e porcentagem) das estirpes de *Staphylococcus* isoladas de bovinos com mastite subclínica de acordo com a presença de genes codificadores de adesinas, considerando um total de 243 isolados.– 2017.

Isolados subclínicos	N	*cna*		*eno*		*ebpS*		*fnbB*		*fib*		*fnbA*	
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
S. aureus	164	37	23%	155	95%	48	29%	4	2%	138	84%	150	91%
S. epidermidis	18	0	0%	14	78%	1	6%	0	0%	2	11%	3	17%
S. haemolyticus	14	1	7%	11	79%	2	14%	0	0%	0	0%	2	14%
S. hyicus	40	10	25%	7	18%	0	0%	1	3%	5	13%	3	8%
S. sciuri	2	1	50%	2	100%	0	0%	0	0%	1	50%	1	50%
S. agnetis	2	0	0%	1	50%	0	0%	0	0%	1	50%	1	50%
S. saprophyticus	1	1	100%	1	100%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
S. chromogenes	1	1	100%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
S. simulans	1	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	1	100%	0	0%
Total	**243**	**51**	**21%**	**191**	**79%**	**51**	**21%**	**5**	**2%**	**148**	**61%**	**160**	**66%**

Kumar et al. (2011) relatam que o potencial de virulência é atribuído a combinação de fatores extra celulares e propriedades invasivas controladas por genes. A proteína ligadora de colágeno, responsável pela codificação do gene (*cna*) é considerada um importante fator de virulência em diversas infecções estafilocócicas, inclusive nos casos de mastite subclínica em bovinos leiteiros (ZECCONI et al., 2005). Klein et al. (2012) em um estudo sobre mastite subclínica no RJ e MG verificaram 22,4% de amostras contendo o gene *cna*, enquanto Kumar et al. (2011), na Índia, encontraram 6,3% das amostras de *S. aureus* positivas para este gene. Por sua vez, Simojoki et al. (2012) não identificaram o gene nos isolados de *Staphylococcus* oriundos de mastite. Em relação ao presente estudo, a frequência do gene *cna* nos *Staphylococcus* isolados a partir de vacas com mastite clínica (40%) foi maior que nas subclínicas (21%). Resultado similar foi observado para *S. aureus* isolados do leite de bovinos com mastite clínica (N=22; 54%) e de mastite subclínica (N=37, 23%). Kumar et al. (2011) também detectaram o gene em

amostras de leite de bovinos com mastite clínica (N=4; 8,9%) e mastite subclínica (N=4; 4,8%) identificadas como *S. aureus.*

Em relação ao gene *eno* que codifica para proteína ligadora de laminina, o presente estudo o detectou como o gene mais frequente em relação aos outros do grupo MSCRAMM, tanto em isolados de *Staphylococcus* presente nas amostras de mastites clínicas e subclínicas, respectivamente (N=48; 84%) e (N=191; 79%). Para os *S. aureus* a frequência de detecção do gene *eno* foi ainda maior nas mastites clínicas (N=40; 98%) e nas mastites subclínicas (N=155; 95%). Kumar et al. (2011) também encontraram o gene em 100% dos isolados de *Staphylococcus* presentes tanto em amostras clínicas (N=45) quanto em amostras subclínicas de mastite (N=83). Simojoki et al. (2012) relataram que o gene *eno* foi o mais detectado das adesinas pertencentes ao grupo MSCRAMM em um estudo sobre mastite por SCN com presença em 75% dos isolados. Almeida (2009) detectou a presença do gene em 44% das amostras de leite de bovinos com mastite subclínica positivas para *S. aureus.*

No presente estudo, o gene relacionado à proteína ligadora de elastina (*ebp*S) foi detectado em (N=21; 51%) e (N=48; 29%) dos *S. aureus* isolados de amostras de leite de bovinos que apresentaram mastite clínica e subclínica, respectivamente. Kumar et al. (2011) detectaram a presença do mesmo gene (N=28; 62,2%) e (N=49; 59%) em *S. aureus* isolados de mastite bovina clínica e subclínica, nessa ordem. Ikawaty et al. (2010), relataram a presença do gene em 100% dos *S. aureus* provenientes de bovinos com mastite clínica enquanto que Simojoki et al. (2012) observaram o gene em somente 4,8% dos SCN.

Quanto ao gene codificador da proteína ligadora de fibrinogênio (*fib*), foi encontrado neste estudo em frequência de ocorrência semelhante aos isolados de amostras de mastite clínicas e subclínicas (60% e 61%, respectivamente), com frequência semelhante para *S. aureus* (83% e 84%). Kumar et al. (2011) referiram a frequência do gene em (64,4% e 56,6%) dos casos de mastite clínica e subclínica por *S. aureus*, na Índia. Quanto a *Staphylococcus* provenientes de diversas origens, Tristan et al. (2003) e Booth et al. (2001) relataram a presença do gene em 80% e 20,1%, nessa ordem, enquanto Simojoki et al. (2012) descreveram a presença do gene em somente 4,8% dos SCN isolados de mastite bovina.

De acordo com Ikawaty et al. (2010) a fibronectina, representada pelos genes *fnb*A e *fnb*B*,* é um importante fator de virulência que contribui para adesão e invasão

da bactéria na glândula mamária. Estudos sobre a ligação da fibronectina de *S. aureus* às proteínas do hospedeiro, mostram a inibição da fagocitose. O gene relacionado à proteína A ligadora de fibronectina (*fnb*A) foi detectado em 98% de *S. aureus* oriundos de amostras de mastite clínica, e 91% nas manifestações de mastite subclínica, frequência alta, similar aos achados de Kumar et al. (2011), em que 100% dos isolados de *Staphylococcus aureus,* tanto para os casos clínicos quanto subclínicos apresentaram o gene. Ainda Ikawaty et al. (2010) relataram a presença de *fnb*A em 96% dos *S. aureus* isolados de mastite clínica e Salasia et al. (2004) encontraram 100% das amostras de vacas com mastite subclínica positivas para o gene *fnb*A nas cepas identificadas como *S. aureus.*

O gene *fnb*B, responsável pela codificação da proteína B ligadora de fibronectina foi detectado em apenas 2% nos casos clínicos e subclínicos de mastite por *S. aureus.* Kumar et al. (2011) também o detectaram com baixa frequência, porém maior que a relatada no presente estudo (26,7% e 19,3%) em casos de mastite clínica e subclínica bovina pelo mesmo agente. Relacionado aos *S. aureus* de mastite clínica, Ikawaty et al. (2010) encontraram o gene em 43% dos isolados, mesma frequência descrita por Tristan et al. (2003) em relação à *Staphylococcus* de origens diversas. O estudo de Simojoki et al. (2012) revelou 2,4% do gene em SCN associado à mastite bovina.

Na tabela 8 estão apresentadas as possíveis combinações entre os genes codificadores de adesinas nas 300 cepas de *Staphylococcus* spp. avaliadas de acordo com o tipo de manifestação, clínica ou subclínica. Em relação aos casos clínicos (N=57), a combinação de genes mais frequente foi *cna-eno-ebpS-fib-fnbA* (N=16; 28,07%), *eno-fib-fnbA* (N=12; 21,05%), *eno* (N=7; 12,28%) e ausência dos genes (N=6; 10,53%). Estas combinações (N=41; 71,93%) apresentaram frequência maior que todas as outras possibilidades (N=16; 28,07%) ($p<0,0001$). No caso das mastites subclínicas as principais combinações de genes encontradas foram *eno-fib-fnbA* (N=93; 38,27%), ausência de genes (N=36; 14,81%), somente *eno* (N=27; 11,11%), *cna-eno-ebpS-fib-fnbA* (N=20; 8,23%) e *eno-ebpS-fib-fnbA* (N=16; 6,58%). Estas combinações (N=192; 79,01%) apresentaram frequência maior que o restante das possibilidades (N=51; 20,99%) ($p<0,0001$).

Tabela 6. Combinações possíveis entre os genes codificadores de adesinas em 300 *Staphylococcus* spp. isolados de mastite clínica e subclínica bovina. – 2017.

Mastite Clínica (N=57)			**Mastite Subclínica (N=243)**		
combinação genes adesinas	**N**	**%**	**combinação genes adesinas**	**N**	**%**
cna-eno-ebpS-fib-fnbA	16	28,07%	*eno-fib-fnbA*	93	38,27%
eno-fib-fnbA	12	21,05%	ausência de genes	36	14,81%
eno	7	12,28%	*eno*	27	11,11%
ausência de genes	6	10,53%	*cna-eno-ebpS-fib-fnbA*	20	8,23%
cna-eno-fib-fnbA	3	5,26%	*eno-ebpS-fib-fnbA*	16	6,58%
eno-fnbA	3	5,26%	*cna-eno-ebpS-fnbA*	8	3,29%
cna-eno-ebpS-fnbA	2	3,51%	*eno-fnbA*	6	2,47%
eno-ebpS-fnbA	2	3,51%	*cna-eno-fib-fnbA*	6	2,47%
fnbA	1	1,75%	*cna-eno*	6	2,47%
eno-ebpS-fib-fnbA	1	1,75%	*fib*	5	2,06%
cna-fib	1	1,75%	*cna*	5	2,06%
eno-fnbB-fib-fnbA	1	1,75%	*eno-ebpS-fnbB-fib-fnbA*	3	1,23%
eno-ebpS	1	1,75%	*cna-eno-fnbB-fib-fnbA*	2	0,82%
cna	1	1,75%	*fnbA*	2	0,82%
			eno-fib	1	0,41%
			eno-ebpS	1	0,41%
			cna-fnbA	1	0,41%
			cna-ebpS-fib-fnbA	1	0,41%
			eno-ebpS-fnbA	1	0,41%
			cna-eno-fnbA	1	0,41%
			ebpS	1	0,41%
			cna-fib	1	0,41%

Alguns pesquisadores também avaliaram as combinações possíveis de genes codificadores de adesinas dentre os *Staphylococcus* spp. isolados de casos de mastite bovina. Kumar et al. (2011) verificaram associações de genes tendo observado as combinações *eno/fib/fnbA* (17,2%), *ebp/fib/eno/fnbA* (15,6%), *ebp/eno/fnbA* (13,3%) e *eno/fnbA* (7,8%). Zuniga et al. (2015) também relataram as combinações mais frequentes para os 106 *Staphylococcus* spp. presentes em mastite subclínica bovina, em que *eno/fnbA/fib/bap* (N=48; 45,3%) foi a mais frequente, seguida por *eno/ebp*S/*fnbA/fib* (N=8 ; 7,5%).

5.4 Pesquisa de genes codificadores de biofilme em estirpes de *Staphylococcus* spp. utilizando-se a reação em cadeia da polimerase

O biofilme é um exopolissacarídeo (matriz de múltiplas camadas celulares), considerado um importante fator de virulência de *Staphylococcus* spp., facilitando a aderência e colonização do epitélio da glândula mamária, dificultando a erradicação do patógeno e resultando em infecção persistente (ZADOKS, et al. 2002; VASUDEVAN, et al. 2003; CUCARELLA et al. 2004; VANCRAEYNEST, et al. 2004; FOX et al. 2005; MELCHIOR et al. 2006; OLIVEIRA et al., 2012). Melchior et al. (2006) referem que os biofilmes estão relacionados à patogenicidade e *Staphylococcus* formadores de biofilmes constituem as maiores causas recorrentes de mastites crônicas nos rebanhos leiteiros. Quando a mastite bovina por *Staphylococcus* spp. está associada à produção de biofilme, a severidade do quadro aumenta, assim como a capacidade de colonização (CUCARELLA et al., 2004). Cucarella et al. (2001) ainda descrevem que o biofilme pode gerar a persistência do agente no microambiente (úbere) facilitando a adesão e contribuindo para a ineficiência do tratamento com antimicrobianos, resultando em um processo crônico. Conforme Darwish et al. (2013) o monitoramento da ocorrência dos *Staphylococcus* formadores de biofilme associados a quadros de mastite, pode auxiliar no desenvolvimento de estratégias de prevenção e tratamento eficientes em bovinos acometidos.

No presente estudo, o gene *bhp* foi pesquisado em todas as 300 estirpes de *Staphylococcus* (de casos clínicos e subclínicos) não tendo sido verificada sua presença em nenhuma das amostras, somente no controle positivo para o gene, presente na cepa de *Staphylococcus* ATCC 35984, foi detectado e confirmado pelo sequenciamento. De acordo com Tormo et al. (2005), o gene *bhp* codifica para uma proteína homóloga à proteína codificada pelo gene *bap*, a qual induz um mecanismo alternativo para a formação de biofilme independente da adesão intercelular de polissacarídeos. Esta proteína foi encontrada em cepas de *S. epidermidis* isoladas de amostras de origem humana.

Nos 57 isolados de amostras clínicas, não foram encontrados os genes codificadores de biofilme em *S. chromogenes, S. saprophyticus, S. sciuri* e *S. simulans*. Nas demais espécies, o gene *bap* (N=50; 88%) foi o mais frequentemente

detectado (p<0,001), bem como não foi verificada diferença entre as frequências de ocorrência dos genes *ica*A e *ica*D. Resultado semelhante foi verificado para a espécie mais frequentemente isolada, *S. aureus*, porém com frequências distintas, onde *bap* (N=35; 85%) foi detectado com maior frequência quando comparado aos demais (p<0,001) e *ica*D (N=24; 59%) também com frequência superior aos outros genes com exceção de *bap* (p<0,01) (Tabela 7).

Tabela 7. Classificação (em número absoluto e porcentagem) das estirpes de *Staphylococcus* isoladas de mastite clínica bovina de acordo com a presença de genes de biofilme, considerando um total de 57 isolados.– 2017.

Isolados clínicos	N	*bap*		*ica*A		*ica*B		*ica*C		*ica*D	
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
S. aureus	41	35	85%	15	37%	11	27%	0	0%	24	59%
S. hyicus	6	6	100%	3	50%	0	0%	1	17%	1	17%
S. haemolyticus	3	3	100%	0	0%	0	0%	0	0%	1	33%
S. epidermidis	2	2	100%	1	50%	0	0%	1	50%	2	100%
S. equorum	2	2	100%	2	100%	0	0%	0	0%	1	50%
S. agnetis	2	1	50%	1	50%	1	50%	0	0%	1	50%
S. xylosus	1	1	100%	1	100%	0	0%	0	0%	0	0%
Total	**57**	**50**	88%	**23**	40%	**12**	21%	**2**	4%	**30**	53%

Em relação aos casos subclínicos de mastite bovina pesquisados, não foram verificadas a presença de nenhum gene de biofilme nas espécies *S equorum* e *S. xylosus.* As amostras de mastite subclínicas, isoladas de bovinos leiteiros, também se comportaram de maneira semelhante aos casos clínicos, em que *bap* foi o gene mais prevalente (p<0,0001) e não houve diferença entre os genes *ica*A e *ica*D (Tabela 8).

Tabela 8. Classificação (em número absoluto e porcentagem) das estirpes de *Staphylococcus* isoladas de mastite subclínica bovina de acordo com a presença de genes de biofilme, considerando um total de 243 isolados.– 2017.

(continua)

Isolados subclínicos	N	*bap*		*ica*A		*ica*B		*ica*C		*ica*D	
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
S. aureus	164	157	96%	71	43%	17	10%	9	5%	82	50%
S. hyicus	40	38	95%	18	45%	4	10%	2	5%	17	43%
S. epidermidis	18	18	100%	4	22%	0	0%	3	17%	10	56%
S. haemolyticus	14	14	100%	10	71%	2	14%	1	7%	3	21%

(conclusão)

Isolados subclínicos	N	*bap*		*ica*A		*ica*B		*ica*C		*ica*D	
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
S. agnetis	2	2	100%	2	100%	2	100%	2	100%	2	100%
S. chromogenes	1	1	100%	1	100%	1	100%	0	0%	1	100%
S. saprophyticus	1	1	100%	1	100%	0	0%	0	0%	0	0%
S. sciuri	2	1	50%	2	100%	1	50%	0	0%	1	50%
S. simulans	1	1	100%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
Total	**243**	**233**	96%	**109**	45%	**27**	11%	**17**	7%	**116**	48%

Segundo Cucarella et al. (2004) *S. aureus* representa o principal agente causador de infecções intramamárias em bovinos leiteiros, que em geral estão associadas com higiene precária e/ou mau funcionamento de equipamentos de ordenha. As infecções muitas vezes tornam-se crônicas devido à habilidade da bactéria em produzir biofilme, dificultando assim a fagocitose por macrófagos. Cucarella et al. (2001) descrevem a importância do biofilme e do gene *bap* nas mastites subclínicas. A proteína de superfície associada ao biofilme (*bap*) promove a ligação primária entre superfícies inertes e adesão intercelular, implicando na formação de biofilme, e levando a proteção do microrganismo frente aos antimicrobianos, resultando em infecções crônicas, fenômeno frequentemente observado em casos de mastite bovina (AMORENA et al., 1999; UBEDA et al., 2003).

No estudo de Tormo et al. (2005), os pesquisadores detectaram o gene *bap* em diversas espécies de *Staphylococcus* incluindo *S. epidermidis, S. chromogenes, S. xylosus, S. simulans* e *S. hyicus.,* embora *S. aureus* sejam mais frequentemente investigados. Cucarella et al. (2001) descrevem que os 350 isolados de *Staphylococcus aureus* oriundos de amostras de leite de bovinos com mastite, nas quais foi detectada a presença do gene *bap,* foram produtores de biofilme. Mediante a infeção experimental em camundongos, puderam verificar que o gene *bap* estava fortemente ligado à patogênese e à persistência de infecção. Em 2004, Cucarella e outros pesquisadores avaliaram 195 *S. aureus* de amostras de leite de bovinos com mastite subclínica em 13 rebanhos de Valencia (Espanha) e detectaram 184 (94,36%) amostras positivas para o gene *bap*.

Tremblay et al. (2013) verificaram a ocorrência do gene *bap* em 92% das estirpes de SCN isoladas de leite de animais com mastite em fazendas leiteiras no Canadá, alta porcentagem quando comparada ao estudo de Szweda et al. (2012),

na Polônia, que avaliaram 132 cepas de *S. aureus* associados à mastite bovina, e Cucarella et al. (2004) na Espanha, com 195 *S. aureus* também oriundos de vacas com mastite e detectaram, respectivamente 25,6% e 15,8% da presenca do gene *bap.* Por sua vez, a presença deste gene foi verificada em 95,6% de 159 isolados de *S. aureus* de leite em propriedades leiteiras pela Embrapa Gado de Leite (Juíz de Fora – MG), dados estes semelhantes aos resultados encontrados no presente estudo, no qual o gene foi detectado em (N=35; 85%) e (N=50; 88%) das amostras, respectivamente, de *Staphylococcus* spp. e *S. aureus*, isolados de mastites clínicas. Com relação às mastites subclínicas, a frequência de detecção foi um pouco mais elevada, (N=233; 96%) para *Staphylococcus* spp. e (N=157; 96%) para *S. aureus*.

Os resultados de Cucarella et al. (2001) sugerem que o *bap* é um fator importante na persistência de infecção, mas não é o único fator responsável pela adesão intercelular e pela formação de um aglomerado de células, já que o cluster *ica*ADBC possui a mesma função. Vancraeynest et al. (2004) ressaltam que os genes, *ica*A e *ica*D tem uma importância significativa na produção de biofilme em *S. aureus* e *S. epidermidis* (ARCIOLA et al., 2001).

Cucarella et al. (2004) detectaram o cluster *ica*ADBC em 50 (25,6%) das 195 amostras de *S. aureus* isoladas de leite bovinos com mastite subclínica. Vasudevan et al. (2003) isolaram 35 *S. aureus* de mastite bovina e encontraram genes causadores de biofilme *ica*A e *ica*D em todos os isolados. Tais pesquisadores relatam a habilidade dos *Staphylococcus* spp. de formar biofilme e sobreviver ao ambiente dentro do hospedeiro gerando persistência de infecção. Szweda et al. (2012) encontraram os genes *ica*A e *ica*D em todos os 132 isolados de *S. aureus* avaliados, e Melchior et al. (2009), detectaram 74 dos 99 isolados de *S. aureus* positivos para *ica*A e *ica*D. Ciftici et al. (2009) avaliaram 59 isolados de *S. aureus* de de leite apresentando mastite bovina e verificaram que 16 foram positivos para *ica*A e 38 para *ica*D, e 15 para ambos os genes. Felipe et al. (2017) detectaram em todas as 209 estirpes de *S. aureus*, isoladas de bovinos com mastite em propriedades leiteiras na Argentina, os genes *ica*A e *ica*D. Outro grupo de pesquisadores na Índia encontrou 102 amostras de *S. aureus* de leite de vacas com mastite e revelelaram a presenca de 35 deles com ambos os genes (DHANAWADE et al., 2010).

A maioria dos pesquisadores relatam similaridade nos resultados para *ica*A e *ica*D, semelhante ao encontrado no presente estudo, em que as frequências detectadas para o gene *ica*A se apresentaram entre 37-45% e para o gene *ica*D

entre 48-59%, sem diferença estatística para ambas manifestações de mastite bovina, considerando todos os 300 *Staphylococcus* isolados. Entretanto, outros estudos sugerem maior frequência de *ica*D conforme dados de Darwish et al. (2013) que relataram maior incidência para *ica*D em relação ao *ica*A, assim como Ciftci et al. (2009) em 59 *Staphylococcus* isolados de vacas com mastite subclínica com frequência (N=16 e N=38) para *ica*A e *ica*D respectivamente. Marques et al. (2013) avaliaram 272 amostras de leite bovino provenientes de 8 propriedades do Sul do Rio de Janeiro e identificaram 250 isolados de *Staphylococcus* spp. e detectaram em *ica*A (N=64; 25,6%) e (N=97, 38,8%) nas amostras com *ica*D positivos.

Conforme relato de Arciola et al. (2005) parece haver interação dos genes *ica*A e *ica*D, já que as funções de *ica*B e *ica*C não estão bem estabelecidas, sugerindo-se que codificam para glicosamina. O cluster *ica loccus* sugere que todos os genes estejam presentes, ou ausentes, o que não foi possível verificar no presente estudo, já que foram identificadas diferentes frequências para os genes *ica*A, *ica*B, *ica*C, *ica*D*,* com baixas frequências para *ica*B e *ica*C.

Na Tabela 9 observa-se as combinações possíveis de genes que codificam para biofilme nos isolados de *Staphylococcus* oriundos de animais com mastite clínica e subclínica*.* Com relação aos casos clínicos, as combinações de maior ocorrência foram *bap-ica*D (N=14; 24,56%), seguida por *bap* (N=12; 21,05%), *bap-ica*A (N=9; 15,79%) combinações totalizaram 61,4% do total (N=35), sendo esta frequência superior à das demais combinações descritas (22, 38,6%) (p<0,02).

No caso das mastites subclínicas a principal combinação de genes foi *bap* (N=73; 30,04%), seguida por *bap-ica*D (N=46; 18,93%), *bap-ica*A-*ica*D (N=41; 16,87%) e por fim *bap-ica*A (N=40; 16,46%), combinações estas totalizando 82,3% (N=200), com frequência maior que as demais combinações (N=43; 17,7%) (p<0,0001).

Tabela 9. Combinações possíveis entre os genes codificadores de biofilmes em 300 *Staphylococcus* spp. isolados de mastite clínica e subclínica bovina. – 2017 (continua)

Mastite Clínica (N=57)			**Mastite Subclínica (N=243)**		
combinação genes biofilme	**N**	**%**	**combinação genes biofilme**	**N**	**%**
bap-icaD	14	24,56%	*bap*	73	30,04%
bap	12	21,05%	*bap-icaD*	46	18,93%
bap-icaA	9	15,79%	*bap-icaA-icaD*	41	16,87%

(conclusão)

Mastite Clínica (N=57)			Mastite Subclínica (N=243)		
combinação genes biofilme	**N**	**%**	**combinação genes biofilme**	**N**	**%**
bap-icaA-icaD	4	7,02%	*bap-icaA*	40	16,46%
bap-icaA-icaB-icaD	3	5,26%	*bap-icaA-icaB-icaC-icaD*	11	4,53%
bap-icaB	3	5,26%	*bap-icaA-icaB-icaD*	10	4,12%
bap-icaB-icaD	3	5,26%	*ausência de genes*	7	2,88%
icaA	2	3,51%	*bap-icaC-icaD*	4	1,65%
bap-icaA-icaC-icaD	2	3,51%	*bap-icaA-icaB*	3	1,23%
icaA-icaB	1	1,75%	*bap-icaB*	3	1,23%
icaB-icaD	1	1,75%	*bap-icaA-icaC-icaD*	2	0,82%
icaA-icaB-icaD	1	1,75%	*icaD*	1	0,41%
icaA-icaD	1	1,75%	*icaA-icaD*	1	0,41%
icaD	1	1,75%	*icaA*	1	0,41%

Tais dados sugerem uma correlação entre *bap* e *ica loccus.* Felipe et al. (2017) relataram combinações de genes provocando biofilme em 127 cepas de *S. aureus* isoladas de mastite bovina, sendo que a mais frequente delas foi para *ica*A-*ica*D-*bap* com 67,72% (N=86/127), tendo sido apresentadas outras combinações, como as descritas no presente estudo. Tormo et al. (2005) isolaram 131 SCN de bovinos, caprinos e ovinos com mastite e identificaram o gene *bap* sendo que, em todos os isolados que apresentaram o gene, verificou-se a expressão do biofilme. O *loccus* de *ica*ADBC se mostrou ausente em todas as amostras *bap* positivas, sugerindo que apenas a presença do gene *bap* seria suficiente para que houvesse a formação de biofilme.

Avaliando a Tabela 9 foi possível constatar que, dentre as combinações descritas, a segunda mais frequente para os isolados de mastites clínicas foi o gene *bap* (12, 21,05%). Para os isolados de mastites subclínicas, o mesmo gene apareceu com maior frequência (73, 30,04%) em relação aos demais. A combinação *ica*A-*ica*D-*bap* também foi relatada por Salimena et al. (2016) em 152 de 159 isolados de *S. aureus*. Cucarella et al. (2004) relatam que todos os isolados de *Staphylococcus* em que foram detectados o *loccus ica*ADBC e o gene *bap*, apresentaram elevada produção de biofilme. Nas amostras em que *bap* foi negativo e *icas* positivos, houve baixa produção de biofilme, demonstrando que a não detecção do gene *bap* implica na baixa produção de biofilme.

Tais estudos revelam a importância da produção de biofilme como fator de virulência para os *Staphylococcus* causadores de mastite bovina. A detecção dos genes pode auxiliar no tratamento dos animais acometidos com o intuito minimizar a gravidade da enfermidade e providenciar novas estratégias de prevenção e controle da afecção (DARWISH et al., 2013).

5.5 Avaliação da sensibilidade *in vitro* das estirpes de *Staphylococcus* spp. isoladas frente aos antimicrobianos

Os antimicrobianos são comumente utilizados nas terapias de vacas secas e em lactação para tratamento e controle de doenças. Pesquisadores relatam a ocorrência de resistência bacteriana aos medicamentos mais utilizados como os betalactâmicos e aos aminoglicosídeos em menor proporção (MYLLYS et al., 1998, YOSHIMURA et al. 2002; GENTILINI et al., 2002; LUTHJE e SCHWARZ, 2006). Desta foma, o antibiograma, que emprega a técnica de difusão do antibiótico em ágar, é bastante utilizado como ferramenta para diagnóstico terapêutico, apresentando resultados de sensibilidade a determinados antimicrobianos. No presente estudo, foram avaliados os perfis de sensibilidade e resistência das 300 estirpes de *Staphylococcus* spp. isoladas e os resultados obtidos estão apresentados nas Tabela 10 (57 isolados de mastite clínica) e Tabela 11 (243 isolados de mastite subclínica). Todos os *Staphylococcus* isolados (100%) de origem clínica e subclínica apresentaram sensibilidade à cefalotina.

De acordo com o CLSI (2013) a interpretação do resultado da ampicilina pode ser utilizada para a amoxicilina. No tocante à oxacilina, a sensibilidade deve ser avaliada de acordo com os resultados obtidos para os testes com cefoxitina (CLSI, 2013). Dessa maneira, para as amostras isoladas de mastite clínica foram observados elevados índices de sensibilidade frente à oxacilina (93%) bem como para gentamicina (91,2%). Os maiores índices de resistência (42,1%) foram verificados para amoxicilina, ampicilina e penicilina, em comparação aos demais antimicrobianos testados ($p<0,0001$) (Tabela 10).

Tabela 10. Classificação (em número absoluto e porcentagem) das estirpes de *Staphylococcus* isoladas de mastite clínica bovina de acordo com a sensibilidade *in* vitro aos antimicrobianos testados, considerando um total de 57 isolados.– 2017.

Antimicrobianos	Sensível		Resistente	
	N	%	N	%
ampicilina (10µg)	33	57,9%	24	42,1%
cefalotina (30µg)	57	100,0%	0	0,0%
gentamicina (10µg)	52	91,2%	5	8,8%
oxacilina (10µg)	53	93,0%	4	7,0%
penicilina (10 U.I.)	33	57,9%	24	42,1%

Os resultados para ampicilina podem ser reportados para amoxicilina (CLSI, 2013).

Nos isolados de *Staphylococcus* obtidos de leite de bovinos com mastite subclínica, a maior frequência de sensibilidade foi verificada para cefalotina (100%), gentamicina (95,9%) e oxacilina (86%). Os maiores índices de resistência também foram verificados para amoxicilina (59,7%), ampicilina (59,7%) e penicilina (58,4%), sendo maiores que de outros antimicrobianos analisados e não apresentando diferenças estatísticas entre si ($p<0,05$) (tabela 11).

Tabela 11. Classificação (em número absoluto e porcentagem) das estirpes de *Staphylococcus* isoladas de mastite subclínica bovina de acordo com a sensibilidade *in* vitro aos antimicrobianos testados, considerando um total de 243 isolados.– 2017.

Antimicrobianos	Sensível		Resistente	
	N	%	N	%
ampicilina (10µg)	98	39,7%	145	59,7%
cefalotina (30µg)	243	100,0%	0	0,0%
gentamicina (10µg)	233	95,9%	10	4,1%
oxacilina (10µg)	209	86,0%	34	14,0%
penicilina (10 U.I.)	101	41,6%	142	58,4%

Os resultados para ampicilina podem ser reportados para amoxicilina (CLSI, 2013).

Comparando-se os resultados obtidos dos casos de mastite clínica e subclínica bovina, pode-se constatar que não houve diferença estatística com relação ao perfil de sensibilidade ou resistência apresentado pelos microrganismos frente aos antimicrobianos testados ($p<0,05$).

Sawant et al. (2009) relatam que a oxacilina é utilizada como padrão de interpretação de resistência à meticilina e, de acordo com o CLSI (2013), os resultado obtidos para a sensibilidade à oxacilina podem ser extrapolados para os demais betalactâmicos. Entretanto, os dados apresentados nas Tabelas 10 e 11, permitem observar diferenças entre os resultados de sensibilidade dos betalactâmicos avaliados. Assim sendo, foram realizados testes de concordância, Kappa e Pabak para avaliação dos resultados referentes à oxacilina frente à ampicilina/amoxicilina, bem como frente à cefalotina e penicilina (Tabela 12).

Tabela 12. Relação de concordância, índice Kappa e Pabak entre os antimicrobianos pertencentes ao grupo dos betalactâmicos com a oxacilina, número absoluto e porcentagem de sensíveis e resistentes ao antibiograma das 300 cepas de *Staphylococcus* spp. oriundas de mastite clínica e subclínica bovina. – 2017.

Relação Oxacilina com os betalactâmicos								
	Total	**Concordância**	**Kappa**	**Pabak**	**Resistência**		**Sensibilidade**	
Betalactâmicos	**N**	**%**	**%**	**%**	**N**	**%**	**N**	**%**
Ampicilina	159	53	14,1	6,0	33	86,8	126	48,1
Cefalotina	262	87,3	0,0	74,6	0	0,0	262	100,0
Penicilina	162	54,0	14,7	8,0	33	86,8	129	49,2

Os resultados para ampicilina podem ser reportados para amoxicilina (CLSI, 2013).

A fim de analisar a relação de resistência da oxacilina com os demais betalactâmicos estudados (ampicilina, amoxicilina, cefalotina e penicilina) foram reportadas na Tabela 12 as estatísticas de concordância simples, Kappa e Pabak. Quando analisadas as concordâncias pela estatística simples, observa-se uma elevada relação entre oxacilina e cefalotina (87,3%) e relações regulares entre oxacilina e ampicilina/amoxicilina (53%) e oxacilina e penicilina (54%).

A segunda medida de associação apresentada é o Kappa, que é amplamente utilizada por ser mais robusta que a concordância simples, pois teoricamente leva em consideração a possibilidade da concordância ocorrer pelo mero acaso. Observando os resultados, há uma relação pobre entre a oxacilina e os outros quatro antibióticos, com Kappas abaixo de 15%, conforme as medidas de Landis e Koch (1977) para definição de intervalos de Kappa.

Por fim, foram apresentados os cálculos do Pabak, que é uma correção do Kappa (CHEN et al., 2009) elaborada a fim de corrigir um viés neste último em casos em que há uma elevada concordância em apenas um dos casos "sensível-sensível" ou "resistente-resistente". Pelo critério do Pabak, pode-se observar uma boa concordância entre oxacilina e cefalotina (74%), mas uma baixa associação da oxacilina com os demais antibióticos. Conclui-se, assim, que não há forte evidência de que os resultados de resistência e sensibilidade à oxacilina possam ser estendidos para os demais betalactâmicos.

Os betalactâmicos são amplamente utilizados na prevenção e/ou tratamento para mastite em gado leiteiro. Pesquisadores como Gentilini et al. (2002) e Taponen et al. (2006) referem a resistência aos betalactâmicos em casos de mastite de bovinos leiteiros e conforme Martins et al. (2016) em menor proporção aos aminoglicosídeos. Owens et al. (1997) ressaltam que o tratamento intramamário nem sempre é efetivo, podendo apresentar cura em até 71% das mastites causadas por *Staphylococcus* e uma redução na sensibilidade ao grupo dos betalactâmicos em 47%. Semelhante aos resultados reportados no presente estudo, Costa et al. (2012) avaliaram o perfil de sensibilidade de 352 isolados de *Staphylococcus* procedentes de mastite bovina, tendo sido detectada resistência para penicilina G (81,87% das cepas), ampicilina (81,4%), oxacilina (1,98%), gentamicina (1,7%) e cefalotina (0,28%). Por sua vez, Russi et al. (2008) que avaliaram 95 *S. aureus* isolados de amostras de mastite clínica (N=25) e subclínica (N=70) em rebanhos na Argentina detectaram resistência para penicilina, gentamicina e oxacilina em 48,4%, 2,1% e 0% das cepas, respectivamente.

Brito et al. (2001) avaliaram os perfis de sensibilidade para ampicilina, cefalotina, gentamicina, oxacilina e penicilina G, em 112 amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de infecções intramamárias (clínicas e subclínicas) em rebanhos leiteiros no Estado de Minas Gerais. Com relação à gentamicina e oxacilina, 100% das amostras foram sensíveis e 65% foram sensíveis a ampicilina e penicilina G. O nível de resistência para ampicilina e penicilina foi maior nas amostras isoladas nos casos clínicos que nos casos subclínicos. Os resultados das pesquisas relatadas se apresentaram semelhantes aos detectados no presente estudo, em que a sensibilidade à oxacilina e gentamicina foi de aproximadamente 90%, para ampicilina e amoxicilina entre 40-58% e para penicilina

entre 41,6-57,9%, mas sem diferença estatística entre os resultados quando consideradas amostras de origem clínica e subclínica.

5.6 Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) aos antimicrobianos pelo método de E-test referentes aos isolados que apresentaram resistência nos antibiogramas

Os antimicrobianos são frequentemente utilizados para tratamentos de mastite bovina mas, muitas vezes, pode-se observar resistência bacteriana, definida como a capacidade da bactéria em sobreviver a uma determinada concentração do antimicrobiano ao qual ela foi exposta. Sendo assim, a sensibilidade antimicrobiana também pode ser avaliada por intermédio da determinação da concentração mínima inibitória (MIC), ou seja, a concentração mínima do antimicrobiano que é capaz de inibir o crescimento bacteriano, fornecendo resultados quantitativos. De acordo com Saini et al. (2012), os valores de MIC_{50} e MIC_{90}, representam a concentração mínima do antimicrobiano capaz de inibir o crescimento bacteriano em ≥50% e ≥90% das amostras respectivamente.

As amostras que apresentaram resistência nos antibiogramas foram avaliadas quanto ao MIC. Com relação à amoxicilina e ampicilina, verificou-se que uma maior frequência de isolados (118, 78,2%) apresentou MICs no intervalo entre 0,5 - 2µg/mL ($p<0,05$), sendo que o MIC_{50} foi ≤1 e MIC_{90} ≤8. Deve-se ressaltar que 18 (10,6%) das amostras de *Staphylococcus* spp. consideradas resistentes aos antimicrobianos relacionados aos testes de sensibilidade *in vitro* (antibiograma) foram sensíveis pelas interpretações do MIC, de acordo com os pontos de corte (*breakpoints*) utilizados para este método (CLSI, 2013). Dentre as 18 amostras que se apresentaram sensíveis, 3 (1,7%) apresentaram MIC de 0,12µg/mL, 14 (8,2%) de 0,25µg/mL e 1 (0,5%) de 0,06µg/mL (Tabela 13).

Tabela 13. Distribuição das MICs de Amoxicilina e Ampicilina pela técnica de E-test®.

	Amoxicilina e Ampicilina (N= 151)	
Concentração (µg/mL)	**N**	**%**
0,50	50	33,1%
1	35	23,2%
2	33	21,9%
4	14	9,3%
8	10	6,6%
16	5	3,3%
32	2	1,3%
64	1	0,7%
128	0	0,0%
≥ 256	1	0,7%
Total	**151**	**100,0%**

Pontos de corte (*breakpoints*) para amoxicilina e ampicilina: sensibilidade ≤0,25; resistência ≥0,5 µg/ml (CLSI, 2013).

Com relação à gentamicina observou-se que os isolados (N=15) apresentaram MICs no intervalo entre 16 a ≥ 256µg/mL. O MIC_{50} para gentamicina foi de ≤64 e o de MIC_{90} foi ≥256, ($p<0,05$) (Tabela 14).

Tabela 14. Distribuição das MICs de Gentamicina pela técnica de E-test®.

	Gentamicina (N=15)	
Concentração (µg/mL)	**N**	**%**
16	2	13,3%
32	3	20,0%
64	3	20,0%
128	2	13,3%
≥ 256	5	33,3%
Total	**15**	**100,0%**

Pontos de corte (*breakpoints*) para gentamicina: sensibilidade ≤4; intermediário = 8; resistência ≥16µg/ml (CLSI, 2013).

No tocante à oxacilina, observou-se uma maior frequência de isolados (N=35) apresentaram MICs no intervalo entre 0,5 - 8µg/mL ($p<0,05$). O MIC_{50} para oxacilina foi de ≤1 e para MIC_{90} foi de ≤8 (Tabela 15).

Tabela 15. Distribuição das MICs de Oxacilina pela técnica de E-test®.

	Oxacilina (N=38)	
Concentração (µg/mL)	**N**	**%**
0,50	10	26,3%
1	12	31,6%
2	4	10,5%
4	4	10,5%
8	5	13,2%
16	0	0,0%
32	0	0,0%
64	1	2,6%
128	0	0,0%
≥ 256	2	5,3%
Total	**38**	**100,0%**

Pontos de corte (*breakpoints*) para oxacilina: *Staphylococcus aureus* - sensibilidade ≤4; resistência ≥ 8µg/ml; *Staphylococcus* spp. - sensibilidade ≤0,25; resistência ≥0,5 µg/ml (CLSI, 2013).

Em relação às 166 amostras resistentes à penicilina no antibiograma, verificou-se que uma maior frequência de isolados (N=67) distribuídos no intervalo de MICs 2 - 4µg/mL ($p<0,05$). O MIC_{50} para este antimicrobiano foi ≤4 e para MIC_{90} ≤32 (Tabela 16).

Tabela 16. Distribuição das MICs de Penicilina pela técnica de E-test®.

	Penicilina (N=166)	
Concentração (µg/mL)	**N**	**%**
0,25	5	3,0%
0,50	7	4,2%
1	19	11,4%
2	30	18,1%
4	37	22,3%
8	24	14,5%
16	26	15,7%
32	5	3,0%
64	0	0,0%
128	0	0,0%
≥ 256	13	7,8%
Total	**166**	**100,0%**

Pontos de corte (*breakpoints*) para penicilina: sensibilidade ≤0,12; resistência ≥0,25 µg/ml. (CLSI, 2013).

As distribuições das frequências de ocorrência de cepas nas concentrações mínimas inibitórias referentes a cada antimicrobiano e os respectivos MIC_{50} e MIC_{90}, assim como o intervalo de MICs observados para cada antimicrobiano estão reportados na Tabela 17.

Tabela 17. Sensibilidade *in vitro* dos *Staphylococcus* spp. obtidos de mastite bovina que se mostraram resistentes ao antibiograma e ao MIC, número absoluto, concentrações e intervalos correspondentes - 2017.

Antimicrobianos	N Total	Resultados (µg/mL)		
		MIC_{50}	MIC_{90}	Intervalo MIC
Ampicilina e Amoxicilina	151	≤ 1	≤ 8	0,5 - ≥256
Gentamicina	15	≤ 64	≥ 256	16 - ≥256
Oxacilina	38	≤ 1	≤ 8	0,5 - ≥256
Penicilina	166	≤ 4	≤ 32	0,25 - ≥256

MIC_{50} – valor de inibição de crescimento bacteriano para 50% dos isolados; MIC_{90} valor de inibição de crescimento bacteriano para 90% dos isolados.

A resistência aos betalactâmicos (penicilinas e cefalosporinas) ocorre devido a ampla utilização dessa classe de antibióticos para tratamento e controle de mastite em diversos rebanhos leiteiros, bem como à utilização inadequada desses medicamentos, como baixa dosagem e curto tempo de tratamento (SAINI et al., 2012). Por essa razão, muitas vezes a resistência bacteriana está associada a uma baixa taxa de cura (BARKEMA et al., 1999). Saini et al. (2012) coletaram amostras de leite de animais com mastite em fazendas no Canadá e avaliaram o MIC dos antimicrobianos mais frequentemente utilizados para o tratamento, como ampicilina, oxacilina e penicilina. Para ampicilina e penicilina verificou-se MIC_{50} e MIC_{90} de ≤0,12µg/mL e para oxacilina, tanto MIC_{50} quanto o MIC_{90} foram de ≤2µg/mL. Brito et al. (2001) determinaram o MIC frente a estes mesmos antimicrobianos bem como à gentamicina, relativos a 112 amostras de *S. aureus* isoladas de infecções intramamárias bovinas sendo que, os MIC_{50} e MIC_{90} para ampicilina foram de 0,125µg/mL e 1µg/mL, de 0,25µg/mL e 0,5µg/mL para gentamicina, de 0,25µg/mL para ambos os MICs de oxacilina, e de 0,06µg/mL- 0,5µg/mL para penicilina.

Semelhante aos trabalhos anteriores Oliveira et al. (2012) avaliaram 58 cepas de *S. aureus* oriundas de casos clínicos e outros 58 de mastites subclínicas. Foram testados os perfis de sensibilidade para ampicilina, oxacilina e penicilina (CLSI,

2008) sendo que 75% das amostras foram suscetíveis aos antimicrobianos testados e todos os isolados foram inibidos na concentração de ≤0,5µg/mL. Não foi observada resistência à oxacilina assim como para cefalotina, semelhante ao relatado no presente estudo e conforme Pol e Ruegg (2007) este é um dos motivos pelos quais a cefalotina tem sido bastante utilizada nos tratamentos da afecção. Similar à estudos anteriores a resistência à penicilina é bastante reportada (MYLLYS et al., 1998; RABELLO et al., 2005). Cervinkova et al. (2013) também relataram que não ter observado resistência à gentamicina e cefalotina.

Russi et al. (2008) avaliaram a resistência de 95 *S.aureus* isolados de mastite clínica (N=25) e subclínica (N=70) frente à penicilina, oxacilina e gentamicina sendo que os valores de MIC_{50} e MIC_{90} para esses antibióticos foram de, respectivamente, ≤0,06µg/mL e ≤4µg/mL, ≤0,25µg/mL para ambos, ≤0,25µg/mL e ≤0,5µg/mL. Na pesquisa de Yoshimura et al. (2002) foram estudados 51 isolados de *S. aureus* oriundos de mastite bovina tendo-se avaliado o MIC para penicilina e gentamicina, sendo que os valores de MIC_{50} e MIC_{90} para penicilina foram de, respectivamente, ≤0,1µg/mL e ≤0,78µg/mL, e para gentamicina foram de ≤0,2µg/mL e ≤0,39µg/mL. Sendo assim, verifica-se que os resultados desta pesquisa referiram MIC mais elevado para penicilina e gentamicina, quando comparado aos resultados de outros pesquisadores, relacionado a um possível aumento de resistência do patógeno em questão.

5.7 Pesquisa de genes que conferem resistência antimicrobiana em estirpes de *Staphylococcus* spp. utilizando-se a reação em cadeia da polimerase

Conforme Mestorino e Errecalde (2012) a infecção intramamária é a principal razão para o uso de antimicrobianos em vacas leiteiras, os quais tem sido utilizados para o tratamento de mastite há mais de 50 anos. Koneman et al. (1997) relatam que os genes que codificam para resistência aos antimicrobianos podem estar localizados no cromossomo (mais estável), ou em plasmídeos (facilmente transferidos de uma linhagem para outra por conjugação bacteriana, por exemplo). De acordo com Neves et al. (2007) a resistência pode ser adquirida

espontaneamente por mutações genéticas e transferidas de uma célula doadora para outras células.

Com relação aos resultados obtidos no presente estudo, foram pesquisadas em todas as estirpes de *Staphylococcus* isoladas, a presença de genes codificadores de resistência antimicrobiana. Tabela 18 apresenta os resultados para a detecção de genes que conferem resistência a diferentes antimicrobianos referentes aos isolados de *Staphylococcus* de casos clínicos de mastite bovina. Pode-se observar que para as espécies de *S. chromogenes, S. epidermidis, S. saprophyticus, S. sciuri e S. simulans* não foram detectados nenhum dos genes pesquisados. Os genes *fem*A e *fem*B foram os mais frequentes (N=43; 75%) (p<0,0001). O gene $mecA_{LGA251}$ foi detectado em uma cepa (2%) na qual também foi verificado o gene *mec*A.

Tabela 18. Classificação (em número absoluto e porcentagem) das estirpes de *Staphylococcus* isoladas de mastite clínica bovina de acordo com a presença de genes de resistência aos antimicrobianos, considerando um total de 57 isolados.– 2017.

Isolados clínicos	N	*fem*A		*fem*B		*mec*A		*aac*A-*aph*D		$mecA_{LGA251}$		*bla*Z	
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
S. aureus	41	40	98%	40	98%	7	17%	9	22%	0	0%	1	2%
S. agnetis	2	2	100%	2	100%	1	50%	2	100%	0	0%	0	0%
S. xylosus	1	1	100%	1	100%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
S. equorum	2	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	1	50%	1	50%
S. haemolyticus	3	0	0%	0	0%	1	33%	3	100%	0	0%	2	67%
S. hyicus	6	0	0%	0	0%	3	50%	2	33%	0	0%	1	17%
Total	**57**	**43**	75%	**43**	75%	**12**	21%	**16**	28%	**1**	2%	**5**	9%

Tabela 19 estão apresentados os resultados referentes às cepas de *Staphylococcus* isoladas de mastite subclínica. Não foram detectados os genes pesquisados nas espécies *S. chromogenes, S. equorum, S. saprophyticus, S. simulans* e *S. xylosus.* Semelhante ao observado para os casos clínicos, os genes mais frequentemente detectados foram *fem*A (N=133; 81%) e *fem*B (N=124; 76%), tendo estas frequências sido maiores que as dos outros genes pesquisados (p<0,0001). Em uma das cepas foi verificado o gene $mecA_{LGA251}$ não tendo sido verificado o gene *mec*A neste isolado.

Tabela 19. Classificação (em número absoluto e porcentagem) das estirpes de *Staphylococcus* isoladas de mastite subclínica bovina de acordo com a presença de genes de resistência, considerando um total de 243 isolados.– 2017.

Isolados subclínicos	N	*fem*A		*fem*B		*mec*A		*aac*A-*aph*D		$mecA_{LGA251}$		*bla*Z	
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
S. aureus	164	133	81%	124	76%	7	4%	6	4%	0	0%	28	17%
S. hyicus	40	7	18%	8	20%	8	20%	8	20%	1	3%	7	18%
S. epidermidis	18	3	17%	4	22%	13	72%	13	72%	0	0%	3	17%
S. haemolyticus	14	3	21%	1	7%	3	21%	3	21%	0	0%	2	14%
S. agnetis	2	1	50%	1	50%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
S. sciuri	2	0	0%	0	0%	2	100%	0	0%	0	0%	0	0%
Total	**243**	**147**	60%	**138**	57%	**33**	14%	**30**	12%	**1**	0%	**40**	16%

Conforme Kobayashi e colaboradores (1994) os genes *fem*A e *fem*B são genes cromossômicos associados à expressão de alto nível de resistência à meticilina. Caracterizam-se por codificarem proteínas que influenciam no nível de resistência à meticilina dos *S. aureus* e são considerados específicos para este agente A detecção dos mesmos pela técnica de PCR é um indicador para sugerir um MRSA (KOBAYASHI et al., 1994; BERGER-BACHI et al. 2002). Com relação ao gene *fem*A, Lange et al. (2011) avaliaram 100 isolados de *Staphylococcus* spp. oriundos de bovinos que apresentaram mastite no estado de Minas Gerais e detectaram o gene em 83 amostras, confirmando ser *S. aureus.* Para confirmação da espécie, foi realizado o sequenciamento de apenas 6 amostras e extrapolados os resultados para as demais cepas, sendo identificadas como *S. aureus*. Kobayashi et al. (1994) reportaram 89,4% (177/198) da presença do gene *fem*A e concluíram que os positivos para o gene eram *S. aureus,* assim como Dias et al. (2011) que também relataram a presença do gene em 145 cepas (72,5%) e inferiram ser *S. aureus,* oriundos de tanques de expansão de propriedades de Sete Lagoas - MG. Costa et al. (2012) caracterizaram os *S. aureus* pela presença do gene *fem*A em 59 isolados de casos de mastite bovina clínica e 293 de subclínica; da mesma maneira Veh et al. (2015) isolaram 285 *S. aureus* de bovinos com mastite subclínica no Canadá e em todas as cepas foram identificados o gene *fem*A.

No presente estudo, verificou-se que 98% (40/41) dos *S. aureus* isolados de amostras de bovinos com mastite clínica apresentaram o gene *fem*A, o qual também

foi encontrado em *S. agnetis* 100% (2/2) e em 100% de *S. xylosus* (1/1). Com relação aos *Staphylococcus* isolados de bovinos com mastite subclínica, o gene *femA* foi identificado em 81% (133/164) dos *S. aureus*, 18% (7/40) de *S. hyicus,* 17% (3/18) de *S. epidermidis,* 21% (3/14) de *S. haemolyticus,* 50% (1/2) de *S. agnetis.* Todas as espécies foram confirmadas pelo sequenciamento, o que indicou que o *fem*A pode ser encontrado em outras espécies de *Staphylococcus.*

Na tabela 20 verifica-se a frequência de ocorrência de *fem*A nas espécies de SCP e SCN. Deve-se ressaltar que nas espécies *S. sciuri, S. simulans, S. equorum, S. saprophyticus* e *S. chromogenes* não foi detectado o gene *fem*A. Pode-se verificar a presença do gene em outras espécies que não *S. aureus*, inclusive no grupo SCN. Assim como para outros pesquisadores (KOBAYASHI et al., 1994; LANGE et al. 2011, COSTA et al., 2012; VEH et al. 2015), os isolados de *S. aureus* apresentaram o gene *fem*A, porém não na totalidade das amostras (somente em 84,4% dos mesmos), inferindo-se em um possível erro de 15,6% ao afirmar que todos os *Staphylococcus* que possuem *fem*A são *S. aureus.*

Tabela 20. Classificação (em número absoluto e porcentagem) das 300 estirpes de *Staphylococcus* spp isoladas de mastite clínica e subclínica bovina de acordo com a presença ou ausência do gene *fem*A – 2017.

			***fem*A (N=190)**			
Grupo	**Espécies**	**N total**	**+ *fem*A**	**% *fem*A +**	**- *fem*A**	**% *fem*A -**
SCP	*S. aureus*	205	173	84,4%	32	15,6%
	S. hyicus	46	7	15,2%	39	84,8%
	S. agnetis	4	3	75,0%	1	25,0%
SCN	*S. epidermidis*	20	3	15,0%	17	85,0%
	S. haemolyticus	17	3	17,6%	14	82,4%
	S. xylosus	1	1	100,0%	0	0,0%

Quanto ao gene *fem*B, a frequência de detecção foi semelhante quando considerados os isolados de mastites clínicas e subclínicas e com frequência de ocorrência similar o gene *fem*A. Kobayashi et. al (1994) detectaram *fem*B em 192 dos 198 (97%) isolados de *S. aureus*, não tendo sido verificado em SCN. López-Vazques et al. (2015) obtiveram resultado abaixo do verificado pelo presente estudo, sendo que avaliaram 302 amostras de leite sem sinais visuais de mastite,

provenientes de 27 propriedades de exploração leiteira no México, e isolaram 85 (28,1%) estirpes de *S. aureus* positivos para o gene *fem*B.

Analisando a Tabela 21, verifica-se a relação entre a presença do gene e a correlação com a resistência apresentada pelo antibiograma. A cefalotina não foi reportada pois, detectou-se 100% de sensibilidade frente a mesma. Para os genes *fem*A e *fem*B foram verificados resultados semelhantes, em que a presença ou ausência dos genes não foi significante para a manifestação de resistência. Os antimicrobianos com maior frequência de resistência (amoxicilina, ampicilina e penicilina) foram maiores que todos os outros avaliados ($p<0,0001$). Com relação à oxacilina a frequência de resistência se mostrou maior quando os genes *fem*A e *fem*B não foram detectados ($p<0,001$), diferentemente dos resultados apresentados por Kobayashi et al. (1994), em que não houve diferença com relação à presença ou ausência do gene *fem*B em *Staphylococcus* oxacilina-resistentes.

Tabela 21. Relação entre a presença do gene e a resistência demonstrada por intermédio do antibiograma das 300 cepas de *Staphylococcus* spp. isolados de mastite clínica e subclínica bovina. – 2017.

gene	Detecção gene	N	%	Ampicilina; Amoxicilina		Oxacilina		Penicilina		Gentamicina	
				N	%	N	%	N	%	N	%
femA	presente	190	63%	105	55,3%	9	4,7%	102	53,7%	5	2,6%
	ausente	110	37%	64	58,2%	29	26,4%	64	58,2%	10	9,1%
femB	presente	181	60%	96	53,0%	8	4,4%	93	51,4%	6	3,3%
	ausente	119	40%	73	61,3%	30	25,2%	73	61,3%	9	7,6%
mecA	presente	45	15%	25	55,6%	17	37,8%	25	55,6%	10	22,2%
	ausente	255	85%	144	56,5%	21	8,2%	141	55,3%	5	2,0%
$mecAL_{GA251}$	presente	2	1%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
	ausente	298	99%	169	56,7%	38	12,8%	166	55,7%	15	5,0%
blaZ	presente	45	15%	36	80,0%	7	15,6%	36	80,0%	3	6,7%
	ausente	255	85%	133	52,2%	31	12,2%	130	51,0%	12	4,7%
aacA-aphD	presente	46	15%	23	50,0%	15	32,6%	23	50,0%	14	30,4%
	ausente	254	85%	146	57,5%	23	9,1%	143	56,3%	1	0,4%

O primeiro relato de MRSA em caso de mastite foi feito em 1972 e, desde 2005 começaram a surgir mais relatos em gado leiteiro (CUNY et al., 2011).

Strommenger et al. (2003) afirmam que severas infecções por MRSA estão mais associadas a alta mortalidade do que aquelas causadas por *S. aureus* sensíveis à meticilina. Até a metade da década de 90 os MRSA exibiam multirresistência fenotípica e com o passar do tempo, a detecção do gene *mec*A*,* se tornou um marcador importante para apontar para uma alternativa terapêutica, tendo em vista o aumento da ocorrência de infecções por MRSA (CUNY et al., 2011).

García-Alvarez et al. (2011) descrevem o aumento na ocorrência de *S. aureus* meticilina-resistente (MRSA). Essa evolução decorre, em parte, da aquisição de elementos cromossomais (SCCmec) que carreiam o gene *mec*A. A resistência fenotípica é mensurada pelo teste de sensibilidade *in vitro*, mas a detecção do gene *mecA* também pode ser usada para a confirmação do diagnóstico de MRSA.

No presente estudo foi detectada a presença do gene *mec*A em 45 amostras (15%), sendo 21% (N=12/57) presentes nos casos clínicos de mastite e 14% (N=33/243) nos casos subclínicos. Em relação aos *S. aureus* isolados de mastite clínica, a frequência detectada foi de 17% (N=7/41) e em relação aos *S. aureus* de mastite subclínica verificou-se frequência de 4% (N=7/164). Turutoglu et al. (2009) apresentam resultado semelhante em um estudo sobre a detecção de *S. aureus* resistente à meticilina em bovinos com mastite e detectaram que dos 18 *S. aureus*, 3 (16,7%) apresentaram o gene *mecA.* Dengfeng et al. (2015) analisaram 219 *S. aureus* isolados de bovinos com mastite na China e detectaram 6 (2,7%) estirpes positivas para o gene *mec*A, semelhante ao verificado pelo estudo de Pozzi et al. (2015) que avaliaram um total de 650 isolados de *S. aureus* obtidos de bovinos com mastite e detectaram o gene em 4 estirpes (0,6%).

Por sua vez, Soares et al. (2012) avaliaram a presença do gene *mec*A em 100 isolados de SCN provenientes de leite de vacas com mastite e detectaram a presença do gene em 4% dos casos, todos em *S. xylosus.* Fessler et al. (2010b), pesquisaram a ocorrência de resistência à oxacilina e detecção de *mec*A em 121 SCN isolados de bovinos com mastite em propriedades na Alemanha, sendo que 16 dos isolados apresentaram resistência à oxacilina e o gene foi detectado em 15 destas cepas. Guimarães et al. (2017) isolaram 61 estirpes de *Staphylococcus* (98.4% *S. aureus* e 1.6% *S. epidermidis*) de amostras de leite de vacas com mastite sendo que a presença do gene foi verificada em 48.3% dos isolados de *S. aureus* sendo que destes, 23.3% eram MRSA.

A presença do gene *mec*A já foi detectada em outras espécies de *Staphylococcus* incluindo *S. epidermidis, S. xylosus, S. sciuri, S. haemolyticus,* dentre outras (GORTEL et al., 1999; YASUDA et al., 2000; VAN DUIJKEREN et al., 2004). No presente estudo, relacionado aos casos clínicos, verificou-se a presença do gene em 1 *S. agnetis,* 1 *S. haemolyticus* e 3 *S. hyicus.* Em relação aos *Staphylococcus* de mastite subclínica, (Tabela 19), verificou-se a presença do gene em diversas espécies, tanto *Staphylococcus* coagulase positivas quanto coagulase negativas.

Pode-se observar que não houve diferença estatística na frequência entre os antimicrobianos estudados ($p<0,005$). No tocante às amostras em que os genes codificadores de resistência não foram detectados, a frequência de resistência aos antimicrobianos amoxicilina, ampicilina e penicilina foram maiores que para os demais antimicrobianos pesquisados ($p<0,001$). A ocorrência dos genes (*fem*A, *fem*B, *mec*A, *mec*A_{LGA251}*, bla*Z*)* e a expressão de resistência fenotípica apresentou frequência similar para os antimicrobianos amoxicilina, ampicilina e penicilina ($p<0,05$). Com relação à oxacilina e a presença do gene *mec*A, verificou-se que a frequência de resistência foi maior quando o gene também estava presente do que quando o gene estava ausente ($p<0,0001$) representados na Tabela 21.

Correlacionando os dados referente à sensibilidade da oxacilina e a presença ou ausência do gene *mec*A, detectou-se que as 28 amostras em que foi identificada a presença do gene (62,2%) se apresentaram sensíveis à oxacilina, nas 234 amostras em que a detecção do gene foi ausente a frequência de sensibilidade foi ainda maior (91,8%). Outros pesquisadores como Mistry et al. (2016) detectaram pela primeira vez, a ocorrência de estirpes *mec*A sensíveis à oxacilina na Índia, em que todos os 39 isolados de *S. aureus* se apresentaram sensíveis à oxacilina e 19 (48,7%) cepas foram positivas para o gene *mec*A. Wanxia et al. (2014) investigaram a incidência de MRSA em 103 isolados de *S. aureus* provenientes de amostras de vacas com mastite. O gene *mec*A foi detectado em 49 (47,6%) das cepas indicando a alta incidência de MRSA. Porém, verificou-se, no entanto que, 37 dos 49 (75,5%) isolados *mec*A positivos foram sensíveis a oxacilina nos testes de sensibilidade antimicrobiana e foram assim classificadas como *S. aureus mec*A-positivos sensíveis à oxacilina (OS-MRSA). Com frequência de sensibilidade à oxacilina mais baixa, Kobayashi et al. (1994) identificaram o gene *mec*A em todas as 237 cepas de *Staphylococcus* estudadas e somente 16,7% delas foram oxacilina-sensíveis.

García-Alvarez et al. (2011) relatam que o gene homólogo de *mec*A, o *mec*A_{LGA251} (*mec*C) apresenta 70% de similararidade com o próprio *mec*A, e descrevem que foi encontrado em *Staphylococcus aureus* de mastite bovina que apresentaram MRSA no Reino Unido e, em isolados de humanos na Dinamarca. No presente estudo foi realizada a pesquisa do gene *mec*$A_{LGA251,}$ nas 300 estirpes de *Staphylococcus* provenientes de mastite bovina clínica e subclínica, sendo que o gene foi identificado somente em 2 amostras (1 clínica e 1 subclínica) (1%). Assim sendo, a frequência de resistência fenotípica foi maior para amoxicilina, ampicilina e penicilina quando o gene não foi detectado (p<0,0001).

No estudo de García-Alvarez et al. (2011) detectaram a presença do gene *mec*A_{LGA251} em 1,4% dos isolados de *Staphylococcus* isolados do leite de bovinos com mastite, negativos para *mec*A e positivos na análise fenotípica de meticilina resistente. Unnerstad et al. (2013) investigaram 730 amostras de *S. aureus* de mastite bovina*,* confirmadas como sendo MRSA e detectaram o gene *mec*C em 4 (0,5%) delas. Dengfeng et al. (2015) analisaram 219 *S. aureus* isolados de bovinos com mastite na China e não detectado o gene *mec*C*.*

De acordo com Neves et al. (2007), o principal mecanismo de resistência aos aminoglicosídeos nos *Staphylococcus* é a inativação das drogas por enzimas celulares que modificam os antimicrobianos. O gene *aac*A-*aph*D codifica para as enzimas acetiltransferase, adeniltransferase e fosfotransferase que atuam sobre os antimicrobianos, os quais perdem a habilidade em se ligar aos ribossomos e não inibem mais a síntese proteica das células bacterianas, as quais desenvolvem resistência. Com relação ao presente estudo, detectou-se a presença do gene *aac*A-*aph*D em 46 (15,3%) dos 300 *Staphylococcus* isolados (16 de mastite clínica e 30 de mastite subclínica). Em 30,4% dos isolados resistentes fenotipicamente à gentamicina foi isolado o gene *aac*A-*aph*D*,* frequência maior (p<0,0001) quando comparada com a presença de resistência/ausência do gene. Semelhante ao observado pela pesquisa de Kumar et al. (2010), que isolaram 128 estirpes de *S. aureus* (83 de animais com mastite subclínica e 45 de animais com mastite clínica) e detectaram em 26,6% dos isolados, resistência fenotípica à gentamicina e presença do gene *aac*A-*aph*D.

Por sua vez, Fessler et al. (2010a), avaliaram 27 isolados de MRSA (25 de casos de mastite clínica bovina de 17 propriedades de exploração leiteira em regiões diferentes na Alemanha e dois isolados de trabalhadores destas propriedades).

Todos os seis isolados resistentes à gentamicina possuíam o gene *aac*a-*aph*D. Yang et al. (2016) avaliaram 44 estirpes de *S. aureus* isoladas de mastite bovina, na China, tendo detectado o gene *aac*A-*aph*D em 2,27% dos isolados.

O gene *blaZ*, que pode ser encontrado tanto no cromossomo, quanto em plasmídeos, foi detectado nos *S. aureus* em frequência reduzida nos isolados de mastite clínica e mastite subclínica (2% e 17%, respectivamente). Considerando-se o total de 300 *Staphylococcus* estudados, o gene foi verificado em 45 (15%) das amostras. Os pesquisadores a seguir, descrevem a detecção do gene em maior frequência que a obtida no presente estudo. Olsen et al. (2006) pesquisaram a presença do gene em 187 amostras de *Staphylococcus* resistentes à penicilina isolado em rebanhos na Dinamarca bem como amostras de humanos na Islândia, Noruega, Inglaterra, Suécia, USA e o detectaram em 143 amostras (76,47%). Ruegg et al. (2015) avaliaram 35 isolados de *Staphylococcus aureus* e 51 de SCN provenientes de amostras de animais com mastite bovina, suscetíveis ao ceftiofur e cefalotina e detectaram 46 (53,5%) dos isolados testados com a presença do gene *blaZ*. Semelhante a pesquisa anteriormente referida, Marques et al. (2017) coletaram amostras de leite de animais com mastite subclínica e isolaram 59 cepas de *Staphylococcus* spp. sendo 20 de *S. aureus*, tendo detectado o gene *bla*Z em 70% dos isolados de *S. aureus.* Aslantas e Demir (2016) detectaram uma frequência de 100% do gene *bla*Z em 112 isolados de *S. aureus* obtidos de casos de mastite subclínica bovina.

No presente estudo, verificou-se para o gene *bla*Z que a presença do mesmo esta relacionada com uma frequência de ocorrência de resistência fenotípica maior para amoxicilina, ampicilina e penicilina quando comparada à combinação presença de resistência fenotípica/ausência do gene ($p<0,0001$). Os mesmos antimicrobianos quando avaliados quanto à presença ou ausência dos gene apresentam maior frequência quando foi detectado o gene *bla*Z ($p<0,0003$) (Tabela 21). Soares et al. (2012) avaliaram o perfil fenogenotípico de resistência aos antimicrobianos de 100 isolados de *Staphylococcus* coagulase negativas provenientes de leite de vacas com mastite e verificaram que o gene *bla*Z foi detectado em 16% dos mesmos, todos resistentes aos betalactâmicos testados (penicilina, ampicilina, cefalotina e oxacilina). Gao et al. (2011) isolaram 85 estirpes de *S. aureus* a partir de amostras de leite de mastite bovina e verificaram que 71 dos isolados foram resistentes à penicilina, sendo que 69 deles apresentaram o gene *blaZ.*

Na Tabela 22 é apresentado o número absoluto, frequência e concordância simples, bem como a resistência fenotípica para cada grupo. O grupo das concordâncias "sofríveis" apresentou maior frequência de resistência para amoxicilina, ampicilina e penicilina e estas foram maiores que as demais (p<0,05). Para os antimicrobianos gentamicina, oxacilina e cefoxitina, não houve frequência de resistência diferente entre os grupos, (p<0,05).

Tabela 22. Combinações dos genes de resistência (dois a dois), a concordância entre os mesmos e a relação com cada antimicrobiano pesquisado nas cepas que se apresentaram resistentes ao antibiograma de *Staphylococcus* spp. isolados de mastite clínica e subclínica bovina. – 2017.

Combinações genes Resistência			**Ampicilina; Amoxicilina**		**Gentamicina**		**Oxacilina**		**Penicilina**	
	N	**Concordância**	**N**	**%**	**N**	**%**	**N**	**%**	**N**	**%**
Grupo das Concordâncias Sofríveis										
femA / mecA	**17**	33,0%	5	29,4%	0	0,0%	0	0,0%	5	29,4%
femA / mecALGA251	**1**	36,7%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
***femA / aac*Aaph*D**	**23**	36,7%	4	17,4%	3	13,0%	0	0,0%	4	17,4%
femB / mecA	**17**	36,0%	5	29,4%	0	0,0%	0	0,0%	5	29,4%
femB / mecALGA251	**1**	39,7%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
***femB / aac*Aaph*D**	**22**	39,0%	3	13,6%	3	13,6%	0	0,0%	3	13,6%
Grupo das Concordâncias Regulares										
femA / blaZ	**29**	41,0%	22	75,9%	0	0,0%	1	3,4%	22	75,9%
femB / blaZ	**29**	44,0%	22	75,9%	0	0,0%	1	3,4%	22	75,9%
Grupo das Concordâncias Boas										
mecA / blaZ	**7**	74,7%	2	28,6%	1	14,3%	1	14,3%	2	28,6%
***blaZ / aac*Aaph*D**	**7**	74,3%	3	42,9%	1	14,3%	1	14,3%	3	42,9%
Grupo das Concordâncias Ótimas										
femA / femB	**179**	95,7%	87	48,6%	3	1,7%	2	1,1%	84	46,9%
mecA / mecALGA251	**1**	85,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
***mecA / aac*Aaph*D**	**33**	91,7%	2	6,1%	1	3,0%	1	3,0%	2	6,1%
mecALGA251 / blaZ	**2**	85,7%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
***mec*ALGA251/ *aac*Aaph*D**	**1**	84,7%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%

Tabela 23 aprofunda as análises da Tabela 22, com outras medidas de associação entre genes de resistência e seus respectivos antimicrobianos. Verifica-se um resumo do total de pares de genes (responsáveis por codificarem resistência)

encontrados, bem como seu grau de associação. Assim como nas análises de concordância entre antibióticos, calculou-se, além da concordância simples, as estatísticas Kappa e Pabak. Pode-se observar que apenas os genes *fem*A e *fem*B apresentam uma associação Kappa muito boa, exibindo maior frequência de ocorrência de resistência quando considerados os antimicrobianos amoxicilina, ampicilina e penicilina, sendo sua frequência maior que a das demais combinações (p<0,0001).

Tabela 23. Combinações dos genes de resistência (dois a dois), concordância pelos índices Kappa e Pabak, e a relação com cada antimicrobiano pesquisado nas cepas que se apresentaram resistentes ao antibiograma de *Staphylococcus* spp. isolados de mastite clínica e subclínica bovina. – 2017.

Combinações genes Resistência	N	Índice Kappa	Índice Pabak	Ampicilina; Amoxacilina		Gentamicina		Oxacilina		Penicilina	
				N	%	N	%	N	%	N	%
Grupo do índice Kappa Inexistente (k<0%)											
femA / mecA	**17**	-13%	0%	5	29,4%	0	0,0%	0	0,0%	5	29,4%
femA / aacAaphD	**23**	-7%	-27%	4	17,4%	3	13,0%	0	0,0%	4	17,4%
femB / mecA	**17**	-12%	-28%	5	29,4%	0	0,0%	0	0,0%	5	29,4%
femB / mecALGA251	**1**	0%	-23%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
femB / aacAaphD	**22**	-7%	-22%	3	13,6%	3	13,6%	0	0,0%	3	13,6%
Subtotal: Kappa inexistente	80			17	21,3%	6	7,5%	0	0	17	21,3%
Grupo do índice Kappa Pobre (0%<k<20%)											
femA / mecALGA251	**1**	0,3%	-26,7%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
femA / blaZ	**29**	0,6%	-18,0%	22	75,9%	0	0,0%	1	3,4%	22	75,9%
femB / blaZ	**29**	2,2%	-12,0%	22	75,9%	0	0,0%	1	3,4%	22	75,9%
mecA / mecALGA251	**1**	3,0%	70,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
mecA / blaZ	**7**	0,7%	49,3%	2	28,6%	1	14,3%	1	14,3%	2	28,6%
mecALGA251 / blaZ	**2**	7,3%	71,3%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
mecAL GA251/ aacAaphD	**1**	2,9%	69,3%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
blaZ / aacAaphD	**7**	0,3%	48,7%	3	42,9%	1	14,3%	1	14,3%	3	42,9%
Subtotal - Kappa pobre	77			49	63,6%	2	2,6%	4	5,2%	49	63,6%
subtotal: Kappa inexistente + pobre	157			66	42,0%	8	5,1%	4	2,5%	66	42,0%
índice Kappa Bom (60% < k < 80%)											
mecA / aacAaphD	**33**	67,6%	83,3%	2	6,1%	1	3,0%	1	3,0%	2	6,1%
índice Kappa Muito bom (k>80%)											
femA / femB	**179**	90,8%	91,3%	87	48,6%	3	1,7%	2	1,1%	84	46,9%
Subtotal: Kappa bom + muito bom	212			89	42,0%	4	1,9%	3	1,4%	86	40,6%

Na Tabela 24 estão apresentadas as combinações possíveis de genes que podem estar associadas à resistência antimicrobiana, nos quadros de mastite clínica e subclínica. Para ambas as manifestações de mastite, a combinação mais frequentemente detectada foi *fem*A-*fem*B*,* com frequência semelhante nos casos clínicos (N=28; 49,12%) e subclínicos (N=99; 40,74%), (p<0,0001). Relativamente aos isolados de mastites clínicas, as combinações mais frequentemente detectadas foram *femA-femB,* ausência de genes, *fem*A-*fem*B-*aac*A*aph*D*, fem*A-*fem*B-*mec*A-*aac*A*aph*D, totalizando 46 isolados (80,70% do total) (p<0,0001). Em relação aos isolados de mastites subclínicas, as combinações mais frequentemente detectadas foram *fem*A-*fem*B*,* ausência de genes, *bla*Z-*fem*A-*fem*B, *mec*A-*aac*A*aph*D totalizando 199 isolados (81,89% do total) (p<0,0001).

Tabela 24. Combinações possíveis entre os genes que conferem resistência antimicrobiana em 300 *Staphylococcus* spp. isolados de mastite clínica e subclínica bovina. – 2017.

Mastite Clínica (N=57)			**Mastite Subclínica (N=243)**		
combinação genes resistência	**N**	**%**	**combinação genes resistência**	**N**	**%**
femA-femB	28	49,12%	*femA-femB*	99	40,74%
ausência de genes	7	12,28%	*ausência de genes*	59	24,28%
femA-femB-aacAaphD	6	10,53%	*blaZ-femA-femB*	24	9,88%
femA-femB-mecA-aacAaphD	5	8,77%	*mecA-aacAaphD*	17	7,00%
femA-femB-mecA	3	5,26%	*blaZ*	11	4,53%
mecA-aacAaphD	2	3,51%	*femA*	10	4,12%
blaZ-femA-femB	1	1,75%	*mecA*	6	2,47%
mecALGA251-blaZ	1	1,75%	*femA-femB-aacAaphD*	4	1,65%
aacAaphD	1	1,75%	*blaZ-femA-femB-mecA-aacAaphD*	3	1,23%
blaZ-mecA-aacAaphD	1	1,75%	*femA-femB-mecA-aacAaphD*	3	1,23%
blaZ-aacAaphD	1	1,75%	*femA-femB-mecA*	2	0,82%
blaZ-mecA	1	1,75%	*femB*	2	0,82%
			femA-aacAaphD	1	0,41%
			blaZ-mecA-aacAaphD	1	0,41%
			mecALGA251-blaZ-femA-femB-mecA-aacAaphD	1	0,41%

Conforme Kobayashi et al. (1994), a detecção conjunta dos genes *mec*A, *fem*A*, fem*B se mostrou um índice mais confiável para identificar os MRSA do que

em separado, encontrados em 135 dos 198 isolados *S. aureus.* No presente estudo, em relação a todos *Staphylococcus* spp. estudados, essa combinação de genes se apresentou com baixa frequência (3/57) nos casos clínicos e (2/243) nos casos subclínicos de mastite bovina.

6 CONCLUSÕES

- ✓ A maioria das mastites clínica e subclínicas no presente estudo tem natureza infecciosa;
- ✓ Os métodos fenotípico e genotípico podem ser utilizados para identificação das espécies de *Staphylococcus*;
- ✓ *S. aureus* foi o principal agente etiológico de mastites clínicas e subclínicas*;*
- ✓ Nas mastites clínicas e subclínicas foram isoladas as mesmas espécies de *Staphylococcus* e com frequência de ocorrência similar;
- ✓ Todos os genes codificadores de adesinas foram detectados no presente estudo, com maior frequência para *eno, fib* e *fnb*A;
- ✓ Com exceção do gene *bhp,* todos os genes codificadores de biofilme foram detectados, com maior frequência para *bap, ica*D e *ica*A;
- ✓ As maiores frequências de ocorrência de resistência foram observadas para amoxicilina, ampicilina e penicilina;
- ✓ As maiores frequências de ocorrência de sensibilidade foram observadas para cefalotina, oxacilina e gentamicina;
- ✓ Os resultados de "testes *in vitro*" resistência e sensibilidade para oxacilina não podem ser utilizados para os demais betalactâmicos devido a baixa concordância entre os mesmos;
- ✓ Os resultados referentes aos MIC_{50} e MIC_{90} se apresentaram mais elevados quando comparados aos resultados de outros estudos, o que pode estar relacionado a um possível aumento de resistência do patógeno em questão;
- ✓ Todos os genes codificadores de resistência antimicrobiana para os betalactâmicos e aminoglicosídeos foram detectados, sendo genes os *fem*A e *fem*B, os mais frequentes em ambas manifestações de mastite;
- ✓ O gene *fem*A, muito utilizado para a identificação de cepas de *S. aureus*, não pode ser utilizado para identificação deste agente, pois não foi detectado em todos os isolados do mesmo, bem como foi verificado em outras espécies*;*
- ✓ A presença do gene *mec*A, utilizado como confirmação para o diagnóstico de MRSA, foi verificada com maior frequência quando da ocorrência de resistência fenotípica à oxacilina;

- ✓ Com relação às adesinas, as combinações de genes mais frequentemente detectadas foram *cna*-*eno*-*ebp*S-*fin*-*fnb*A (nas mastites clínicas) e *eno*-*fib*-fnbA (nas mastites subclínicas);
- ✓ A combinação de genes codificadores de biofilmes mais verificada nos casos de mastites clínicas foi *bap*-*ica*D e nos casos subclínicos foi *bap* isoladamente*;*
- ✓ Relativamente aos genes que conferem resistência aos antimicrobianos betalactâmicos e gentamicina a combinação mais frequentemente detectada em ambas as manifestações de mastite foi *fem*A-*fem*B.

REFERÊNCIAS

AARESTRUP, F. M.; AGERSO, Y.; AHRENS, P.; JORGENSEN, J. C. O.; MADSEN, M.; JENSEN, L. B. Antimicrobial susceptibility and presence of resistance genes in staphylococci from poultry. **Veterinary Microbiology**, v. 7, p. 353-364, 2000.

AIRES-DE-SOUSA, M.; PARENTE, C. E. S. R.; VIEIRA-DA-MOTA O.; BONNA, I. C. F.; SILVA, D. A.; LENCATRE, H. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from buffalo, bovine, ovine and caprine milk samples collected in\ Rio de Janeiro, Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p.3845-3849, 2007.

ALMEIDA, L. M. de. **Fatores de Virulência e genes regulatórios *agr* de *Staphylococcus aureus* e outras espécies coagulase positivas isoladas de mastite bovina e ovina.** 2009. 111 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia - Análises Clínicas) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

AMORENA, B., GRACIA, E., MONZON, M., LEIVA, J., OTEIZA, C., PEREZ, M., ALABART, J.L., HERNANDEZ-YAGO, J., Antibiotic susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* in biofilms developed in vitro. Journal of **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. V.44, p. 43–55, 1999.

ARCIOLA, C. R.; BALDASSARRI, L.; MONTANARO, L. Presence of *icaA* and i*caD* genes and slime production in a collection of Staphylococcal strains from catheter-associated infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 2151– 2156, 2001.

ARCIOLA, C. R.; GAMBERINI, S.; CAMPOCCIA, D.; VISAI, L.; SPEZIALE, P.; BALDASSARRI, L.; MONTANARO, L. A multiplex PCR method for the detection of all five individual genes of *ica* in *Staphylococcus epidermidis*. A survey on 400 clinical isolates from prosthesis-associated infections. **Wiley Periodicals**, p.408-413, 2005.

ASLANTAS, Ö; DEMIR, C. Investigation of the antibiotic resistance and biofilm-forming ability of *Staphylococcus aureus* from subclinical bovine mastitis cases **Journal of Dairy Science**, v.99, n.11, p.8607-8613, 2016.

AWALE, M. M.; DUDHATRA, G. B.; AVINASH, K.; CHAUHAN, B. N.; KAMANI, D. R.; MODI, C. M. PATEL, H. B.; O'KENNEDY, R. Bovine mastitis: a threat to economy. **Open Access Scientific Reports,** v.1, 295p., 2012

BAGCIGIL, A. F.; TAPONEN, S.; KOORT, J.; BENGTSSON, B.; MYLLYNIEMI, A. L.; PYORALA, S. Genetic basis of penicillin resistance of *S. aureus* isolated in bovine mastitis. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.54, p.1-7, 2012.

BAKER J. S. Comparison of various methods for differentiation of staphylococci and micrococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 19, p.875-879, 1984.

BARKEMA, H. W.; DELUYKER, H. A.; SCHUKKEN, Y. H.; LAM, T. J. G. M. Quarter-milk somatic cell count at calving and at first six milkings after calving. **Preventive Veterinary Medicine.** v. 38. p.1-9, 1999.

BARRY, T.; COLLERAN, G.; GLENNON, M.; DUNICAN, L. K.; GANNON, F. The 16S/23S ribosomal spacer region as a target DNA probes to identify eubacteria. **Genome Research**, v. 1, p.51-56, 1991.

BASELGA, R.; I. ALBIZU, M. C.; DEL CACHO, E.; BARBERAN, M.; AMORENA, B. Phase variation of slime production in *Staphylococcus aureus*: implication in colonization and virulence**. Infection and Immunity**, v. 61, p. 4857–4862, 1993.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493, 1966.

BERGONIER, D.; DE CREMOUX, R.;, RUPP, R.; LAGRIFFOUL, G.; BERTHELOT, X. Mastitis of dairy small ruminants**. Veterinary Research**, v. 34, p.689-716, 2003.

BERGER-BÄCHI, B.; R OHRER, S. Factors influencing methicillin resistance in *Staphylococci*. **Archives of Microbiology**, v.178, n.3, p.165-171, 2002.

BOOTH, M. C.; PENCE, L. M.; MAHASRESHTI, P.; CALLEGAN, M. C.; GILMORE, M. Clonal association among *Staphylococcus aureus* isolates from various sites of infection. **Infection and Immunity**, v. 69, n.1, p.345-352, 2001.

BRAMLEY, A. J.; CULLOR, J. S.; ERSKINE, R. J.; FOX, L. K.; HERMON, R. J.; HOGAN, J. S.; NICKERSON, S. C.; OLIVER, S. P.; SMITH, K. L.; SORDILLO, L. M. Current Concepts of Bovine Mastitis. **4th ed. National Mastitis Council**, Madison, 64p, 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, 2012. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/comunicacao/noticias/2012/07/mapa-aprova-iniciativa-para-melhorar-a-qualidade-do-leite-no-brasil>. Acesso em jul. 2012.

BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; RIBEIRO, M. T.; VEIGA, V. M. Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação. **Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia,** v. 51, p. 129-135, 1999.

BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; SILVA, M. A. S.; CARMO, R. A. Concentração mínima inibitória de dez antimicrobianos para amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de infecção intramamária bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 5, 2001.

BROUILLETTE, E.; TALBOT, B.G.; MALOUIN, F. The fibronecting binding proteins of *Staphylococcus aureus* may promote mammary gland colonization in a lacting mouse model of mastitis. **Infection and Immunity**, v. 74, p. 2292-2295, 2003.

BYRT, T.; BISHOP, J; CARLIN, J. B. Bias, Prevalence and Kappa. **Journal of Clinical Epidemiology**, v. 46, n.5, p.423-429, 1993.

CAPURRO, A.; ASPÁN, A.; ERICSSON, U. H.; PERSSON, W. K.; ARTURSSON, K. Identification of potential sources of *Staphylococcus aureus* in herds with mastitis problems. **Journal of Dairy Science,** v. 93, p.180-191, 2010.

CERVINKOVA, D.; VLKOVA, H.; BORODACOVA, I.; MAKOVCOVA, J.; BABAK, V.; LORENCOVA, A.; VRTKOVA, I.; MAROSEVIC, D.; JAGLIC, Z. Prevalence of mastitis pathogens in milk from clinically healthy cows. **Veterinari Medicina,** v.58, p. 567-575, 2013.

CHAMBERS, H. F. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. **Clinical Microbiology Reviews**, v.10, p. 781–791, 1997.

CHANDRASEKARAN, D.; VENKATESAN, P.; TIRUMURUGAAN, K. G.; NAMBI, A. P.; THIRUNAVUKKARASU, P. S.; KUMANAN, K.; VAIRAMUTHU, S.; RAMESH, R. Pattern of antibiotic resistant mastitis in dairy cows. **Veterinary World**, v. 7, p. 389-394, 2014.

CHEN, G.; FARIS, P.; HEMMELGARN, B.; WALKER, R. L.; QUAN, H. Measuring agreement of administrative data with chart data using prevalence unadjusted and adjusted kappa. **BMC Medical Research Methodology**, v.9, n. 5, 2009.

CHEUNG A. L.; PROJAN S. J.; GRESHAM, H. The genomic aspect of virulence, sepsis, and resistance to killing mechanisms in *Staphylococcus aureus***. Current Infectious Diseases Reports**, v. 4, p. 400–410, 2002.

CIFTCI A.; FINDIK, A.; ONUK, E. E.; SAVASAN, S. Detection of methicillin resistance and slime factor production of *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 254–261, 2009.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. (CLSI) **Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animal:** approved standard M31-A3, v. 28, 3ed., 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. (CLSI) **Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals:** second informational supplement VET01-S2, v. 33, 2013

COHN, L. A.; MIDDLETON, J. R. A veterinary perspective on methicillin-resistant staphylococci". **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v.20, n.1, p. 31-45, 2010.

CONTRERAS A.; SIERRA, D.; SANCHEZ, A.; CORRALES, J. C.; MARCO, J. C.; PAAPE, M. J.; GONZALO, C. Mastitis in small ruminants. **Small Ruminants Research**, v.68, p.145- 153, 2007.

COSTA, E. O.; MANGERONA, A. M.; BENITES, N. R.; CIRILLI, S. L.; GARINO JÚNIOR, F.; RIBEIRO, A. R.; WATANABE, E. T. Avaliação de campo de quatro tratamentos intramamários de mastite clínica bovina**. Hora Veterinária**, Porto Alegre, v.16, n.3, p.19-21, 1996.

COSTA, E. O. Uso de antimicrobianos na mastite. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIAK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**, 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p.443 - 455.

COSTA, E. O. da. Uso de antimicrobianos na mastite. In: **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária.** 5 ed. Rio e Janeiro: Guanabara Koogan, Cap. 42, p.487-500, 2011.

COSTA, G. M.; PAIVA, L. V.; FIGUEIREDO, H. P.; FIGUEIRA, A. R.; PEREIRA, U. P.; SILVA, N. Population diversity of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Brazilian dairy herds. J. **Research in Veterinary Science**, v. 93, 733–735, 2012.

COUTO, I.; PEREIRA, S.; MIRAGAIA, M.; SANCHES, I. S.; LENCASTRE, H. Identification of Clinical Staphylococcal isolates from humans by internal transcribed spacer PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p.3099-3103, 2001.

CREMONESI, P.; POZZI, F.; RASCHETTI, M.; BIGNOLI, G.; CAPRA, E.; GRABER, H. U.; VEZZOLI, F.; PICCININI, R.; BERTASI, B.; BIFFANI, S.; CASTIGLIONI, B.; LUINI, M. Genomic characteristics of *Staphylococcus aureus* strains associated with high within-herd prevalence of intramammary infections in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.98, n.10, p.6828-6838, 2015.

CUCARELLA, C.; SOLANO, C.; VALLE, J.; AMORENA, B.; LASA, I.; PENADES, J. R. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 2888-2896, 2001.

CUCARELLA, C.; TORMO, M. A.; U´BEDA, C.; TRONTODA, M. P.; MONZO´N, M.; PERIS, C.; AMORENA, B.; LASA, I.; PENADE´s, J. R. Role of biofilm-associated protein Bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 2177–2185, 2004.

CUNHA, M. L. R. S.; SINZATO, Y. K.; SILVEIRA, L. V. A. Comparison of methods for the identification of coagulase-negative staphylococci. **Memórias do Instituto Oswaldo** Cruz, v.99 (8), p.855-860, 2004.

CUNY, C.; LAYER, F.; STROMMENGER, B.; WITTE, WOLFGANG. Rare occurrence of methicillin-resistant staphylococcus aureus cc130 with a novel *mec*A homologue in humans in Germany. **Plus One**, v.6, p.1-5, 2011.

DAHLLÖF, I., HARRIET, B.; KJELLEBERG, S. rpoB-Based Microbial Community Analysis Avoids Limitations Inherent in 16S rRNA Gene Intraspecies Heterogeneity. **Applied and Environmental Microbiology**. p. 3376–3380, 2000.

DARWISH, S. F.; ASFOUR, H. A. E. Investigation of biofilm forming ability in *Staphylococci* causing bovine mastitis using phenotypic and genotypic assays. **The Scientific World Journal**, 9p, 2013.

DEGO, O. K.; VAN DIJK, J. E.; NEDERBRAGGT, H. Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion. A review. **Veterinary Quaterly,** v. 24, p.181-198, 2002.

DENGFENG, W.; ZHICAI, W.; ZUOTING, Yan; JIANYONG, W.; TARIQ, A; JIANJUN, L.; YANLI, L.; BO, H. Bovine mastitis *Staphylococcus aureus*: Antibiotic susceptibility profile, resistance genes and molecular typing of methicillin-resistant and methicillin-sensitive strains in China. **Infection, Genetics and Evolution**, v.31, p.9-16, 2015.

DE VLIEGHER, S.; BARKEMA, H. W.; STRYHN, H.; OPSOMER, G.; DE KRUIF, A. A. Impact of early lactation somatic cell count in heifers on milk yield over the first lactation. **Journal of Dairy Science,** v.88, p.938–947, 2005.

DHANAWADE, N. B.; KALOREY, D. R.; SRINIVASAN, R.; BARBUDDHE, S. B.; KURKURE, N. V. Detection of intercellular adhesion genes and biofilm production in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. **Veterinary Research Community**, v. 34, p.81–89, 2010.

DIAS, N. L.; SILVA, D. C. B.; OLIVEIRA, D. C. B. S.; FONSECA JÚNIOR, A. A.; SALES, M. L.; SILVA, N. Detecção dos genes de *Staphylococcus aureus,* enterotoxinas e de resistência à meticilina em leite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, p.1547-1552, 2011.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews,** v. 15, p. 167-193, 2002.

DRANCOURT, M.; RAOULT, D. *rpoB* Gene Sequence-Based Identification of *Staphylococcus* Species. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, p.1333-1338, 2002.

DUBRAVKA, M.; LAZIC, S.; BRANKA, V.; JELENA, P.; BUGARSKI, D.; ZORICA, S. Slime Production and biofilm forming ability by *Staphylococcus aureus* bovine mastitis isolates. **Acta Veterinaria**, v. 60, p. 217-226, 2010.

DURAN, N.; OZNER, B.; DURAN, G. G.; ONLEN, Y.; DEMIR, C. Antibiotic resistance genes and susceptibility patterns in *staphylococci*. **Indian Journal Medical Research**, v.135, n.3, p.389-396, 2012.

ERGUN, Y.; ASLATAS, O.; DOGRUER, G.; KIRECCI, E.; SARIBAY, M. K.; ATES, C. T.; ULKU, A.; DEMIR, C. Prevalence and etiology subclinical mastitis in Awassi dairy ewes in southern Turkey. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v.33, n.6, p.477-483, 2009.

FAGUNDES, H.; BARCHESI, L.; NADER FILHO, A.; FERREIRA, L. M.; OLIVEIRA, C. A. F. Occurrence of *Staphylococcus aureus* in raw milk produced in dairy farms in São Paulo state, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology,** v.41, p.376-380, 2010.

FEINSTEIN, A. R.; DOMENIC, V. C. High agreement but low Kappa: I. The problems of two paradoxes. **Journal of Clinical Epidemiology**, v. 43, n.6, p.543-549, 1990a.

FEINSTEIN, A. R.; DOMENIC, V. C. High agreement but low Kappa: II. The problems of two paradoxes. **Journal of Clinical Epidemiology**, v. 43, n.6, p.551-558, 1990b.

FELIPE, V., MORGANTE, C. A., SOMALE, P. S., VARRONI, F., ZINGARETTI, M. L., BACHETI, R. A., CORREA, S. G., PORPORATTO, C. Evaluation of the biofilm forming ability and its associated genes in *Staphylococcus* species isolates from bovine mastitis in Argentinean dairy farms. **Journal of Microbial Pathogenesis,** v.104, p.278-286, 2017.

FERREIRA, L. M.; NADER FILHO, A.; OLIVEIRA, E. de; ZAFALON, L. F.; SOUZA, V. de. Variabilidade fenotípica e genotípica de estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas em casos de mastite subclínica bovina. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 4, p. 1228-1234, 2006.

FESSLER, A.; SCOTT, C.; KADLEC, K.; EHRICHT, R.; MONECKE, S.; SCHWARZ, S. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from cases of bovine mastitis. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v.65, n.4, p.619-625, 2010a.

FESSLER, A.; BILLERBECK, C.; KADLEC, K.; SCHWARZ, S. Identification and characterization of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v.65, n.8, p.1576-1582, 2010b.

FISCHETI, V. A.; NOVICK, R. P.; FERRETI, J. J. 2. ed. **Gram-positive pathogens**. Washington: ASM Press, 2006.

FITZGERALD, J. R.; HARTIGAN, P. J.; MEANNEY, W. J.; SMYTH, C. J. Molecular population and virulence factor analysis of *Staphylococcus aureus* from bovine intramammary infection. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 1028-1037, 2000.

FOSTER, T. J.; HÖÖK, M. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus***.** **Trends in Microbiology**, v. 6, p. 484–488, 1998.

FOX, L. K.; ZADOKS, R. N.; GASKINS, C. T. Biofilm production by *Staphylococcus aureus* associated with intramammary infection. **Veterinary Microbiology**, v.107, n. 3-4, p. 295-299, 2005.

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

FREITAS, M. F. L.; PINHEIRO JUNIOR, J. W.; STAMFORD, T. L. M.; RABELO, S. S. A.; SILVA, D. R.; SILVEIRA FILHO, V. M.; SANTOS, F. G. B.; MOTA, R. A. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus* coagulase positivos isolados de leite de vacas com mastite no agreste do estado de Pernambuco, **Arquivos do Instituto Biológico,** São Paulo, v. 72, n. 2. p. 171-177, 2005.

GARCÍA-ALVAREZ, L.; HOLDEN, M. T. G.; LINDSAY, H.; WEBB, C. R.; BROWN, D. F. J.; CURRAN, M. D.; WALPOLE, E.; BROOKS, K.; PICKARD, D. J.; TEALE, C.; PARKHILL, J.; BENTLEY, S. D.; EDWARDS, G. F.; GIRVAN, E. K.; KEARNS, A. M.; PICHON, B.; HILL, R. L. R.; LARSEN, A. R.; SKOV, R. L.; PEACOCK, S.; MASKELL, D. J.; HOLMES, M. A. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine population in the UK and Denmark: a descriptive study. **The Lancet Infection Disease**, v. 11, p.595-603, 2011.

GAO, J.; FERRERI, M.; LIU, X. Q.; CHEN, L. B.; SU, J. L.; HAN, B. Development of multiplex polymerase chain reaction assay for rapid detection of *Staphylococcus aureus* and selected antibiotic resistance genes in bovine mastitic milk samples. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.23, n.5, p.894-901, 2011.

GENTILINI, E., DENAMIEL, G., BETANCOR, A., REBUELTO, M., RODRIGUEZ, M., De TORREST, R. A. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative *staphylococci* isolated from bovine mastitis in Argentina. **Journal of Dairy Science**, v.85, p.1913–1917, 2002.

GORTEL, K.; CAMPBELL, K. L.; KAKONA, I.; WHITTEM, T.; SCHAEFFER, D. J.; WEISIGER, R. M. Methicillin resistance among staphylococci isolated from dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v.60, p.1526–1530, 1999.

GUIMARÃES, F. F.; NÓBREGA, D. B.; RICHINI-PEREIRA, V. B.; MARSON, P. M.; FIGUEIREDO PANTOJA, J. C.; LANGONI, H. Enterotoxin genes in coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk. **Journal of Dairy Science,** v.96, n.5, p.2866-2872, 2016.

GUIMARÃES, F. F.; MANZI, M. P.; JOAQUIM, S. F.; RICHINI-PEREIRA, V. B.; LANGONI, H. Short communication: Outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)-associated mastitis in a closed dairy herd. **Journal of Dairy Science**, v.100, n.1, p.726-730, 2017.

HALL, T.A. "BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT". **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p.95–98, 1999.

HENNEKINNE, J. A.; OSTYN, A.; GUILLIER. F.; HERBIN, S.; PRUFER, A. L.; DRAGACCI, S. How should staphylococcal food poisoning outbreaks be characterized? **Toxins**, v.2, p.2106-2116, 2010.

HIRAMATSU, K. Molecular evolution of MRSA. **Microbiology and Immunology**, v.39, n.8, p.531-543, 1995.

HONKAKANEN-BUZALSKI, T.; MYLLYS, V.; PYÖRÄLÄ, S. Bovine clinical mastitis due to coagulase-negative staphylococci and their susceptibility to antimicrobials. **Journal of Veterinary Medicine** B, v. 41, p. 344-350, 1994.

IKAWATY, R.; BROUWER, E. C.; VAN DUIJKEREN, E.; MEVIUS, D.; VERHOEF, J.; FLUIT, A. C. Virulence factors of genotyped bovine mastitis *Staphylococcus*

aureus isolates in the Netherlands. **International Journal of Dairy Science**, v. 5, p. 60–70, 2010.

KALOREY, D. R; SHANMUGAM, Y.; KURKURE, N. V.; CHOUSALKAR, K. K.; BARDUDDHE, S. B. PCR-based detection of genes encoding virulence determinants in *Staphylococcus aureus* from bovine subclinical mastitis cases. **Journal of Veterinary Science**, v.8, p.151-154, 2007.

KARAHAN, M.; ÇETINKAYA, B. Coagulase gene polymorphisms detected by PCR in *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis in Turkey. **The Veterinary Journal**, v.174, p.428-431, 2007.

KAWANO, J.; SHIMIZY, A., SAITOH, S.; YAGI, M.; SAITO, T.; OKAMOTO, R. Isolation of methicillin-resistant coagulase-negative *staphylococci* from chickens. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, p.2072–2077, 1996.

KIM, T. J.; NA, Y. R.; LEE, J. I. Investigations into the Basis of Chloramplenicol and tetracycline resistance in *Staphylococcus intermedius* isolates from cases of pyoderma in dogs. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 52, p. 119-124, 2005.

KLEIN, R. C.; KLEIN, M. H. F.; BRITO, M. A. V. P.; FIETTO, L. G.; RIBON, A. O. B. *Staphylococcus aureus* of bovine origin: Genetic diversity, prevalence and the expression of adhesin-encoding genes. **Veterinary Microbiology,** v. 160, n. 1, p. 183-188, 2012.

KLOOS, W. E.; BANNERMAN, T. L. *Staphylococcus* and *Micrococcus.* In: MURRAY, P. R. et al. **Manual of clinical microbiology.** 7. ed. Washington: American Society of Microbiology, p. 264-282, 1999.

KOBAYASHI, N.; WU, H.; KOJIMA, K.; TANIGUCHI, K.; URASAWA, S.; UEHARA, N.; OMIZU, Y.; KISHI, Y.; YAGIHASHI, A.; KUROKAWA, I. Detection *mecA, femA* and *femB* genes in clinical strains of staphylococci using polymerase chain reaction. **Epidemiology and Infection**, v. 113, 259-266p., 1994.

KREDIET, T.G.; JONES, M.E.; JANSSEN, K.; GERARDS, L.J.; FLEER, A. Prevalence of Molecular Types and *mecA* Gene Carriage of Coagulase Negative Staphylococci in a Neonatal Intensive Care. Unit: Relation to Nosocomial Septicemia. **Journal of Clinical Microbiology,** v. 39, p. 3376-3378, 2001.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, J.R. **Color Atlas and textbook of diagnostic microbiology,** v.5, p.1395, 1997.

KREWER, C. C.; AMANSO, E. S.; GOUVEIRA, G. V.; SOUZA, R. L.; COSTA, M.; MOTA, R. A.; Resistance to antimicrobials and biofilm formation in *Staphylococcus* spp. isolated from bovine mastitis in the Northeast of Brazil Tropical Animal Health and Production, v.47, n.3, p.511-518, 2015.

KUDINHA, T.; SIMANGO, C. Prevalence of coagulase-negative staphylococci in bovine mastitis in Zimbabwe. **Journal of the South African Veterinary Association**, v.73, p.62–65, 2002.

KUMAR, R.; YADAV, B. R.; SINGH, R. S. Genetic Determinants of Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus* Isolates from Milk of Mastitic Crossbred Cattle. **Current Microbiology**, v.60, p. 379–386, 2010.

KUMAR, R.; YADAV, B. R.; ANAND, S. K.; SINGH, R. S. Molecular surveillance of putative virulence factors and antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* isolates recovered from intra-mammary infections of river buffaloes. **Microbial Pathogenesis**, v.51, p.31-38, 2011

KUNZ, F.; CORTI, S.; GIEZENDANNER, N.; STEPHAN, R.; WITTENBRINK, M.; ZWEIFEL, C. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* and coagulase negative staphylococci isolated from mastites milk samples from sheep and goats, **Schweizer Archiv Fur Tierheilkunde**, v.153, n.2, p.63-69, 2011.

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

LAFFRANCHI, A.; MULLER, E. E.; FREITAS, J. C.; PRETTO-GIORDANO, L. G.; DIAS, J. A.; SALVADOR, R. Etiologia das infecções intramamárias em vacas primíparas ao longo dos primeiros quatro meses de lactação. **Ciência Rural***,* v. 31, n. 6, p. 1027-1032, 2001.

LANDIS, J. R; KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, v.33, p.159-174, 1977.

LANGE, C. C.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; ARCURI, E. F.; SOUZA, G. N.; MACHADO, M. A.; DOMINGUES, R.; SALIMENA, A. P. S. Uso de PCR e sequanciamento do rDNA 16S para identificação de bactérias do gênero *Staphylococcus* isoladas de mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, p. 36-40, 2011.

LANGONI, H.; MENDONÇA, A. O.; DEVELLEY, A. Avaliação do uso da associação da bromexina com gentamicina no tratamento da mastite subclínica bovina. **Revista Napgama**, São Paulo, v.3, n.1, p.4-7, 2000.

LOPES, L. B.; BALSAMÃO, G. M.; SILVA, N. Susceptibilidade aos antimicrobianos apresentada por estafilococos coagulase-negativos em casos de mamite subclínica em bovinos leiteiros da fazenda modelo de Pedro Leopoldo. In: ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MAMITES, 3, 1999, Botucatu. **Anais**... Botucatu: FMVZ-UNESP, 1999. p. 170.

LÓPEZ-VÁZQUEZ, M.; MASTÍNEZ-CASTANEDA, J. S.; TALAVERA-ROJAS,, M.; VALDEZ-ALARCÓN, J. J-, VELÁSQUEZ-ORDÓNEZ, V. Detection of *mecA*, *mecI* and *mecR1* genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains of bovine

origin isolated from Family Dairy Farms, Mexico. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v.47, n.2 Valdivia, 2015.

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

LUTHJE, P.; SCHWARZ, S. Antimicrobial resistance of coagulase-negative staphylococci from bovine subclinical mastitis with particular reference to macrolide-lincosamide resistance phenotypes and genotypes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy,** v 57, p.966–969, 2006.

MANIKANDAN, S. G.; HEMALATHA, M.; LAKSHMINARASIMHAN, C.; THAJUDDIN, N. Isolation and amplification of fem - a gene from MRSA isolates. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 2, p. 28-35, 2011.

MARQUES, D. C. **Criação de Bovinos.** 7° ed. rev., Belo Horizonte. CVP Consultoria Veterinária e publicações, 2006. p. 435 - 450.

MARQUES, V. F.; SOUZA, M. M. S. de; MENDONÇA, E. C. L.; ALENCAR, T. A. de; PRIBUL, B. R.; COELHO, S. M. O.; LASAGNO, M.; REINOSO, E. B. Análise fenotípica e genotípica de virulência de *Staphylococcus* spp. e de sua dispersão clonal como contribuição ao estudo da mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, p.161-170, 2013.

MARQUES, V. F.; MOTTA, C. C. da.; SOARES, B. da S.; MELO, D. A. de; COELHO, S. de M. de O.; COELHO, I. da S.; B.ARBOSA, H. S.; SOUZA, M. M. S. de. Biofilm production and beta-lactamic resistance in Brazilian *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis Brazilian **Journal of Microbiology**, v.48, n.1, p.118-124, 2017.

MARTINS, T.; ROSA, A. F.; CASTELANI, L.; MIRANDA, M. S.; ARCARO, J. R. P.; POZZI, C. R. Intramammary treatment with gentamicin in lactating cows with clinical and subclinical mastitis. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n.4, p. 283-289, 2016.

MELLMANN, A.; BECKER, K.; Von EIFF, C.; KECKEVOET, U.; SCHUMANN, P.; HARMSEN, D. Sequencing and *Staphylococci* identification. **Emerging Infection Disease**, v.12, n.2, p.333-336, 2006.

MELCHIOR, M. B.; VAARKAMP, H.; FINK-GREMMELS, J. Biofilms: A role in recurrent mastitis infections? **Veterinary Journal**, v.171, p.398–407, 2006.

MELCHIOR, M. B.; VAN OSCH, M. H.; GRAAT, R. M.; VAN DUIJKEREN, E.; MEVIUS, D. J.; NIELEN, M.; GASSTRA, W.; KINK-GREMMELS, J. Biofilm formation and genotyping of Staphylococcus aureus bovine mastitis isolates: evidence for lack of penicillin-resistance in Agr-type II strains. **Veterinary Microbiology**, v. 137, n.1-2, p.83-89, 2009.

MENDONÇA, C. L.; FIORAVANT, M. C. S.; SILVA, J. A. B. A.; SOUSA, M, I.; EURIDES, D.; LANGONI, H. Etiologia da mastite bovina: revisão. **Veterinária Notícias,** v. 5, n. 1. p. 107-118, 1999.

MESTORINO, N.; ERRECALDE, J. O. Pharmacokinetic – Pharmacodynamic Considerations for Bovine Mastitis Treatment. **A Bird´s Eye View of Veterinary Medicine**, p.424-472, 2012.

MIDDLETON, J. R. *Staphylococcus aureus* mastitis: Have we learned anything in the last 50 years? **Nacional Mastitis Council (Regional Meeting Proceedings)**, p.1-8, 2013.

MISTRY, H.; SHARMA, P.; MAHATO, S.; SARAVANAN, R.; KUMAR, P. A.; BHANDARI, V. Prevalence and Characterization of Oxacillin Susceptible *mecA*-Positive Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus* Causing Bovine Mastitis in India. **PloS one**, v.11, n.9, p.1-10, 2016.

MOLLET, C.; DRANCOURT, M.; RAOULT, DIDIER. *rpoB* sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. **Molecular Microbiology**, v.26, n.5, p.1005-1011, 1997.

MONDAY, S. R.; BOHACH, G.A. Use of multiplex PCR to detect classical and newly described pyrogenic toxin genes in Staphylococcal isolates. **Journal of Clinical Microbiology,** v.37, p. 3411-3414, 1999.

MOUSSALEM, 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 em tratamento intensivo. **Revista Científica da FMC**, v.2, p. 2-9, 2007.

MU, Q.; LI, J.; SUN, Y.; MAO, D.; WANG, Q.; LUO, Y. Occurrence of sulfonamide, tetracycline, plasmid mediated quinolone and macrolide resistance genes in livestock feedlots in Northern China. **Environmental Science and Pollution Research**, 9p, 2014.

MURRAY. R, Patrick. ROSENTHAL .S, Ken . KOBAYASHI. S, Georges. PFALLER.A, Michael. **Microbiologia Médica**. 2006; 5º edição. Editora. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

MYLLYS, V.; HONKANEN-BUZLADKI, T.; VIRTANEN, H. Effect of abrasion teat orifice Epithelium on development of bovine staphylococcal mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 2, p. 446-452, 1994.

MYLLYS, V.; ASPLUND, K.; BROFELDT, E. V.; HIRVELA-KOSKI, T.; HONKANEM-BUZALSKI, J.; JUNTTILA, L.; KULKAS, O.; MYLLYKANGAS, M.; NISKANEN, H.; SALONIEMI, M.; SANDHOLM, SARANPAA, T. Bovine mastitis in Finland in 1988 and 1995 - Changes in prevalence and antimicrobial resistance. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.39, p.119–126, 1998.

SMELTZER, M. S.; GILLASPY, A. F.; PRATT, F. L.; THAMES, M. D. Comparative evaluation of use of *cna, fnb*A*, fnb*B, and *hlb* for genomic fingerprinting in the epidemiological typing of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 2444-2449, 1997.

NEAVE, F. K.; DODD, F. H.; KINGWILL, R. G.; WESTGARTH, D. R. Control of mastitis in the dairy herd by hygiene and management. **Journal of Dairy Science**, v.52, n.5 p.696-707, 1969.

NEVES, M. C.; ROSSI JÚNIOR, O. D.; ALVES, E. C. C.; LEMOS, M. V. F. Detecção de genes de resistência antimicrobiana em cromossomo e plasmídeos de *Staphylococcus* spp. **Arquivo Instituto Biológico,** v. 3, p.207-213, 2007.

OLIVEIRA, L.; LANGONI, H.; HULLAND, C; RUGG, P. L. Minimum inhibitory concentrations of *Staphylococcus aureus* recovered from clinical cases of bovine mastitis**. Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 1913-1920, 2012.

OLIVER, S. P.; GONZALES, R. N.; HOGAN, J. S.; JAYARAO, B. M.; OWENS, W. E. Microbiological Procedures for the Diagnosis of Bovine Udder Infection and Determination of Milk Quality. **National Mastitis Council**, Verona, WI. 2004.

OLSEN, J. E.; CHRISTENSEN, H.; AARESTRUP, F. M. Diversersity and evolution of *blaZ* from *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.57, p.450-460, 2006.

OTTO, M. R. et al. **Clínica Veterinária – Um tratado de Doenças de Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos, e Equinos.** 9. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2004. 541-626p.

OWENS, W. E.; RAY, C. H.; WATTS, J. L.; YANCEY, R. J. Comparison of success of antibiotic therapy during lactation and results of antimicrobial susceptibility test for bovine mastitis. **Journal of Dairy Science**, v.80, p.313 -317, 1997.

PHILPOT, W. N.; NICKERSON, S. C. **Vencendo a luta contra a mastite**. São Paulo: Milkbizz, 2002.192 p.

PINCHUK, I.V.; BESWICK, E.J.; REYES, V.E. Staphylococcal Enterotoxins. **Toxins**, v.2, p.2177-2197, 2010.

POL, M.; RUEGG, P. L. Relationship between antimicrobial drug usage and antimicrobial susceptibility of gram-positive mastitis pathogens. **Journal of Dairy Science**, v.90, p.262–273, 2007.

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

RABELLO, R. F.; SOUZA, C. R.; DUARTE, R. S.; LOPES, R. M.; TEIXEIRA, L. M.; CASTRO, A. C. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from bovine mastitis in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Dairy Science**, v.88, p.3211–3219, 2005.

RADOSTITS, O. M., GAY, C. C., BLOOD, D. C. **Veterinary medicine: a textbook of the disease of catlle, sheep, pigs, goats and horses**. 9.ed. Philadelphia: Saunders, 2000. p. 603-700.

RAIA JÚNIOR, R. B. Fatores fisiológicos, clínicos e farmacológicos, determinantes de resíduos de antimicrobiano no leite, avaliados em protocolos terapêuticos de mastite em bovinos leiteiros. 2006. 85f. **Tese** (Doutorado em Toxicologia e Análises Toxicológicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

REINOSO, E. B.; EL-SAYED, A.; LÄMMLER, C.; BOGNI, C.; ZSCHÖCK, M. Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from humans, bovine subclinical mastitis and food samples in Argentina. **Microbiological Research**, v. 163, p. 314-322, 2008.

ROBERSTSON, J. R.; FOX, L. K.; HANCOK, D. D.; GAY, J. M.; BESSER, T. E. Ecology of *S. aureus* isolated from various sites on dairy farms. **Journal of Dairy** Science, v.77, p.3354-3364, 1994.

RUEGG, P. L.; OLIVEIRA, L.; JIN, W.; OKWUMABUA, O. Phenotypic antimicrobial susceptibility and occurrence of selected resistance genes in gram-positive mastitis pathogens isolated from Wisconsin dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.98, n.7, p.4521-4534, 2015.

RUSSI, N. B.; BANTAR, C.; CALVINHO, L. F. Antimicrobial suscptibility of *Staphylococcus aureus* causing bovin mastitis in Argentine dairy herds. **Revista Argentina de Microbiología,** v. 40, p. 116-119, 2008.

RYFFEL, C.; TESCH, W.; BIRCH-MACHIN, I; REYNOLDS, P. E.; BARBERIS-MAINO, L.; KAYSER, F. H.; BERGER-BGEHI, B. Sequence comparison of *mecA* genes isolated from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. **Gene**, v. 94, p.137-8, 1990.

SAINI, V.; MCCLURE, J. T.; SCHOLL, D. T.; DVRIES, T. J.; BARKEMA, H. W. Herd-level association between antimicrobial use and antimicrobial resistance in bovine mastitis *Staphylococcus aureus* isolates on Canadian dairy farms. **Journal of Dairy Science**, v.95, p.1921–1929, 2012.

SALASIA, S. I. O.; KHUSNAN, Z.; LÄMMLER, C.; ZSCHÖCK, M. Comparative studies on pheno- and genotypic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis in central Java in Indonesia and Hesse in Germany. **Journal of Veterinary Science,** v. 5, p. 103-109, 2004.

SALIMENA, A. P. S.; LANGE, C. C.; CAMUSSONE, C.; SIGNORINI, M.; CALVINHO, L. F.; BRITO, M. A. V. P.; BORGES, C. A. V.; GUIMARÃES, A.; RIBEIRO, J. B.; MENDONÇA, L. C.; PICCOLI, R. H. Genotypic and phenotypic detection of capsular polysaccharide and biofilm in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk collected Brazilian dairy farms. **Veterinary Research Community**, v.40, p.97-106, 2016.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. **Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite**. São Paulo: Manole, 2006. 314 p.

SANTOS, F. G. B.; OLIVEIRA, W. L. M.; GARINO JÚNIOR, F.; LEAL, N. C.; COSTA, E. O. Investigação dos mecanismos de resistência à oxacilina em *S. aureus* isolados de casos de mastite. **Napgama**, v.8, n.2, p.14-17, 2005.

SAWANT, A. A.; GILLESPIE, B. E.; OLIVER, S. P. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative *Staphylococcus* species isolated from bovine milk. **Veterinary Microbiology**, v.134, p.73-81, 2009.

SCHALM, O. W.; NOORLANDER, D. O. Experimental and observation leading to development of California Mastitis Test. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 139, p. 199-204, 1957.

SEIXAS, R.; SANTOS, J. P.; BEXIGA, R.; VILELA, C. L.; OLIVEIRA, M. Short communication: Antimicrobial resistance and virulence characterization of methicillin-resistant staphylococci isolates from bovine mastitis cases in Portugal. **Journal of Dairy Science,** v. 97, p. 340-344, 2014.

SILVA, M. A. Utilização de PCR multiplex para o diagnóstico etiológico da mastite bovina. 2008. 32p. **Dissertação** - Medicina Veterinária Preventiva na Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2008.

SILVA, N. Diagnóstico de mamite em animais de importância econômica. In: ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MAMITES*,* 3, 1999, Botucatu. **Anais*...*** Botucatu: FMVZUNESP, 1999. p. 51-55.

SILVA, N. C. C.; GUIMARÃES, F. F.; MANZI, M. P.; BUDRI, P. E.; GÓMEZ-SANZ, E.; BENITO, D.; LANGONI, H.; RALL, V. L. M.; TORRES, C. Molecular characterization and clonal diversity of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in milk of cows with mastitis in Brazil. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p.6856-6862, 2013.

SIMOJOKI, H., HYVONEN, P., PLUMED FERRER, C., TAPONEN, S., PYORALA, S. Is the biofilm formation and slime producing ability of coagulase-negative staphylococci associated with the persistence and severity of intramammary infection? **Veterinary Microbiology**, v.158, p.344-352, 2012.

SIRQUEIRA, A. K. 2011. Indicadores de qualidade, pesquisa de marcadores de virulência e multirresistência aos antimicrobianos em estirpes de Staphylococcus spp. em leite de origem bovina produzido no sistema orgânico. **Tese** de Doutorado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Botucatu, SP. 154p.

SOARES, L. C.; PEREIRA, I. A.; PRIBUL, B. R.; OLIVA, M. S.; COELHO S. M. O.; SOUZA, M. M. S. Antimicrobial resistance and detection of *mecA* and *blaZ* genes in

coagulase-negative *Staphylococcus* isolated from bovine mastitis **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n.8, p.692-696, 2012.

SPINNOSA, H. S; GÓRNIAK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária.** 2. ed. Rio de Janeiro. Ed. Guanabara Koogan, 1999. Cap. 42, p. 422-432.

STOODLEY, P.; CARGO, R.; RUPP, C. J.; WILSON, S.; KLAPPER, I. Biofilm material properties as related to shear induced deformation and detachment phenonem. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 29, p. 361-367, 2002.

STRANDÉN, A.; EHLERT, K.; LABISCHINSKI, H.; BERGER-BACHI, B. Cell wall monoglycine cross-bridges and methicillin hyper susceptibility in a *femAB* null mutant of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 179, p.9-16, 1997.

STROMMENGER, B.; KETTLITZ, C.; WERNER, G.; WITTE, W. Muliplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus.* **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.9, p.4089-4094, 2003.

SUPRÉ, K.; HAESEBROUCK, F.; ZADOKS, R. N.; VANEECHOUTTLE, M.; PIEPERS, S.; DE VLIEGHER, S. Some coagulase-negative *Staphylococcus* species affect udder health more than others **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 2329–2340, 2010.

SUTRA, L.; POUTREL, B. Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 40, p. 79-89, 1994.

SUZUKI, E.; HIRAMATSU, K.; YOKOTA, T. Survey of methicillin-resistant clinical strains of coagulase-negative staphylococci for *mecA* gene distribution. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.36, n.2, p.429-34, 1992.

SZWEDA, P.; SCHIELMANN, M.; MILLEWSKI, S.; FRANKOWSKA, A.; JAKUBCZAK, A. Biofilm Production and Presence of ica and bap Genes in *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Cows with Mastitis in the Eastern Poland. **Polish Journal of Microbiology**, v. 61, n.1, p. 65-69, 2012.

TAPONEN, S.; SIMOJOKI, H.; HAVERI, M.; LARSEN, H. D.; PYORALA, S.; Clinical characteristics and persistence of bovine mastitis caused by different species of coagulase-negative staphylococci identified with API or AFLP. **Veterinary Microbiology**, v. 115, p.199–207, 2006.

TENOVER, F.C.; POPOVIC, T.; OLSVIK, O. Genetic methods for detecting antibacterial resistance genes. In: MURRAY, P.R. (Ed.). **Manual of clinical microbiology**. 6th.ed. Washington: American Society for Microbiology, p.1368-1378, 1995.

THIMOTHY H. O. **Medicina Interna de Grandes Animais**. Ed. Manole, Porto Alegre, RS 2000.

TORMO, M. A.; KNECHT, E.; GOTZ, F.; LASA, I.; PENADÉS, J. R. Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus:* evidence oh horizontal gene transfer? **Microbiology**, v.151, p.2465-2475, 2005.

TREMBLAY, Y. D. N.; LAMARCHE, D.; CHEVER, P.; HAINE, D.; MESSIER, S.; JACQUES, M. Characterization of the ability of coagulase-negative staphylococci isolated from the milk of Canadian farms to form biofilms. **Journal of Dairy Science**, v.96, p.234–246, 2013.

TRISTAN, A.; YING, L.; BES, M.; ETIENNE, J.; VANDENESCH, F.; LINA, G. Use of multiplex PCR to identify *Staphylococcus aureus* adhesins involved in human hematogenous infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 9, p. 4465–4467, 2003.

TURUTOGLU, H.; HASOKSUZ, M.; OZTURK, D.; YILDIRIM, M.; SAGNAK, S. Methicilin and aminoglycoside resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis and sequence analysis of their *mecA* genes. **Veterinary Research Communications**, v.33, p. 945-956, 2009.

UBEDA, C.; TORMO, M. A.; CUCARELLA, C.; TROTONDA, P.; FOSTER, T. J.; LASA, I.; PENADES, J. R. Sip, an integrase protein with excision, circularization and integration activities, defines a new family of mobile *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands. **Molecular Microbiology**, v.49, p.193–210, 2003.

UBUKATA, K.; NONOGUCHI, R.; SONG, M. D.; MATSUHASHI, M.; KONNO, M. Homology of *mecA* gene in methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus simulans* to that of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.34, p. 170-2, 1990.

UNAL, S.; HOSKINS, J.; FLOKOWITSCH, J. E.; ERNIE, Wu E. C. Y.; PRESTON, D. A.; SKATRUD, P. L. Detection of methicillin-resistant staphylococci by using the polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v.30, p.1685– 1691, 1992.

UNAL, N.; YILDIRIM, M.; YDIRIM, M. Antibiotic resistance profiles of staphylococci species isolated from milks, teat skins and noses mucous of cows. **Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, v.16, n.3, p.389-396, 2010.

UNNERSTAD, H., E.; BENGTSSON, B.; AF, R. M. H.; BORJESSON, S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* containing *mecC* in Swedish dairy cows. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.55, n.1, pp.6, 2013.

USDA, United States Department of Agriculture, 2017. Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/app/index.html#/app/advQuery>. Acesso em 24 abr. 2017.

VALOR ECONÔMICO, Jornal Valor Econômico, 2017. Disponível em: <http://www.valor.com.br/agro/4914610/producao-cai-no-pais-mas-lideres-em-leite-elevam-oferta>. Acesso em 24 abr.2017.

VANCRAEYNEST, D.; HERMANS, K.; HAESEBROUCK, F. Genotypic and phenotypic screening of high and low virulence *Staphylococcus aureus* isolates from rabbits for biofilm formation and MSCRAMMs. **Veterinary Microbiology**, v.103, p.241–247, 2004.

VAN DUIJKEREN, E.; BOX, A. T.; HECK, M. E.; WANNET, W. J.; FLUIT, A. C. Methicillin-resistant staphylococci isolated from animals. **Veterinary Microbiology,** v.103, p.91–97, 2004.

VASUDEVAN P.; NAIR, M. K. M.; ANNAMALAI, T.; VENKITANARAYANAN, K. S. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. **Veterinary Microbiology**, v.. 92, n. 1-2, p.179–185, 2003.

VEH, K. A.; KLEIN, R. C.; STER, C.; KEEFE, G. LACASSE, P.; SCHOLL, D.; ROY, J. P.; HAINE, D.; DUG.; RIBON, A. O. B.; FOUR, S.; TALBOT, B.; MALOUIN, F. Genotypic and phenotypic characterization of *Staphylococcus aureus* causing persistent and non pertistent subclinical bovine intramammary infections during lactation of dry period. **Journal of Dairy Science,** v. 98, p.155-168, 2015.

VERHOEFF, J.; GEER, D.; HAGENS, F. M. Effects of a mastitis control programme on the incidence of clinical mastitis. **Veterinary Quarterly**, v. 3, p. 158–163, 1981.

VISSIO, C.; AGUERO, D. A.; RASPANTI, C. G.; ODIERNO, L. M.; LARRIESTRA, A. J. Pérdidas productivas y económicas diárias ocasionadas por la mastites y erogaciones derivadas de su control em establecimientos lecheros de Córdoba, Argentina. **Archivos de Medicina Veterinaria**. v. 47, n. 1, p. 7-14, 2015.

VON EIFF, C.; PETERS, G.; HEILMANN, C. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 2, p. 677-685, 2002.

WAAGE, S.; MORK, T.; ROROS, A. et al. Bacteria associated with clinical mastitis in dairy heifers. **J. Dairy Sci**., v. 82, n. 4, p. 712-719, 1999.

WALTHER, C.; PERRETEN, V. Methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* in organic milk production. **Journal of Dairy Science**, v.90, p.5351, 2007.

WANG, S. C.; WU, C. M.; SHEN, J. Z.; WU, Y. N.; WANG, Y. Hypermutable *Staphylococcus aureus* strains present at high frequency in subclinical bovine mastitis isolates are associated with the development of antibiotic resistance. **Veterinary Microbiology**, v.165, p.410–415, 2013.

WANXIA, P.; YANG, S.; JIANXI, L.; CHUNHUI, L.; ZHIQIANG, Y.; HAIPING, D.; CHUNXIA, N. High Incidence of Oxacillin-Susceptible mecA-Positive *Staphylococcus*

aureus (OS-MRSA) Associated with Bovine Mastitis in China. **PLoS ONE**, v.9, n.2, p.1-9, 2014.

WATTS, J. Etiological Agenst of Bovine Mastitis. **Veterinary Mocrobiology**, v.16, p.41-66, 1988.

YANG, F.; WANG, Q.; WANG, X. R.; ZHANG, S. D.; LI, H. S. Genetic characterization of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis cases in Northwest China. **Journal of Integrative Agriculture,** v.15, n.12, 2016.

YARWOOD, J. M., SCHLIEVERT, P.M. Quorum sensing in *Staphylococcus* infections. **Journal of Clinical Investigation,** v. 112, p. 1620–1625, 2003.

YASUDA, R.; KAWANO, J.; ONDA, H.; TAKAGI, M.; SHIMIZU, A.; ANZAI, T. Methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci isolated from healthy horses in Japan. **American Journal of Veterinary Research,** v.61, p.1451–1455, 2000.

YOSHIMURA, H.; ISHIMARU, M.; KOJIMA, A. Minimum Inhibitory Concentrations of 20 Antimicrobial Agents against *Staphylococcus aureus* isolated from Bovine Intramammary Infections in Japan. **Journal of Veterinary Medicine B**, v. 49, p. 457-460, 2002.

ZADOKS, R. N.; LEEUWEN, W. B. Van, KREFF, D. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine and human skin, milking equipment, and bovine milk by phage typing, pulsed field gel electrophoresis, and binary typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 11, p.3894 -3902, 2002.

ZECCONI, A.; BINDA, E.; BORROMEO, V.; PICCININI, R. Relationship between some Staphylococcus aureus pathogenic factors and growth rates and somatic cell counts. **Journal of Dairy Research**. v. 72, p. 203–208, 2005.

ZOCCAL, R. Dez países top no leite. Disponível em: <http://www.baldebranco.com.br/dez-paises-top-no-leite/>. Acesso em 30 abril de 2017.

ZUNIGA, E.; MELVILLE, P. A.; SAIDENBERG, A. B. S.; LAES, M. A.; GONSALES, F. F.; SALABERRY, S. R. S.; GREGORI, F.; BRANDÃO, P. E.; SANTOS, F. G. B. dos; LINCOPAN, N. E.; BENITES, N. R. Occurrence of genes coding for MSCRAMM and biofilm-associated protein Bap in *Staphylococcus* spp. isolated from bovine subclinical mastitis and relationship with somatic cell counts. **Microbial Pathogenesis**, v.89, p.1-6, 2015.