EVELINE ZUNIGA

**Pesquisa de genes codificadores de adesinas em *Staphylococcus* spp.
isolados de mastite bovina**

São Paulo
2012

EVELINE ZUNIGA

**Pesquisa de genes codificadores de adesinas em *Staphylococcus* spp.
isolados de mastite bovina**

Dissertação 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 título de Mestre em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às
Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Nilson Roberti Benites

São Paulo

2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Pesquisa de genes codificadores de adesinas em *Staphylococcus* spp. isolados de mastite bovina", protocolado sob o nº 2005/2010, utilizando 365 (trezentos e sessenta e cinco) bovinos, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Nilson Roberti Benites, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 17/10/2012.

We certify that the Research "Search for adhesins-encoding genes in *Staphylococcus* spp. Isolated from bovine mastitis", protocol number 2005/2010, utilizing 365 (three thousand sixty five) bovine, under the responsibility Prof. Dr. Nilson Roberti Benites, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 10/17/2012.

São Paulo, 18 de outubro de 2012.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: ZUNIGA, Eveline.

Título: Pesquisa de genes codificadores de adesinas em *Staphylococcus* spp.
isolados de mastite bovina

Dissertação 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 título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento _____

Prof Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento _____

Prof Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento _____

*Dedico este trabalho aos meus queridos pais,
maravilhoso noivo e amada avó, Dona Olandina,
que tanto torceu pelo meu sucesso, e que
infelizmente se foi antes de assistir minha
vitória...*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente ao nosso Maravilhoso dador da vida, Aquele que está presente a todo momento. Querido Deus, muitíssimo obrigada por TUDO.

Ao meu querido orientador, Prof. Dr. Nilson Roberti Benites, pelos ensinamentos, conhecimentos, conversas intermináveis sobre o mundo da veterinária, sobretudo pela amizade e confiança.

A minha querida amiga, Dra. Priscilla Anne Melville, por tudo que vivemos juntas nesses três últimos anos, pelo prazer de nos entendermos com o “olhar”. Agradeço por todo ensinamento, pelas risadas (que não foram poucas – ccdp), pelo carinho de mãe, preocupação, pelos maravilhosos momentos e por tudo que sei a respeito do fascinante mundo da microbiologia veterinária.

Ao Prof. Dr. Fábio Gregori pela ajuda durante o aprendizado da Biologia Molecular, paciência e carinho.

Aos Professores Dr. Franklin Santos e Nilton Lincopan pelas culturas cedidas.

Aos amigos de Laboratório em especial aos queridos, André e Patrícia, pessoas com que pude contar durante toda essa trajetória. Ao André pela enorme paciência ao ministrar diversas aulas sobre Biologia Molecular e almoços engraçados; à Pati pela grande amizade e carinho.

À Amália, amiga querida, que mesmo sendo de outra área, me ajudou com carinho e dedicação em uma das coletas, além de toda ajuda dia-a-dia.

Aos funcionários do VPS, principalmente ao Danival e Cris por toda ajuda e a Carol por todos os cafés matinais.

Aos funcionários da Biblioteca pela atenção e revisão deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela bolsa de Mestrado.

Aos amigos produtores rurais Elvis, Dedé, Cléber e Fabinho, pela parceria, credibilidade, confiando seus animais a uma pesquisadora iniciante, cheia de ideais.

Aos maravilhosos funcionários Dão, Tião, Anésio e João. Em especial ao Dão, pela grande amizade, e disponibilidade a todo instante...

Às minhas queridas orientadoras da graduação, Márcia Nishizawa e Carla Balzano, pelo incentivo de ingressar no mestrado.

À minha querida amiga de anos, Daniele Beuron, por todo abrigo cativo em Pirassununga, carinho, palavras de incentivo, e até controles positivos!

À Mariinha por entender todo meu esforço, elogios e cafézinhos.

Aos familiares pelo torcida, em especial às minhas queridas irmãs e meu “Amigãozão”.

Aos meus amados pais, por acreditarem que receber o título de Mestre era possível, e enorme incentivo para que eu continue no Doutorado.

Ao Marco, Amado, pelo grande incentivo de seguir rumo ao mestrado e futuramente ao Doutorado. Pelas revisões deste trabalho, tabelas, idéias, sobretudo pelo grande amor durante esses oito anos juntos!

E as maravilhosas e queridas vaquinhas por quem me apaixonei perdidamente...

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. **Pesquisa de genes codificadores de adesinas em *Staphylococcus* spp. isolados de mastite bovina.** [Search for adhesins-encoding genes in *Staphylococcus* spp. isolated from bovine mastitis]. 2012. 96f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

No universo da pecuária leiteira, a mastite representa um importante desafio, sendo responsável por perdas econômicas consideráveis relacionadas principalmente com redução na produção de leite. O gênero *Staphylococcus* assume elevada importância como agente etiológico das mastites devido à sua ampla distribuição e frequência de ocorrência. Foram coletadas amostras de leite de fêmeas bovinas com mastite subclínica para exames microbiológicos e contagem de células somáticas (CCS). Após o isolamento e identificação dos micro-organismos, as amostras positivas foram submetidas a análises das medianas das CCS, testes de susceptibilidade “*in vitro*” frente a diferentes antimicrobianos, assim como pesquisa de genes codificadores das adesinas - genes que codificam para proteína ligadora de colágeno (*cna*), proteína ligadora de laminina (*eno*), proteína ligadora de elastina (*ebp*), proteína ligadora de fibrinogênio (*fib*), proteína A ligadora de fibronectina (*fnbA*), proteína B ligadora de fibronectina (*fnbB*) e proteína associada à formação de biofilme (*bap*), por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). De acordo com os achados do presente estudo, dentre as bactérias do gênero *Staphylococcus* isoladas, os *S. aureus* foram verificados com maior frequência, seguido por *Staphylococcus* coagulase-negativos - *S. intermedius*, *S. chromogens* e *S. warneri*. Com respeito às medianas das CCS, o gênero *Streptococcus* spp. apresentou o maior valor. O perfil de sensibilidade e resistência aos antimicrobianos testados foi semelhante entre as espécies de *Staphylococcus* coagulase-positivos e negativos, sendo os antimicrobianos cefalexina, cefalotina e ceftiofur os que apresentaram maior frequência de sensibilidade, e penicilina, amoxicilina e ampicilina os que apresentaram maior resistência. Com exceção do (*fnbA*), todos os outros fatores de virulência estudados foram detectados, sendo os genes *eno*, *fib* e a associação dos genes “*eno/fib/bap*” os mais frequentemente detectados. Nas amostras coletadas dos tanques de refrigeração não foram detectadas todas as espécies de *Staphylococcus* spp. isoladas dos quartos mamários. Tais informações acerca do

assunto permitem o desenvolvimento de estratégias mais eficientes de tratamento e controle desta enfermidade, possibilitando o aumento da produtividade leiteira.

Palavras-chave: Bovinos. Mastite subclínica. *Staphylococcus* spp. Adesinas.

ABSTRACT

ZUNIGA, E. **Search for adhesins-encoding genes in *Staphylococcus* spp. isolated from bovine mastitis.** [Pesquisa de genes codificadores de adesinas em *Staphylococcus* spp. isolados de mastite bovina]. 2012. 96f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

In the world of dairy cattle, mastitis is a major challenge, accounting for economic losses related mainly to reduction in milk production. The genus *Staphylococcus* assumes greater importance as a etiologic agent of mastitis due to its wide distribution and frequency of occurrence. Milk samples were collected from cows with subclinical mastitis to microbiological examinations and somatic cell count (SCC). After isolation and identification of microorganisms, positive samples were analyzed for the medians of SCC, tested for susceptibility "*in vitro*" against different antimicrobials and polymerase chain reaction will be used to search for genes encoding adhesins - genes that code for collagen-binding protein (*cna*), laminin-binding protein (*eno*), elastin-binding protein (*ebp*), fibrinogen-binding protein (*fib*), fibronectin-binding protein A (*fnbA*), fibronectin-binding protein B (*fnbB*) and protein associated with biofilm formation (*bap*). According to the findings of this study, among the bacteria of the genus *Staphylococcus* isolated, *S. aureus* were found most frequently, followed by coagulase-negative *Staphylococcus* - *S. intermedius*, *S. chromogens* and *S. warneri*. With respect to the medians of CCS, the genus *Streptococcus* spp. showed the highest. The profile of sensitivity and resistance to antimicrobials was similar among species of coagulase-positive and negative *Staphylococcus*, and antimicrobial cephalixin, cephalothin, and ceftiofur showed higher frequency sensitivity. Penicillin, amoxicillin and ampicillin showed the highest resistance. With the exception of (*fnbA*), all other virulence factors were detected, with genes *eno*, *fib* and the association of genes "*eno/fib/bap*" the most frequently detected. The samples collected from the cooling tanks were not detected all species of *Staphylococcus* spp. that were isolated from the mammary glands. Such information on the subject allow the development of more efficient strategies for treatment and control of this disease, allowing for increased milk production.

Keywords: Bovine. Subclinical mastitis. *Staphylococcus* spp. Adhesins.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Resultado geral dos exames microbiológicos de amostras de leite de bovinos leiteiros localizados no sul de Minas Gerais, considerando ausência, presença de crescimento bacteriano ou associação de bactérias no total de 313 amostras- São Paulo - 2012.....46
- Tabela 2 – Frequência de ocorrência (em número absoluto e porcentagem) das estirpes de *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus* coagulase-positivas (SCP) isoladas de amostras de leite apresentando mastite subclínica, considerando o total de 106 amostras - São Paulo – 2012.....48
- Tabela 3 – Frequência de ocorrência (em número absoluto e porcentagem) das estirpes de *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus* coagulase-negativas (SCN) isoladas de amostras de leite apresentando mastite subclínica, considerando o total de 106 amostras - São Paulo – 2012.....48
- Tabela 4 – Relação entre as Medianas, Números Mínimos e Máximos das Contagens de Células Somáticas (CCS), das estirpes de *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Corynebacterium* spp., e amostras negativas, isoladas de amostras de leite apresentando mastite subclínica - São Paulo - 2012.....50
- Tabela 5 – Valores da Mediana, Número Mínimo e Máximo da Contagem de Células Somáticas (CCS) das espécies de *Staphylococcus* coagulase-positivos de amostras de leite apresentando mastite subclínica - São Paulo - 2012.....51
- Tabela 6 – Valores da Mediana, Mínimo e Máximo da Contagem de Células Somáticas (CCS) das espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativos de amostras de leite apresentando mastite subclínica - São Paulo - 2012.....51
- Tabela 7 – Classificação (em número absoluto e porcentagem) das estirpes de *Staphylococcus* spp. isoladas de acordo com a susceptibilidade *in vitro* aos antimicrobianos testados, considerando o total de 106 amostras - São Paulo - 201252

Tabela 8 – Classificação (em número absoluto e porcentagem) das estirpes de <i>Staphylococcus</i> coagulase-positivos isoladas de acordo com a susceptibilidade <i>in vitro</i> aos antimicrobianos testados, considerando o total de 39 amostras de leite de bovinos leiteiros localizados no sul de Minas Gerais - São Paulo - 2012.....	54
Tabela 9 – Classificação (em número absoluto e porcentagem) das estirpes de <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativos isoladas de acordo com a susceptibilidade <i>in vitro</i> aos antimicrobianos testados, considerando o total de 67 amostras de leite de bovinos leiteiros localizados no sul de Minas Gerais - São Paulo - 2012	56
Tabela 10 – Classificação (em número absoluto e porcentagem) das estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i> isoladas de acordo com a susceptibilidade <i>in vitro</i> aos antimicrobianos testados, considerando o total de 19 amostras de leite de bovinos leiteiros localizados no sul de Minas Gerais - São Paulo - 2012.....	57
Tabela 11 – Valores das Medianas, Números Mínimos e Máximos das CCS de cada gene codificador de adesina e produtor de biofilme (<i>cna</i> , <i>eno</i> , <i>ebp</i> , <i>fnbB</i> , <i>fib</i> , <i>bap</i>) e de isolados que não apresentaram nenhum dos genes estudados em <i>Staphylococcus</i> spp., SCP e SCN - São Paulo - 2012	59
Tabela 12 – Resultados geral do número de amostras em relação aos genes codificadores de adesinas e produtor de biofilme (<i>cna</i> , <i>eno</i> , <i>ebp</i> , <i>fnbB</i> , <i>fib</i> , <i>bap</i>) de SCP, SCN, <i>Staphylococcus</i> spp. e <i>S. aureus</i> isolados de amostras de leite apresentando mastite subclínica. - São Paulo - 2012	61
Tabela 13 – Resultado da combinação dos genes “ <i>eno/fib/bap</i> ” (N=49), número absoluto, valores das medianas, mínimos e máximos em <i>Staphylococcus</i> spp., SCP e SCN e <i>S. aureus</i> - São Paulo - 2012.	62
Tabela 14 – Resultado da combinação dos demais genes (N=57), número absoluto, valores das medianas, mínimos e máximos em <i>Staphylococcus</i> spp., SCP e SCN e <i>S. aureus</i> - São Paulo - 2012.	62
Tabela 15 – Classificação (em número absoluto e porcentagem) das estirpes de <i>Staphylococcus</i> spp. isoladas de acordo com a susceptibilidade <i>in vitro</i> aos	

antimicrobianos testados, considerando o total de 49 amostras positivas para a combinação dos genes “*eno/fib/bap*”. - São Paulo - 201263

Tabela 16 – Classificação (em número absoluto e porcentagem) das estirpes de *Staphylococcus* spp. isoladas de acordo com a susceptibilidade *in vitro* aos antimicrobianos testados, considerando as amostras positivas para as demais combinação dos genes (N=57) - São Paulo - 2012.....64

Tabela 17 – Comparação entre as estirpes *Staphylococcus* spp. isoladas de tetos e tanques de refrigeração (número absoluto) de amostras de leite apresentando mastite subclínica - São Paulo - 2012.....67

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Mastite clínica diagnosticada através do Teste da caneca telada.....	40
Figura 2 – Mastite subclínica diagnosticada através do CMT	40
Figura 3 – Eletroforese dos fragmentos de genes <i>fnbB</i> (524pb) e <i>fib</i> (404pb), de <i>Staphylococcus</i> spp. isolados de amostras de leite, em gel de agarose a 1,5%. (1-7, 10-14= amostras testadas, M=marcador molecular, 9=controle positivo e 10= controle negativo).....	59
Quadro 1 – <i>Primers</i> utilizados na PCR para amplificar fragmentos de genes codificadores de adesinas (<i>cna</i> , <i>eno</i> , <i>ebp</i> , <i>fnbA</i> , <i>fnbB</i> , <i>fib</i> , <i>bap</i>) – São Paulo – 2012.....	43
Quadro 2 – Comparação entre as amostras de tetos e tanques de refrgeração das estirpes de <i>Staphylococcus</i> spp. isoladas de amostras de leite apresentando mastite subclínica - São Paulo - 2012.....	66

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 – Resultado geral dos exames microbiológicos de amostras de leite de bovinos leiteiros localizados no sul de Minas Gerais, considerando ausência, presença de crescimento bacteriano ou associação de bactérias no total de 313 amostras - São Paulo – 2012.....47
- Gráfico 2 – Resultado geral das estirpes de *Staphylococcus* spp. de acordo com a susceptibilidade *in vitro* aos antimicrobianos testados, considerando o total de 106 amostras de leite de bovinos leiteiros localizados no sul de Minas Gerais - São Paulo – 2012.....53
- Gráfico 3 – Resultado geral das estirpes de *Staphylococcus* coagulase-positivos de acordo com a susceptibilidade *in vitro* aos antimicrobianos testados, considerando o total de 39 amostras de leite de bovinos leiteiros localizados no sul de Minas Gerais - São Paulo – 201255
- Gráfico 4 – Resultado geral das estirpes de *Staphylococcus* coagulase-negativos de acordo com a susceptibilidade *in vitro* aos antimicrobianos testados, considerando o total de 67 amostras de leite de bovinos leiteiros localizados no sul de Minas Gerais - São Paulo – 201256
- Gráfico 5 – Resultado geral das estirpes de *Staphylococcus aureus* de acordo com a susceptibilidade *in vitro* aos antimicrobianos testados, considerando o total de 19 amostras de leite de bovinos leiteiros localizados no sul de Minas Gerais - São Paulo – 2012.....58
- Gráfico 6 – Resultado geral das estirpes de *Staphylococcus* spp. de acordo com a susceptibilidade *in vitro* aos antimicrobianos testados, considerando o total de 49 isolados positivos para a combinação de genes "*eno/fib/bap*", em amostras de leite de bovinos leiteiros localizados no sul de Minas Gerais - São Paulo – 201263
- Gráfico 7 – Resultado geral das estirpes de *Staphylococcus* spp. de acordo com a susceptibilidade *in vitro* aos antimicrobianos testados, considerando o total de 57 isolados positivos para as demais combinações de genes, em

amostras de leite de bovinos leiteiros localizados no sul de Minas Gerais	
- São Paulo – 2012.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS, SIMBOLOS E SIGLAS

® =	marca registrada
% =	por cento
°C =	graus Celsius
min =	minuto
s =	segundo
µL =	microlitro
µg =	micrograma
UI =	Unidade Internacional
céls./ml =	células por mililitros
rpm =	rotações por minuto
DNA =	ácido desoxirribonucleico
EDTA =	ácido etileno-diamino-tetracético
TE =	Tampão de eluição
PBS =	Tampão fosfato salino
DNTP =	DesoxirribonucleotídeoTrifosfato
MgCl ₂ =	cloreto de magnésio
pb =	pares de bases
PCR =	reação em cadeia da polimerase
Tris=	hidroxemetil-aminometano
pH=	concentração hidrogeniônica

et al.= e colaboradores

CCS = contagem de células somáticas

CMT = *California Mastitis Test*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1	PRODUÇÃO LEITEIRA E A MASTITE	25
2.1.1	Contagem de células somáticas	27
2.1.2	Tanque de refrigeração	29
2.2	MASTITE POR <i>STAPHYLOCOCCUS</i> SPP.	29
2.2.1	<i>Staphylococcus</i> coagulase positivo (SCP)	31
2.2.2	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativo (SCN)	32
2.3	FATORES DE VIRULÊNCIA DE <i>STAPHYLOCOCCUS</i> SPP.	34
3	OBJETIVOS	38
4	MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1	DESCRIÇÃO DAS PROPRIEDADES	39
4.2	DETECÇÃO DE MASTITE SUBCLÍNICA E COLETA DAS AMOSTRAS	39
4.3	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS	41
4.4	AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE <i>IN VITRO</i> DAS ESTIRPES DE <i>STAPHYLOCOCCUS</i> SPP. ISOLADAS FRENTE A DIVERSOS ANTIMICROBIANOS	41
4.5	PESQUISA DE GENES CODIFICADORES DE ADESINAS UTILIZANDO A REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE	42
4.5.1	Extração do DNA bacteriano	43
4.5.2	Reação em cadeia da polimerase para detecção do produto amplificado	44

4.6	CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS.....	45
4.7	COMPARAÇÃO ENTRE AMOSTRAS DE QUARTOS MAMÁRIOS E TANQUES DE REFRIGERAÇÃO	45
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
5	RESULTADOS	46
5.1	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS PRESENTES NAS AMOSTRAS DE LEITE.....	46
5.2	ANÁLISE DAS MEDIANAS DAS CCS.....	49
5.3	AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE <i>IN VITRO</i> DAS ESTIRPES DE <i>STAPHYLOCOCCUS</i> SPP. ISOLADAS FRENTE A DIVERSOS ANTIMICROBIANOS	52
5.4	PESQUISA DE ADESINAS E BIOFILME EM ESTIRPES DE <i>STAPHYLOCOCCUS</i> SPP. ISOLADAS DAS AMOSTRAS UTILIZANDO A REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE.....	58
5.4.1	Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos para associação "eno/fib/bap", a relação com o perfil geral e demais genes estudados.....	62
5.5	COMPARAÇÃO ENTRE AMOSTRAS DOS QUARTOS MAMÁRIOS E TANQUES DE RESFRIAMENTO	65
6	DISCUSSÃO	68
6.1	FREQUÊNCIA DE OCORRÊNCIA DE PATÓGENOS.....	68
6.2	ANÁLISE DAS MEDIANAS DAS CCS.....	72
6.3	AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE <i>IN VITRO</i> DAS ESTIRPES DE <i>STAPHYLOCOCCUS</i> SPP. ISOLADAS, FRENTE A DIFERENTES ANTIMICROBIANOS.....	74
6.4	PESQUISA DE ADESINAS E BIOFILME EM ESTIRPES DE <i>STAPHYLOCOCCUS</i> SPP. POR MEIO DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE.....	78

6.4.1	Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos para associação de "<i>eno/fib/bap</i>", a relação com o perfil geral e demais genes associados	83
6.5	COMPARAÇÃO ENTRE AMOSTRAS DOS TETOS E TANQUES DE REFRIGERAÇÃO.....	84
7	CONCLUSÕES.....	86
	REFERÊNCIAS.....	88

1 INTRODUÇÃO

A cada ano o Brasil consolida sua importância no setor de produção agropecuária mundial. O agronegócio brasileiro impulsiona a economia e demonstra grande potencial de crescimento (NOGUEIRA et al., 2005). A produção leiteira sempre representou, indubitavelmente, tema de alta relevância econômica, social e de saúde pública. O mercado interno é expressivo para o leite e seus derivados, e o mercado internacional tem apresentado acentuado crescimento do consumo (BRASIL, 2009).

A produção de leite no Brasil constitui uma das principais atividades agropecuárias em função de sua importância social e econômica, sendo um dos maiores setores de geração de renda nacional e arrecadação tributária. O estado de Minas Gerais se destaca como o maior produtor nacional, respondendo por 28,1% do total do leite produzido, destacando-se a região Sul como uma das mais importantes bacias leiteiras do estado (SANTOS, 2008).

Dentro do universo da pecuária leiteira, a mastite representa um importante desafio. Esta enfermidade é responsável por perdas econômicas consideráveis relacionadas principalmente com redução na produção e qualidade do leite, além de gastos com medicamentos. O segmento leiteiro reconhece a importância desta doença, bem como a necessidade de adoção de métodos de controle e prevenção desta enfermidade, considerada a mais comum e dispendiosa no gado leiteiro (PHILPOT; NICKERSON, 2002).

No cenário da mastite bovina, o gênero *Staphylococcus*, assume maior importância pela sua ampla distribuição e frequência de ocorrência. Há que se ressaltar não somente a importância de *S. aureus*, mas também de todas as outras espécies, particularmente os classificados no grupo dos coagulase-negativa, muitas vezes relegados a segundo plano, embora não menos importantes.

O esclarecimento dos fatores envolvidos na patogênese das mastites sejam clínicas ou subclínicas por *Staphylococcus* spp., assume fundamental importância, pois permite melhor orientação de medidas de controle e tratamento. Dentre estes fatores devem ser considerados os elementos intrínsecos aos patógenos envolvidos no desenvolvimento da enfermidade, cada qual com suas características peculiares, cada qual com diferentes fatores de virulência representados por componentes

estruturais, como adesinas, bem como por capacidade de produzir toxinas, enzimas e biofilmes.

O presente estudo pretende ampliar o conhecimento no tocante às características genotípicas, particularmente no que se refere à pesquisa de genes codificadores de adesinas em isolados de *Staphylococcus* coagulase-positivos e negativos obtidos de quadros de mastite bovina subclínica. Os dados obtidos foram correlacionados com informações sobre resistência antimicrobiana e contagem de células somáticas, visando ampliar o leque de informações acerca do assunto e assim permitir o desenvolvimento de estratégias mais eficientes de tratamento e controle desta enfermidade, possibilitando o aumento da produtividade leiteira.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PRODUÇÃO LEITEIRA E A MASTITE

A relação entre a mastite e a produtividade leiteira bovina há muito têm sido alvo de diversos estudos, especialmente devido a sua importância econômica. Cassali (1985) ressalta que os primeiros trabalhos científicos sobre mastite foram realizados na Europa ainda no século XVIII, quando muitos ainda acreditavam que as inflamações da glândula mamária eram causadas por picadas de mosquito, ou ainda por “maus espíritos”. No Brasil, temos que os primeiros estudos sobre mastite datam dos anos 30 (COSTA et al., 2000a).

O crescimento da produção leiteira tem sido detectado principalmente em países em desenvolvimento, destacando-se os asiáticos e latino-americanos. O Brasil aparece como o quinto maior produtor em 2009, com uma produção da ordem de 29,1 bilhões de toneladas, (FAOSTAT, 2010). Nos últimos anos, a produção brasileira aumentou cerca de 55,6%, passando de 18,7 bilhões em 1997 para 29,1 bilhões de toneladas em 2009. Entre 2000 e 2008, enquanto a produção mundial de leite bovino cresceu em média 2,1% ao ano, no Brasil esse crescimento foi de 4,0% ao ano. Os seis estados de maior produção do País são, nesta ordem, Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Paraná, Goiás, Santa Catarina e São Paulo, que respondem por 74,4% da oferta brasileira (EMBRAPA, 2011).

O Brasil desponta ainda com 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, para o período 2008/09 a 2018/19, os produtos mais dinâmicos do agronegócio brasileiro deverão ser a soja, milho, trigo, carnes, etanol, farelo de soja, óleo de soja e leite (BRASIL, 2009).

Dentro da pecuária leiteira, a mastite é a doença que causa maiores prejuízos ao produtor. Trata-se de um processo inflamatório da glândula mamária, que interfere diretamente na produção leiteira tanto em quantidade quanto em qualidade, determinando modificações na composição do leite. 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.

A maioria dos produtores de leite percebe estas perdas apenas quando há ocorrência de casos clínicos e necessidade de descarte de animais, bem como pelos custos com necessidade de mão de obra especializada e gastos com medicamentos. A perda mais importante, embora geralmente imperceptível, é a redução da produção de leite, provocada pelos casos de mastite subclínica (PHILPOT; NICKERSON, 2002), representando 70 a 80% dos custos totais (SANTOS; FONSECA, 2006).

A qualidade do leite e de seus derivados depende de diferentes fatores, ausência de substâncias estranhas como antibióticos e sujidades, ausência de micro-organismos patogênicos, sabor, odor e cor normais, e evidências de condições higiênico-sanitárias eficientes na fazenda, transporte, processamento e mercado. Tais aspectos são evidenciados por análises microbiológicas e físico-químicas, avaliação da quantidade dos constituintes de importância nutricional e concentração normal de células somáticas (CERQUEIRA; SENA, 1998).

A mastite é definida como inflamação do parênquima da glândula mamária independente da causa, caracterizando-se por uma série de alterações físicas e químicas do leite bem como modificações patológicas no tecido glandular. As transformações mais importantes observadas no leite são a sua descoloração, aparecimento de coágulos e a presença de grande número 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 possibilidade de presença de antimicrobianos no leite (RADOSTITIS et al., 2000; COSTA et al., 2002).

As mastites são classificadas, 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 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).

A mastite subclínica, por sua vez, não pode ser detectada através de observações visuais do úbere ou do leite, pois ambos apresentam aparência normal. Além do comprometimento da produção leiteira, ocorrem alterações na composição do mesmo, com elevação da contagem de células somáticas (CCS), bem como dos teores de Cl^- , Na^+ e proteínas, diminuição dos teores de caseína, lactose e gordura. Tendo em vista a não existência de sinais evidentes da doença, esta manifestação pode ser detectada somente por testes que indicam aumento de celularidade como o *California mastitis test* (CMT), *Wisconsin mastitis test* (WMT), contagem de células somáticas (CCS) e condutividade elétrica. As mastites clínicas também são diagnosticadas a partir da inspeção e palpação minuciosas da glândula mamária e da análise dos primeiros jatos de leite utilizando-se a Prova de Tamis ou caneca telada para verificar a presença de grumos, coágulos de pus ou sangue, (SCHALM, 1971; PHILPOT; NICKERSON, 2002; SANTOS; FONSECA, 2006).

Quando um patógeno invade a glândula mamária, o organismo do animal reage, enviando para o local células de defesa, principalmente leucócitos originários do sangue, na tentativa de reverter o processo infeccioso. Os leucócitos fazem parte do sistema imune, cujas células principais são: neutrófilos, linfócitos e macrófagos. No quarto mamário sadio, os macrófagos predominam (66-88%) e os neutrófilos representam cerca de 1-11%. No entanto, durante uma infecção intramamária, os neutrófilos podem compor aproximadamente 90% das células presentes no leite. Tais células, somadas as células epiteliais (derivadas de ductos e alvéolos) são denominadas Células Somáticas do leite (SANTOS, 2009).

2.1.1 Contagem de células somáticas (CCS)

Com o surgimento de métodos eletrônicos para a contagem de células somáticas, tal medida se tornou altamente difundida e muito utilizada pela maioria dos países. Segundo Reneau (2001), a contagem de células somáticas tornou-se o “padrão-ouro” para a mensuração na qualidade do leite. Tal método permite verificar a saúde dos quartos mamários e considera-se que a CCS superior a 280.000 células/ml seja um indicativo de mastite subclínica (SANTOS, 2004).

Após a invasão bacteriana na glândula mamária ocorre rápido aumento das células somáticas no quarto infectado. O objetivo dessas células é eliminar as

bactérias existentes. Se a infecção for debelada, a CCS do leite retorna aos limites normais dentro de algumas semanas, mas se o sistema imune não eliminar o agente causador, a CCS permanece acima do limite normal por longo período, podendo sofrer variação ao longo do tempo. Por isso a utilização da CCS como ferramenta para monitoramento de mastite e avaliação da qualidade do leite iniciou-se no final da década de 1970. A partir de 1992, países da União Européia adotaram como limite máximo legal para a CCS do leite para consumo humano, o valor de 400.000 cel./mL, enquanto no Canadá e nos EUA, os limites são respectivamente: 500.000 e 750.000 cel./mL, (SANTOS, 2006).

De acordo com o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2012), a implantação da Instrução Normativa 51/2002, de caráter compulsório em 2005, previa a diminuição do limite de células somáticas de 750.000 céls./mL para 400.000 céls./ml. Como os padrões estão em processo de implantação gradativa, a edição da norma passou a escalonar os prazos e limites para a redução de CCS até o ano de 2016 para todas as regiões do Brasil.

A quantidade e os tipos de células presentes estão relacionados aos diferentes fatores, como estágio da lactação, intensidade da mastite e atividade secretora de leite (SCHALM et al., 1971; RADOSTITIS et al., 2000). A elevada CCS e alta proporção de neutrófilos indicam a presença de uma inflamação aguda. Por outro lado, a baixa CCS e baixa proporção de neutrófilos, podem indicar um quadro crônico (RADOSTITIS et al., 2000; BENITES et al., 2003).

De acordo com Santos (2003), os prejuízos com a produção de leite dependem do agente causador, considerando o impacto da CCS sobre cada agente. Para tanto, é de suma importância conhecer os pontos críticos da produção leiteira e os micro-organismos predominantes na etiologia dos casos de mastite no rebanho.

Praticamente todos os casos de mastite bovina de importância econômica são causados por micro-organismos como bactérias, fungos e algas, isoladamente ou em associações. A mastite infecciosa também ocorre em maior quantidade em relação às demais e constitui um problema de saúde pública, pois muitos dos micro-organismos presentes no leite de vacas com mastite são capazes de ocasionar infecções e toxinfecções alimentares ao homem, como *Staphylococcus aureus*, determinados sorotipos de *Escherichia coli*, entre outros (COSTA, 2002; PHILPOT; NICKERSON, 2002; SANTOS; FONSECA, 2006; LANGONI, 2007).

Apesar de haver relatos de mais de 137 espécies de micro-organismos associados aos processos de mastites infecciosas, verifica-se que os agentes mais

freqüentemente isolados são: *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. e *Corynebacterium* spp. (COSTA, 2002; BENITES et al., 2003; SANTOS; FONSECA, 2006; LANGONI et al., 2007).

2.1.2 Tanque de refrigeração

A coleta de amostras de leite provenientes do tanque de refrigeração iniciou-se em 1970, auxiliando no diagnóstico da mastite bovina. Os primeiros locais a realizarem esta técnica foram na Califórnia e Minnessota - EUA, e desde então, muitos a utilizam (FARNSWORTH, 1992; JAYARAO, 2000).

Conforme Schukken et al. (1990), a correlação entre a CCS média no tanque e a ocorrência de mastite é alta, variando de 0,50 a 0,96. A elevada CCS no tanque geralmente indica perdas de produção de leite, sendo que a manutenção de baixa CCS no tanque é bom indicativo de saúde da glândula mamária dos animais do rebanho.

A coleta de amostra do tanque é um método econômico de monitorar o rebanho leiteiro. De acordo com Jayarao (2000), uma das vantagens de se utilizar este método é o tempo necessário para a realização de apenas uma amostra, menos dispendioso e custoso que analisar amostras de todo rebanho individualmente. Mas a grande desvantagem está em não saber a situação real de cada animal.

2.2 MASTITE POR *STAPHYLOCOCCUS* SPP.

Os micro-organismos 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). Tais micro-organismos são cocos Gram-positivos, imóveis, anaeróbios facultativos, de metabolismo fermentativo com produção de ácido e não gás, não esporulados, catalase-positivos e capazes de crescer em meios contendo 10% de cloreto de sódio. São micro-organismos mesófilos, com temperatura de desenvolvimento de 7-

48°C com temperatura ótima de 37°C, pH na faixa de 4-10, com ótimo de 6-7 (KLOOS; BANNERMAN, 1999).

Os estafilococos foram classificados quanto à sua origem e modo de transmissão, em micro-organismos contagiosos, transmitidos de vaca a vaca, principalmente durante a ordenha através do equipamento de ordenha ou das mãos do ordenhador, sendo agentes presentes principalmente no corpo do animal com ou sem mastite (RADOSTITIS et al., 2000; COSTA, 2002; SANTOS; FONSECA, 2006).

A mastite estafilocócica tem início com a penetração de micro-organismos através do orifício do teto em direção ao interior da glândula mamária. Estes agentes instalam-se e multiplicam-se no parênquima mamário associados às condições favoráveis no interior da glândula. A partir de então, os produtos oriundos do crescimento bacteriano e de seu metabolismo, desencadeiam uma resposta inflamatória que culmina com a destruição das células secretoras (RADOSTITIS et al., 2000).

A penetração dos micro-organismos através do canal do teto pode ocorrer no período entre as ordenhas ou durante a mesma, seja esta manual ou mecânica. O potencial de invasão é aumentado pela presença de micro-organismos na superfície externa do teto, fator que ocorre tanto durante a lactação como 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 micro-organismo pode aderir à superfície mucosa e produzir fatores de virulência (coagulase, hemolisinas, estafiloquinase, hialuronidase) que permitam seu estabelecimento e multiplicação no interior dos ductos e cisternas, para invasão no tecido interacinar (DEGO et al., 2002).

Durante a multiplicação dos agentes bacterianos ocorre 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. Ocorre 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 no sentido de 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 esta amplamente disseminada pela glândula, grande parte da mesma pode ser lesada, mas se houver poucos e

pequenos focos, os efeitos serão menos severos sendo que, em qualquer das situações, ocorre redução na produção leiteira, fibrose e involução (RADOSTITIS et al., 2000).

A ocorrência e o tipo de sintomatologia da mastite estafilocócica estão relacionados fundamentalmente à patogenicidade do micro-organismo e à sua capacidade de invasão tecidual, bem como à resistência da glândula mamária. Estes fatores determinam a severidade dos sintomas, que podem variar desde uma mastite subclínica até uma mastite clínica com ocorrência de alteração visível da composição e aspecto físico do leite com presença de grumos de fibrina ou pus, quadro este muitas vezes acompanhado de alteração de tamanho, consistência e temperatura da glândula mamária, e até mesmo a formação gradual de fibrose tecidual sem sinais sistêmicos ou então a ocorrência destes (SUTRA; POUTREL, 1994; BENITES et al., 2003; HAVERI et al., 2005). A infecção consiste num processo inflamatório da glândula mamária causado por diferentes espécies de *Staphylococcus*, podendo também acometer fêmeas ovinas, caprinas, bubalinas e equinas.

A especificação do gênero *Staphylococcus* em espécie é crucial tanto na medicina humana quanto veterinária para a determinação das fontes de infecção, caracterização da patologia e para a condução dos estudos; mais de 50 espécies e subespécies já foram descritas. As espécies de *Staphylococcus* spp. mais freqüentemente isoladas são *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. chromogenes*, *S. hyicus*, *S. xylosus*, *S. simulans* e *S. cohnii*, embora outras também sejam isoladas (PYÖRÄLÄ; TAPONEM, 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-positivos (SCP) e *Staphylococcus* coagulase-negativos (SCN).

2.2.1 *Staphylococcus* coagulase positivos (SCP)

Dentre os agentes mais frequentemente isolados, a espécie mais prevalente é o *Staphylococcus aureus*, presente em aproximadamente 50% das infecções da glândula mamária de bovinos leiteiros, podendo se apresentar como fonte de infecção permanente durante toda a fase de lactação (FERREIRA et al., 2006).

Esta predominância ocorreu após o advento dos antibióticos e seu uso indiscriminado, favorecendo ao aparecimento de micro-organismos resistentes (FERREIRO, 1980; BLOOD; RADOSTITIS, 1991).

Uma vez no interior da glândula ou no canal do teto, a bactéria se fixa às células do órgão e promove infecção por mecanismos patológicos, como produção de toxinas e conseqüente necrose, que interfere na secreção glandular, baixando extraordinariamente a produção de leite (RADOSTITS, 2000). Os *S. aureus* assim como outras espécies, podem se envolver em processos clínicos ou subclínicos, elevando o número de células somáticas no leite em nível individual ou do rebanho, o que requer o emprego de estratégias higiênico-sanitárias (THIMOTHY, 2000). A permanência de um animal infectado pode potencializar a contaminação no rebanho, por isso a importância de se encurtar 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). Mesmos assim, em algumas situações o descarte de vacas infectadas é considerado o meio mais efetivo de reduzir o nível de infecções por estes micro-organismos dentro rebanho, o que não é muito comum na grande maioria dos criatórios (SPINNOSA, 1999; VON EIFF, 2002; SANTOS; FONSECA, 2006).

Espécies como *S. intermedius*, *S. hyicus*, *S. schleiferi* e *S. lutrae* também podem ser encontradas. Os considerados patógenos oportunistas em animais, *Staphylococcus intermedius*, *S. hyicus*, coagulase variável, e *S. aureus*, afirmam a importância de um adequado manejo higiênico-sanitário (KLOOS; BANNERMAN, 1999).

2.2.2 *Staphylococcus* coagulase negativos (SCN)

Quanto aos *Staphylococcus* coagulase-negativos, algumas décadas atrás, foram raramente reportados como causadores de mastite, e classificados como “bactérias secundárias” (VERHOEFF et al., 1981). O principal foco de controle da mastite nas décadas 1970, 80 e 90 estava na mastite contagiosa que abrangem os patógenos *Streptococcus agalactiae* e *S. aureus*. Segundo Tenhagen et al. (2006), aos poucos, os SCN tornaram-se os patógenos predominante isolados de mastite subclínica bovina em diversos países. Tais agentes são considerados da microbiota

dos bovinos, e podem ser encontrados também no ambiente, como camas de areia, canais dos tetos, pele, narinas, e leite. Algumas bactérias pertencentes a esse grupo são: *S. xylosus*, *S. sciuri*, *S. saprophyticus*, *S. warneri*, *S. schleiferi*, *S. simulans*, *S. intermedius*, algumas isoladas da pele dos bovinos, outras de amostras de leite, como *S. epidermidis*, *S. chromogenes*, (MYLLYS; HONKANEN-BUZLADKI; VIRTANEN, 1998).

Conforme Pyörälä e Taponem (2009), os SCN são patógenos comuns nos rebanhos leiteiros e estão principalmente associados aos casos subclínicos, com presença de células somáticas próximas a 1.000.000 céls./ml de leite, resultando em perdas econômicas devido a penalidades de preços incorridos pela qualidade reduzida, ou ainda leves quadros de mastite clínica. Tais autores também relatam a presença desses agentes mais comuns em primíparas que múltíparas, podendo causar danos ao tecido mamário. Não se sabe ao certo se esses agentes se comportam como patógenos contagiosos ou ambientais, mas medidas de controle higiênico-sanitárias são adotadas na tentativa de reduzir infecções, principalmente às reincidentes.

A partir do momento que se buscou diminuir o número de células presentes no leite, verificaram-se quão importantes eram as infecções intramamárias causadas pelos SCN. Constatou-se que a presença destes agentes é maior em propriedades que reduziram o número de infecções causadas por outros patógenos, sendo mais freqüentes em animais de primeira lactação (SILVA, 1999; LAFFRANCHI et al., 2001). Este processo geralmente é atribuído à eficiência da terapia da vaca seca no controle desses micro-organismos. Na maioria dos casos, as infecções com SCN ocorrem imediatamente após a parição, declinam no meio da lactação e os índices aumentam novamente no final da lactação até que a vaca receba terapia do período seco, conforme Honkanen-Buzalski et al. (1994).

Apesar de serem considerados menos patogênicos que os *S. aureus*, as infecções têm sido associadas com 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). Mesmo sensíveis aos tratamentos com uma variedade de antibióticos, os índices de curas espontâneas das infecções causadas são considerados baixos, vacas e novilhas podem ser infectadas até mesmo antes do parto (DE VLIEGHER et al., 2005). Com a antibióticoterapia no período seco, ao final da primeira lactação, diminui-se o número de casos nas lactações seguintes.

Apesar da sua importância como patógenos causadores de mastite, existem poucos relatos descrevendo o potencial dos SCN em relação aos fatores de virulência e aos mecanismos de infecção.

2.3 FATORES DE VIRULÊNCIA DE *STAPHYLOCOCCUS* SPP.

A patogenicidade do micro-organismo depende da combinação de vários fatores relativos ao animal, como presença de traumas, *status* imune, e à linhagem bacteriana como fatores de virulência representados pela capacidade de produzir toxinas, enzimas, e/ou adesinas e biofilmes. A regulação da produção de fatores de virulência ocorre através de um sistema complexo e eficiente que produz uma resposta coordenada da bactéria frente às alterações ambientais durante o curso da doença (FISCHETTI et al., 2006).

Diferentes fatores de virulência foram descritos relativos aos estafilococos, sendo que a maior parte deles foi estudada em *S. aureus*, embora alguns também tenham sido encontrados em outras espécies. Tais fatores de virulência 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).

A infecção estafilocócica tem início a partir da adesão do micro-organismo ao tecido do hospedeiro. A adesão é favorecida pela presença de fatores de virulência denominados adesinas, que estão agrupadas em uma família denominada *microbial surface components recognising adhesive matrix molecules* (MSCRAMM). O envolvimento destas proteínas na patogenia ainda é pouco esclarecido. Estas adesinas são proteínas ancoradas na superfície bacteriana que possuem habilidade de se ligar à matriz extracelular e componentes plasmáticos do hospedeiro (LOWY, 1998; CHEUNG et al., 2002). Estes componentes da superfície bacteriana geralmente estão covalentemente ligados ao peptideoglicano da parede celular e reconhecem colágeno (proteína ligadora de colágeno), fibronectina (proteína ligadora de fibronectina), fibrinogênio (proteína ligadora de fibrinogênio), elastina

(proteína ligadora de elastina) e laminina (proteína ligadora de laminina) (FOSTER; HÖÖK, 1998).

As adesinas bem como o peptidoglicano e os ácidos lipoteicóicos presentes na parede celular bacteriana, podem estimular uma reação do hospedeiro traduzida por um processo inflamatório. Neste momento, a sobrevivência e multiplicação da bactéria no hospedeiro dependem, no tocante à bactéria, de sua resistência à opsonização e fagocitose, mediada pela proteína A e/ou cápsula e/ou leucocidinas e/ou produção de biofilme, devendo-se considerar ainda a quantidade de micro-organismos no local. No momento em que o hospedeiro permite a adesão e multiplicação do micro-organismo, ocorre aumento da população e colonização bacteriana bem como intensificação do processo de invasão tecidual mediado por enzimas (proteases, lipases, hialuronidasas) e toxinas, geralmente resultando em processos supurativos ou formação de abscessos, condições estas bastante peculiares nas infecções por *Staphylococcus* spp. (FISCHETTI et al., 2006).

São escassos os dados na literatura acerca de adesinas em *Staphylococcus* coagulase-positivos e principalmente dos negativos e, particularmente sobre seu papel na patogenia das mastites. 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).

Segundo Smeltzer et al. (1997), os genes codificadores da proteína ligadora de fibronectina (*fnbB*) podem ser encontrados na maioria das linhagens de *S. aureus*. Ainda em relação ao mesmo agente, Kumar et al. (2010), encontraram os genes como *ebp*, *fib*, *fnbB* e *cna* e associações dos mesmos como *fib/eno/fnbA*, *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. Para isso, o método da Reação em Cadeia das Polimerase (PCR) tem sido utilizado como caracterização molecular de bactérias, principalmente de *S. aureus*, em casos de mastite bovina, (SALASIA et al., 2004; REINOSO et al. 2008).

Os biofilmes, por sua vez, conforme relatam Melchior et al. (2006), são uma comunidade estruturada de bactérias envolvidas por uma matriz de polímeros produzidos pelos próprios micro-organismos, aderentes à superfície de um

biomaterial, como equipamentos de ordenha. A estrutura se adere à superfície das células dos hospedeiros, gerando proteção aos micro-organismos. Nele há partículas de proteínas, lipídeos, fosfolipídeos, carboidratos, sais minerais e vitaminas, que formam uma espécie de crosta, sob a qual os micro-organismos crescem, formando um cultivo puro ou uma associação com outros agentes.

A formação do biofilme começa com a fixação das bactérias às células do hospedeiro. 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 (DUBRAVKA et al., 2010).

A primeira fase de formação envolve a ligação das células facilitadas pelas adesinas associadas à parede celular. A ligação aumenta devido a presença da matriz protéica incluindo as fibronectinas e fibrinogênios, enquanto a laminina não mostra nenhum efeito. A segunda etapa é caracterizada pela multiplicação e formação celular conectada a polissacarídeos extracelulares. (YARWOOD; SCHLIEVERT, 2003). Finalmente no processo de maturação, o “*slime*” protege a bactéria com uma natureza química ainda desconhecida, mas com evidências de predominância de polissacarídeos.

As primeiras observações para o fator de virulência relacionado à produção de biofilme foram realizadas em *S. epidermidis*, que segundo Michelin et al. (2005) é considerado o principal fator de virulência desta espécie. Em seguida os mesmos genes foram verificados para os *S. aureus*, (MACK et al., 1996). Além da proteção contra atividade macrofágica e opsonização que o “*slime*” produz, foi verificado também, um decréscimo na atividade celular de neutrófilos contra o biofilme produzido por *S. aureus* (JOHNSON et al., 1986; YASUDA et al., 1994; BARRIO et al., 2000).

No processo de formação dos biofilmes de diversas espécies bacterianas, existe a participação de um grupo de proteínas de superfície, isolado de *S. aureus* de mastite bovina, identificada como a proteína *bap* (*biofilm-associated protein*) considerada essencial para a formação do mesmo (CUCARELLA et al., 2001). Tal proteína associada às adesinas, polissacarídeos e fatores de aglutinação, contribuem para a estrutura dos biofilmes (GOTZ, 2002). Há relatos de diversas doenças indicando que amostras positivas para biofilmes estão mais frequentemente relacionadas a infecções, do que amostras negativas para a presença do mesmo.

O biofilme confere proteção contra a ação de antimicrobianos bem como contra os mecanismos de defesa do organismo (DONLAN; COSTERTON, 2002; STOODLEY et al., 2002). As infecções associadas às adesinas são difíceis de tratar pela fraca penetração dos antimicrobianos que, geralmente ligam-se ao polímero do biofilme. Além disso, os fagócitos não podem penetrar com eficiência na bactéria, devido a presença do biofilme, dessa maneira, o agente bacteriano se torna mais protegido, dificultando a ação de antimicrobianos e desinfetantes, (MELCHIOR et al., 2009).

Assim sendo, são necessários estudos que permitam elucidar a existência de adesinas e atuação destas na patogênese das mastites bovinas por *Staphylococcus* coagulase-positivos e negativos. Há que se considerar também que o esclarecimento do papel das mesmas pode auxiliar no desenvolvimento de estratégias de tratamento e controle de mastites por *Staphylococcus* spp., como por exemplo, a utilização destes fatores de virulência como alvos primários de medicamentos e vacinas.

3 OBJETIVOS

O presente estudo tem como objetivo geral esclarecer aspectos da epidemiologia das mastites subclínicas através de estudos de isolamento de micro-organismos, contagens de células somáticas, estudos genotípicos e de perfis de resistência a antimicrobianos.

Como objetivos específicos:

1. Pesquisar a presença de genes codificadores em espécies de *Staphylococcus* spp., das seguintes adesinas: proteína ligadora de colágeno (*cna*), proteína ligadora de lâmina (*eno*), proteína ligadora de elastina (*ebp*), proteína ligadora de fibrinogênio (*fib*), proteína A ligadora de fibronectina (*fnbA*), proteína B ligadora de fibronectina (*fnbB*) e proteína associada à formação de biofilme (*bap*);
2. Verificar a quantidade de células somáticas no leite de vacas com mastite subclínica por *Staphylococcus* spp.;
3. Avaliar a susceptibilidade “*in vitro*” das espécies de *Staphylococcus* isoladas frente aos antimicrobianos;
4. Correlacionar dados sobre as características dos micro-organismos (presença de adesinas e resistência aos antimicrobianos) com achados no leite das vacas com mastite subclínica (contagem de células somáticas).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. DESCRIÇÃO DAS PROPRIEDADES

Foram avaliadas cinco pequenas propriedades leiteiras no sul do estado de Minas Gerais, totalizando 365 fêmeas bovinas holandesas e mestiças, primíparas e múltiparas. O manejo adotado é o semi-intensivo, como na maior parte das propriedades da região. O rebanho é criado a pasto do tipo *brachiaria brizantha* e, no momento em que são ordenhados, ou após a ordenha, recebem suplementação alimentar com concentrado, e no inverno silagem de milho. A ração é composta basicamente por milho, polpa de laranja, soja, caroço de algodão e calcário, e a suplementação mineral é realizada no comedouro e/ou a pasto. A quantidade de concentrado administrado é baseada na produção leiteira de cada animal, com excessão da quinta fazenda analisada, que mantém alimentação à vontade. A cada três litros de leite é fornecido um quilo de concentrado.

Os animais são ordenhados mecanicamente duas vezes ao dia, uma ordenha no período da manhã e outra no período da tarde. Todas as propriedades realizam a higienização dos tetos e o teste da caneca telada antes da ordenha de cada animal. Ao nascerem, os bezerros são apartados das mães e separados em bezerreiros individuais, por sistema de casinhas ou barracões, e o colostro administrado em mamadeiras. Com excessão da segunda propriedade analisada, todas realizam terapia da vaca-seca com dois meses de antecedência ao parto.

4.2 DETECÇÃO DE MASTITE SUBCLÍNICA E COLETA DE AMOSTRAS

As fêmeas em lactação foram submetidas a provas de campo, Tamis ou Teste da caneca telada (RADOSTITS et al., 2000) e *California Mastitis Test* (CMT) (SCHALM; NOORLANDER, 1957) para detecção de mastites clínica e subclínica, conforme figuras 1 e 2 respectivamente.

Figura 1 - Mastite clínica diagnosticada através do Teste da caneca telada.

Figura 2 - Mastite subclínica diagnosticada através do CMT.

Trezentos e sessenta e cinco fêmeas bovinas foram avaliadas e submetidas a provas de campo, totalizando 1460 testes de Tamis e CMT. Foram coletadas amostras de leite de animais que apresentavam mastite subclínica, totalizando trezentos e treze amostras de cento e setenta e três animais.

Amostras positivas para mastites clínica foram excluídas do estudo, e somente amostras subclínicas foram submetidas a exames microbiológicos para isolamento e pesquisa de genes codificadores de adesinas e contagem de células somáticas.

4.3 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS

As amostras de leite colhidas para exames microbiológicos foram obtidas da seguinte maneira: após a lavagem dos tetos com formaldeído e a devida higienização dos mesmos com algodão embebido em álcool iodado, coletou-se assepticamente 5ml de leite em tubos estéreis. As amostras foram transportadas ao laboratório de Bacteriologia e Micologia – FMVZ/USP, em condição de refrigeração, onde foram submetidas aos exames microbiológicos.

De cada amostra, 10 µL de leite foram semeados na superfície de placas de Petri contendo ágar-sangue ovino a 5%. Após a semeadura, as placas foram incubadas em aerobiose a 37 °C, com leitura realizada após 24 horas. As bactérias isoladas foram identificadas de acordo com características macroscópica (verificação morfológica da colônia) e microscópicas (esfregaços corados pelo método de Gram). Analisou-se a presença de colônias hemolíticas que apresentassem coloração branco-acinzentada ou amarelo-ouro. As bactérias que se revelaram como cocos Gram-positivos foram submetidas à prova da catalase. Posteriormente realizaram-se provas bioquímicas conforme descrito por Murray et al. (2007), como prova da coagulase lenta em plasma de coelho, urease, produção de acetoina em caldo VP (“Voges Proskauer”), lactose, trealose, maltose, sacarose, manitol. Nos casos em que houve necessidade, foi utilizado o sistema *RapID Staph* (Thermo Fisher Scientific®) para confirmação das espécies de *Staphylococcus* spp.

4.4 AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE *IN VITRO* DAS ESTIRPES DE *STAPHYLOCOCCUS* SPP. ISOLADAS FRENTE A DIVERSOS ANTIMICROBIANOS

Os testes de susceptibilidade *in vitro* de 106 *Staphylococcus* spp. foram realizados frente a diversos antimicrobianos, a saber: amoxicilina (10µg), ampicilina (10µg), cefalexina (30µg), cefalotina (30µg), cefoperazone (75µg), ceftiofina (30µg), ceftiofur (30µg), clindamicina (20µg), cloranfenicol (30µg), enrofloxacina (5µg), eritromicina (15µg), gentamicina (10µg), neomicina (30µg), norfloxacina (10µg),

oxacilina (10µg), penicilina (10 U.I.), sulfametoxazol+trimetoprin (25µg), tetraciclina (30µg).

Os testes foram realizados em meio de Müller Hinton, empregando-se o método de disco difusão, segundo técnica de Bauer et al. (1966). Sua interpretação fora realizada pela medida do diâmetro do halo de inibição do crescimento do micro-organismo. As concentrações, bem como o critério de interpretação, foram os recomendados pela “*Clinical and Laboratory Standards Institute*” (2008).

4.5 PESQUISA DE GENES CODIFICADORES DE ADESINAS E BIOFILME UTILIZANDO A REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

A pesquisa de genes codificadores de adesinas em estirpes de *Staphylococcus* spp. isoladas de amostras de leite foi realizada através de reação em cadeia da polimerase (PCR) das 106 estirpes de *Staphylococcus* spp.

Foram utilizados diferentes pares de oligonucleotídeos comercialmente disponíveis, sendo PCR-1, para detectar os genes que codificam para proteína ligadora de colágeno (*cna*), proteína ligadora de laminina (*eno*), proteína ligadora de elastina (*ebp*); PCR-2, proteína ligadora de fibrinogênio (*fib*), proteína A ligadora de fibronectina (*fnbA*), proteína B ligadora de fibronectina (*fnbB*) conforme descrito por Tristan et al. (2003). Para PCR-3, foi realizada a pesquisa de genes codificadores de proteína associada à formação de biofilme (*bap*) utilizando o protocolo descrito por Vancraynest et al. (2004). O tamanho dos amplicons e literatura relevante estão apresentados no quadro 1.

Quadro 1- *Primers* utilizados na PCR para amplificar fragmentos de genes codificadores de adesinas (*cna*, *eno*, *ebp*, *fnbA*, *fnbB*, *fib*, *bap*) – São Paulo – 2012

Proteína	Iniciador	Sequência (5' - 3')	Tamanho do produto amplificado
Ligadora de colágeno	<i>cna-1</i>	GTCAAGCAGTTATTAACACCAGAC	423
	<i>cna-2</i>	AATCAGTAATTGCACTTTGTCCACTG	
Ligadora de laminina	<i>eno-1</i>	ACGTGCAGCAGCTGACT	302
	<i>eno-2</i>	CAACAGCATCTTCAGTACCTTC	
Ligadora de elastina	<i>ebp-1</i>	CATCCAGAACCAATCGAAGAC	186
	<i>ebp-2</i>	CTTAACAGTTACATCATCATGTTTATCTTTTG	
A ligadora de fibronectina	<i>fnbA-1</i>	GTGAAGTTTTAGAAGGTGGAAAGAITAG	643
	<i>fnbA-2</i>	GCTCTTGTAAGACCATTTTTCTTCAC	
B ligadora de fibronectina	<i>fnbB-1</i>	GTAACAGCTAATGGTCTGAATTGATACT	524
	<i>fnbB-2</i>	CAAGTTCGATAGGAGTACTATGTTC	
Ligadora de fibrinogênio	<i>fib-1</i>	CTACAACACTACAATTGCCGTCAACAG	404
	<i>fib-2</i>	GCTCTTGTAAGACCATTTTTCTTCAC	
Associada à formação de biofilme	<i>bap-1</i>	CCCTATATCGAAAGGTGTAGAATTG	971
	<i>bap-2</i>	GCTGTTGAAGTTAATACTGTACCTGC	

4.5.1 Extração do DNA bacteriano

A obtenção do material genético foi realizado pela técnica de extração de Boom et al. (1990). Foi realizada a suspensão da colônia em PBS e posteriormente adicionada 20µL de proteinase K e 100µL de lisozima, e incubados em estufa a 37°C. Adicionou-se 1000 µL de tampão de lise e 40µL de suspensão carreadora. Centrifugou-se a 12800 rpm por 1' e 30'', descartado o sobrenadante e ressuspendida a reação em 500µL de tampão de lavagem. Descartou-se o conteúdo, sem tocar no pélet, e adicionou-se 500µL de álcool etílico a 70%, centrifugou-se novamente a 12800 rpm por 1' e 30'', descartado o sobrenadante e adicionado 500µL de acetona 99,5%. Após nova centrifugação 12800 rpm por 2', foi descartado o sobrenadante, e o tubo aberto foi colocado em estufa a 37°C por um mínimo de 30'. Adicionou-se 150µL de tampão de eluição (TE) e incubou-se em banho-seco 55-56°C por 10'. Foi realizada outra centrifugação 12800 rpm por 5', retirou-se o sobrenadante e para assegurar a ausência de sílica, foi centrifugado

pela última vez a 12800 rpm por 2'. Até que o produto fosse amplificado, foi guardado em freezer a - 20°C.

4.5.2 Reação em cadeia da polimerase e detecção do produto amplificado

Fora realizado o protocolo de reação descrito por Tristan et al. (2003). Dois conjuntos de *primers* foram utilizados em reação de PCR multiplex: PCR-1 para amplificar *cna*, *ebp* e *eno* e PCR-2 para amplificar *fnbA*, *fnbB* e *fib*. Para a amplificação do gene *bap* foi utilizado o protocolo de reação conforme Vancraeynest et al. (2004). A cada extração realizada foram utilizados controles positivos contendo os genes codificadores das adesinas e biofilme conforme Quadro I, e um controle negativo.

Para as reações de amplificação foi utilizado um volume final de 25µL da mistura, contendo 1µL da solução de DNA extraído, 2,5µL de Tampão concentrado 10X, 4µL de dNTPs, 0,8µL de MgCl₂, 0,2µL de Taq DNA Polimerase, 1,25µL de cada primer, 9µL de água (PCR 1 e 2) e 14µL de água (PCR-3). As reações foram amplificadas em um termociclador 2720 *Thermal Cycler* (Termo Applied Biosystems®). Para PCR-1 e 2 as reações foram realizadas nas seguintes condições: desnaturação inicial de 30s a 4°C, seguida de 5 min a 94°C, 25 ciclos de amplificação com duração 1 minuto a 94°C, com temperatura de anelamento de 1 minuto a 53°C e 1 min a 72°C. A reação foi concluída com incubação de 10 min a 72°C. Para PCR-3, as condições de amplificação incluem uma desnaturação inicial de 30s a 94°C seguida de 30 ciclos, sendo 45s a 94°C, com a temperatura de anelamento de 1 min a 62°C e 1min a 72°C, terminando com a temperatura de incubação de 7 min a 72°C.

Para visualização e análise dos fragmentos de DNA amplificado pela reação de PCR, os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, preparado em tampão de 0,5X TBE (Tris base 890mM; EDTA 25mM; ácido Bórico 89mM). Para visualização dos tamanhos dos produtos da PCR, alíquotas dessas amostras misturadas a solução tampão (azul de bromofenol 0,25% e glicerol 30%) e padrão de massa molecular conhecido (1000pb DNA Ladder – Invitrogen™) foram submetidos à separação eletroforética por cerca de 40 minutos a 110 volts. O gel,

então foi corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta em um transiluminador e por fim, registrado por fotografia digital.

4.6 CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS

Após a higienização dos tetos, amostras de leite foram colhidas e acondicionadas em frascos plásticos com capacidade para 60 ml contendo bronopol. Em seguida, ou até um dia após a coleta, as amostras foram encaminhadas à Clínica do Leite – Esalq/USP, Piracicaba/SP, para realização da Contagem de Células Somáticas por citometria de fluxo, utilizando-se o equipamento Somacount 300® (BENTLEY INSTRUMENTS, 1995).

4.7 COMPARAÇÃO ENTRE AMOSTRAS DE QUARTOS MAMÁRIOS E TANQUES DE REFRIGERAÇÃO

Após resultados microbiológicos dos tetos e tanques de refrigeração, realizou-se a comparação entre os agentes patogênicos isolados em cada situação.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas de forma descritiva. Os valores absolutos foram tabulados, calculados os respectivos percentuais e comparados aos dados da literatura. A significância estatística foi definida por um valor de p menor que 0,05. As análises das variáveis foram realizadas utilizando o teste de Fischer, empregando-se o *software Graphpad Instat* (1992-98).

5 RESULTADOS

5.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS PRESENTES NAS AMOSTRAS DE LEITE

Foram avaliadas 365 vacas leiteiras, totalizando 1460 tetos. Cento e setenta e três animais foram reagentes ao teste de CMT, sendo obtidas 313 amostras de leite, e cinco amostras de tanques de refrigeração, para exames microbiológicos e contagem de células somáticas.

Do total de 313 amostras, 60,4% (N=189) apresentaram crescimento bacteriano, sendo as demais 39,6% (N=124) negativas para a presença dos mesmos, diferença esta estatisticamente significativa ($p < 0,0001$).

Dentre as 189 amostras em que houve crescimento bacteriano, 181 delas tiveram crescimento puro, a saber: *Staphylococcus* spp. 30,6% (N=96), *Streptococcus* spp. 17% (N=53) e *Corynebacterium* spp. 10,2% (N=32). As outras oito amostras restantes apresentaram crescimento de colônias mistas, sendo 0,6% (N=2) associação de SCP e SCN, e as outras 1,9% (N=6) SCN e *Streptococcus* spp., (Tabela 1 e Gráfico 1).

Estatisticamente a frequência de *Staphylococcus* spp. foi maior que *Streptococcus* spp. e *Corynebacterium* spp. ($p < 0,001$). Com relação aos *Staphylococcus* spp., a frequência de SCN foi estatisticamente maior que SCP ($p < 0,02$).

Tabela 1 - Resultado geral dos exames microbiológicos de amostras de leite de bovinos leiteiros localizados no sul de Minas Gerais, considerando ausência, presença de crescimento bacteriano ou associação de bactérias no total de 313 amostras- São Paulo – 2012

(continua)

Relação das bactérias isoladas	Número absoluto em relação ao N total de amostras (N=313)	% em relação ao N total de amostras (N=313)
<i>Staphylococcus</i> spp.	96	30,6%
SCP	37	11,8%
SCN	59	18,8%
<i>Streptococcus</i> spp.	53	17,0%
<i>Corynebacterium</i> spp.	32	10,2%
Associação entre SCP-SCN	2	0,6%

(conclusão)

Relação das bactérias isoladas	Número absoluto em relação ao N total de amostras (N=313)	% em relação ao N total de amostras (N=313)
Associação entre SCN e <i>Streptococcus</i> spp.	6	2,0%
Amostras sem crescimento	124	39,6%

Gráfico 1 - Resultado geral dos exames microbiológicos de amostras de leite de bovinos leiteiros localizados no sul de Minas Gerais, considerando ausência, presença de crescimento bacteriano ou associação de bactérias no total de 313 amostras - São Paulo – 2012

Analisando apenas as estirpes de *Staphylococcus* spp., observa-se 96 amostras de colônias puras, 6 amostras de crescimento misto (entre SCN e *Streptococcus* spp.) e mais quatro provenientes de duas amostras em que houve associação se SCP e SCN, totalizando assim 106 amostras.

Das estirpes de *Staphylococcus* isoladas, 36,8% (N=39) foram *Staphylococcus* coagulase-positivo, e 63,2% (N=67) *Staphylococcus* coagulase-negativo, diferença esta estatisticamente significativa ($p < 0,02$), indicando que frequência de SCN é maior que SCP.

Em relação aos SCP, houve crescimento de *S. aureus* em 48,7% (N=19), *S. intermedius* em 33,3% (N=13), *S. schleiferi* subsp. *coagulans* em 12,9% (N=5), *S.*

hyicus em 5,1% (N=2). Apesar do maior número de *S. aureus*, sua frequência não foi estatisticamente maior que a de *S. intermedius*, porém foi maior que a dos demais SCP ($p < 0,004$), (Tabela 2).

Analisando as 67 amostras de SCN, houve crescimento de doze estirpes diferentes, sendo: *S. chromogenes* em 16,4% (N=11), *S. warneri* em 14,9% (N=10), *S. cohnii* subsp. *cohnii*, *S. saprophyticus* subsp. *saprophyticus* e *S. xylosus* em 10,4% (N=7), *S. capitis* subsp. *capitis* em 9,0% (N=6), *S. arlettae* e *S. sciuri* subsp. *sciuri*, em 7,5% (N=5), *S. haemolyticus* e *S. epidermidis* 4,5% (N=3), *S. auricularis* em 3,0% (N=2) e *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* em 1,5% (N=1). Com relação aos *Staphylococcus* coagulase-negativos não houve diferença estatística entre as espécies apresentadas na tabela 3.

Tabela 2 – Frequência de ocorrência (em número absoluto e porcentagem) das estirpes de *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus* coagulase-positivas (SCP) isoladas de amostras de leite apresentando mastite subclínica, considerando o total de 106 amostras - São Paulo - 2012

Relação dos SCP	Ocorrência de SCP (número de estirpes)	% em relação ao N total <i>Staphylococcus</i> spp. (N=106)	% em relação ao N de SCP (N=39)
<i>S. aureus</i>	19	17,9%	48,7%
<i>S. intermedius</i>	13	12,2%	33,3%
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i>	5	4,7%	12,9%
<i>S. hyicus</i>	2	2%	5,1%
Total	39	36,8%	100%

Tabela 3 – Frequência de ocorrência (em número absoluto e porcentagem) das estirpes de *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus* coagulase-negativas (SCN) isoladas de amostras de leite apresentando mastite subclínica, considerando o total de 106 amostras - São Paulo - 2012

(continua)

Relação dos SCN	Ocorrência de SCN (número de amostras)	% em relação ao N total <i>Staphylococcus</i> spp. (N=106)	% em relação ao N de SCN (N=67)
<i>S. chromogenes</i>	11	10,4%	16,4%
<i>S. warneri</i>	10	9,4%	14,9%
<i>S. cohnii</i> subsp <i>cohnii</i>	7	6,6%	10,4%
<i>S. xylosus</i>	7	6,6%	10,4%
<i>S. saprophyticus</i> subsp <i>saprophyticus</i>	7	6,6%	10,4%
<i>S. capitis</i> subsp <i>capitis</i>	6	5,7%	9,0%

(conclusão)			
Relação dos SCN	Ocorrência de SCN (número de amostras)	% em relação ao N total <i>Staphylococcus</i> spp. (N=106)	% em relação ao N de SCN (N=67)
<i>S. arlettae</i>	5	4,7%	7,5%
<i>S. sciuri</i> subsp <i>sciuri</i>	5	4,7%	7,5%
<i>S. haemolyticus</i>	3	2,8%	4,5%
<i>S. epidermidis</i>	3	2,8%	4,5%
<i>S. auricularis</i>	2	1,9%	3,0%
<i>S. schleiferi</i> subsp <i>schleiferi</i>	1	0,9%	1,5%
TOTAL	67	63,2%	100%

Das cinco amostras de leite coletadas de tanque de expansão, totalizaram oito estirpes de *Staphylococcus* spp., sendo da primeira coleta (*S. arlettae*, *S. conhnii* subsp. *conhnii*, *S. haemolyticus* e *S. aureus*), da segunda coleta (*S. intermedius*), terceira coleta (*S. aureus* e *S. chromogenes*), e quinta coleta (*S. sciuri* subsp. *sciuri*).

Todas as análises a seguir referem-se apenas às amostras coletadas dos tetos, e não de tanques de refrigeração, que serão analisadas em separado.

5.2 ANÁLISE DAS MEDIANAS DAS CCS

Dado que o desvio-padrão foi maior que a média, indicando que a distribuição é não-paramétrica, utilizou-se como estatísticas descritivas a mediana, o mínimo e o máximo. Para tanto, a mediana da contagem de células somáticas pelo método automático (total) das amostras nas quais houve isolamento bacteriano do gênero *Staphylococcus* foi de 680.600 céls./ml, com valores mínimo e máximo, respectivamente, de 12.000 e 7.130.000 céls./ml. Para os SCP a mediana foi de 517.000 céls./ml, com valores mínimo e máximo, respectivamente de 12.000 e 7.130.000 céls./ml, enquanto que para SCN o resultado da mediana foi de 729.000 céls./ml, como valores mínimo e máximo respectivamente, 58.000 e 3.431.000 céls./ml. Para *Streptococcus* spp. a mediana foi de 1.849.000 céls./ml, com valores mínimo e máximo de 142.000 e 8.872.000 céls./ml, respectivamente. Para *Corynebacterium* spp. a mediana foi de 298.000 céls./ml, com valores mínimo e máximo de 58.000 e 942.000 céls./ml respectivamente. Quanto às amostras que não

apresentaram crescimento bacteriano, a mediana foi de 341.000 céls./ml, com valores mínimo e máximo de respectivamente 4.000 e 6.375.000 céls./ml, (Tabela 4).

Pelo método de *Mann Whitney*, não há diferença estatística ente as medianas das células de SCP e SCN. Para a comparação de *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. e *Corynebacterium* spp. utilizou-se o Teste de *Kruskal Wallis*, ANOVA não-paramétrica. Os *Streptococcus* spp. apresentaram contagem de células somáticas maior que os *Staphylococcus* spp. ($p < 0,001$), e estes maiores que os *Corynebacterium* spp. ($p < 0,001$).

Tabela 4 - Relação entre as Medianas, Números Mínimos e Máximos das Contagens de Células Somáticas (CCS), das estirpes de *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Corynebacterium* spp., e amostras negativas, isoladas de amostras de leite apresentando mastite subclínica - São Paulo - 2012

Relação das Amostras	N	CCS Mínimo (céls.)	CCS Mediana (céls.)	CCS Máximo (céls.)
<i>Staphylococcus</i> spp.	106	12.000	680.600	7.130.000
SCP	39	12.000	517.000	7.130.000
SCN	67	58.000	729.000	3.431.000
<i>Streptococcus</i> spp.	53	142.000	1.849.000	8.872.000
<i>Corynebacterium</i> spp.	32	58.000	298.000	942.000
Negativas	124	4.000	341.000	6.375.000

Quanto aos valores das medianas, mínimos e máximos das espécies de SCP e SCN relacionadas às CCS, tem-se as tabelas 5 e 6 respectivamente. Para *S. aureus*, a bactéria mais freqüentemente isolada dentre as bactérias do gênero *Staphylococcus*, obteve-se o resultado para mediana de 534.500 céls./ml, com valores mínimo e máximo de 12.000 e 7.130.000 céls./ml. Dentre as bactérias do grupo SCP, o *S. hyicus* apresentou o maior valor da mediana com 987.000 céls./ml, seguido por *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* com 666.000 céls./ml. Não há diferença estatística ente as espécies de *Staphylococcus* coagulase-positivos.

Tabela 5 - Valores da Mediana, Números Mínimos e Máximos da Contagem de Células Somáticas (CCS) das espécies de *Staphylococcus* coagulase-positivos de amostras leite apresentando mastite subclínica - São Paulo - 2012

SCP	N	Mínimo (céls)	Mediana (céls)	Máximo (céls)
<i>S aureus</i>	19	12.000	534.000	7.130.000
<i>S intermedius</i>	13	168.000	268.000	347.000
<i>S schleiferi</i> subsp <i>coagulans</i>	5	127.000	666.000	4.225.000
<i>S hyicus</i>	2	58.000	987.000	1.916.000

Com relação aos SCN o maior valor da mediana encontrado foi de *S. cohnii* subsp. *cohnii* com 1.560.000 céls./ml seguido por *S. warneri* com 994.500 céls./ml, *S. chromogenes* com 915.500 céls./ml e *S. capitis* subsp. *capitis* com 831.500 céls./ml. Não há diferença estatística ente as espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativos.

Tabela 6 - Valores da Mediana, Números Mínimos e Máximos da Contagem de Células Somáticas (CCS) das espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativos de amostras leite apresentando mastite subclínica - São Paulo - 2012

SCN	N	Mínimo (céls.)	Mediana (céls.)	Máximo (céls.)
<i>S chromogenes</i>	11	185.000	915.500	2.677.000
<i>S warneri</i>	10	94.000	994.500	2.639.000
<i>S cohnii</i> subsp <i>cohnii</i>	7	372.000	1.506.000	3.431.000
<i>S xylosus</i>	7	168.000	713.000	1.436.000
<i>S saprophyticus</i> subsp <i>saprophyticus</i>	7	445.000	761.500	1.623.000
<i>S capitis</i> subsp <i>capitis</i>	6	406.000	831.500	1.923.000
<i>S arlettae</i>	5	120.000	319.000	1.241.000
<i>S sciuri</i> subsp <i>sciuri</i>	5	58.000	479.000	881.000
<i>S haemolyticus</i>	3	342.000	748.000	1.075.000
<i>S epidermidis</i>	3	142.000	362.000	546.000
<i>S auricularis</i>	2	99.000	563.000	1.027.000
<i>S schleiferi</i> subsp <i>schleiferi</i>	1	124.000	124.000	124.000

5.3 AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE *IN VITRO* DAS ESTIRPES DE *STAPHYLOCOCCUS* SPP. ISOLADAS, FRENTE A DIFERENTES ANTIMICROBIANOS

Avaliou-se o perfil de sensibilidade e resistência das estirpes de *Staphylococcus* spp. isoladas frente a diferentes antimicrobianos e os resultados obtidos estão apresentados na tabela 7 e gráfico 2. Nenhuma das estirpes apresentou 100% de sensibilidade ou resistência aos antimicrobianos testados. O maior índice de sensibilidade encontrado foi para cefalexina com (95,3%), seguido por cefalotina e ceftiofur com (92,5% e 90,6%) respectivamente. Quanto à resistência, os maiores índices foram verificados para penicilina com (92,5%), seguidos por amoxicilina e ampicilina com (87,7% e 75,5%) respectivamente.

Os antimicrobianos cefalexina, cefalotina, ceftiofur, clindamicina, cloranfenicol, enrofloxacin, eritromicina, gentamicina, norfloxacin e sulfametoxazol + trimetoprim apresentaram frequência de sensibilidade maior do que os outros antimicrobianos, ($p < 0,03$). Com relação ao cefoperazone, apesar de apresentar sensibilidade baixa quando comparado aos outros antimicrobianos, ele apresenta também frequência de resistência baixa, devido ao percentual de resultados intermediários ser alta. Quanto à resistência, os antimicrobianos: amoxicilina, ampicilina, penicilina e oxacilina apresentaram os maiores índices, ($p < 0,03$). Analisando o perfil geral de sensibilidade para os *Staphylococcus* spp. obteve-se como frequência de sensibilidade 65,3%, sensibilidade intermediária 10,6% e resistência 24,1%.

Tabela 7 - Classificação (em número absoluto e porcentagem) das estirpes de *Staphylococcus* spp. isoladas de acordo com a susceptibilidade *in vitro* aos antimicrobianos testados, considerando o total de 106 amostras de leite de bovinos leiteiros localizados no sul de Minas Gerais - São Paulo - 2012

(continua)

Antimicrobiano	Sensível		Intermediário		Resistente	
	Número	%	Número	%	Número	%
Amoxicilina	10	9,4	3	2,8	93	87,7
Ampicilina	16	15,1	10	9,4	80	75,5
Cefalexina	101	95,3	3	2,8	2	1,9
Cefalotina	98	92,5	2	1,9	6	5,7
Cefoperazone	44	41,5	42	39,6	20	18,9
Ceftiofur	85	80,2	5	4,7	16	15,1

(conclusão)

Antimicrobiano	Sensível		Intermediário		Resistente	
	Número	%	Número	%	Número	%
Ceftiofur	96	90,6	4	3,8	6	5,7
Clindamicina	80	75,5	19	17,9	7	6,6
Cloranfenicol	90	84,9	11	10,4	5	4,7
Enrofloxacina	89	84,0	11	10,4	6	5,7
Eritromicina	83	78,3	14	13,2	9	8,5
Gentamicina	90	84,9	7	6,6	9	8,5
Neomicina	64	60,4	29	27,4	13	12,3
Norfloxacina	89	84,0	14	13,2	3	2,8
Oxacilina	47	44,3	2	1,9	57	53,8
Penicilina	6	5,7	2	1,9	98	92,5
Sulfametoxazol + Trimetoprim	93	87,7	7	6,6	6	5,7
Tetraciclina	65	61,3	18	17,0	23	21,7

Gráfico 2 - Resultado geral das estirpes de *Staphylococcus* spp. de acordo com a susceptibilidade *in vitro* aos antimicrobianos testados, considerando o total de 106 amostras de leite de bovinos leiteiros localizados no sul de Minas Gerais - São Paulo – 2012

Avaliou-se também o perfil de sensibilidade das estirpes de *Staphylococcus* coagulase-positivos assim como dos coagulase-negativos, e os resultados obtidos estão apresentados na tabelas 8 e 9, respectivamente. Para os SCP, os antimicrobianos que apresentaram maiores índices de sensibilidade foram cefalexina

(94,9%), cefoxitina e ceftiofur ambos com (89,7%), seguidos por cefalotina cloranfenicol e sulfametoxazol + trimetoprim em (84,6%). Em relação à resistência, a penicilina foi o antimicrobiano de maior índice, com (87,2%), seguido por amoxicilina (76,9%) e ampicilina (61,5%), (Tabela 8 e Gráfico 3).

As freqüências mais altas de sensibilidade foram verificadas para: cefalexina, cefalotina, cefoxitina, ceftiofur, clindamicina, cloranfenicol, enrofloxacin, eritromicina gentamicina, norfloxacin e sulfametoxazol+trimetoprim, ($p<0,0001$). Quanto à resistência os antimicrobianos que apresentaram maior freqüência foram amoxicilina, ampicilina, penicilina, oxacilina, ($p<0,001$). Com relação o perfil geral de sensibilidade para os *Staphylococcus* coagulase-positivos obteve-se como freqüência de sensibilidade, sensibilidade intermediária e resistência semelhante ao verificado para o perfil de *Staphylococcus* spp., com respectivamente 64,1%, 10,7% e 25,2%.

Tabela 8 - Classificação (em número absoluto e porcentagem) das estirpes de *Staphylococcus* coagulase-positivos isoladas de acordo com a susceptibilidade *in vitro* aos antimicrobianos testados, considerando o total de 39 amostras de leite de bovinos leiteiros localizados no sul de Minas Gerais - São Paulo – 2012

Antimicrobiano	Sensível		Intermediário		Resistente	
	Número	%	Número	%	Número	%
Amoxicilina	6	15,4	3	7,7	30	76,9
Ampicilina	10	25,6	5	12,8	24	61,5
Cefalexina	37	94,9	2	5,1	0	0,0
Cefalotina	33	84,6	1	2,6	5	12,8
Cefoperazone	13	33,3	15	38,5	11	28,2
Cefoxitina	35	89,7	2	5,1	2	5,1
Ceftiofur	35	89,7	1	2,6	3	7,7
Clindamicina	25	64,1	10	25,6	4	10,3
Cloranfenicol	33	84,6	1	2,6	5	12,8
Enrofloxacin	34	87,2	2	5,1	3	7,7
Eritromicina	29	74,4	5	12,8	5	12,8
Gentamicina	31	79,5	4	10,3	4	10,3
Neomicina	21	53,8	10	25,6	8	20,5
Norfloxacin	32	82,1	6	15,4	1	2,6
Oxacilina	17	43,6	1	2,6	21	53,8
Penicilina	5	12,8	0	0,0	34	87,2
Sulfametoxazol + Trimetoprim	33	84,6	3	7,7	3	7,7
Tetraciclina	21	53,8	4	10,3	14	35,9

Gráfico 3 - Resultado geral das estirpes de *Staphylococcus* coagulase-positivos de acordo com a susceptibilidade *in vitro* aos antimicrobianos testados, considerando o total de 39 amostras de leite de bovinos leiteiros localizados no sul de Minas Gerais - São Paulo – 2012

Em relação aos SCN, os antimicrobianos que apresentaram maior frequência de sensibilidade foram cefalotina (97,0%), seguido por cefalexina (95,5%), ceftiofur (91,0%) e sulfametoxazol + trimetoprim com (89,6%). Em relação à resistência obteve-se como resultado a penicilina (95,5%), amoxicilina (94%) e ampicilina (83,6%), (Tabela 9 e Gráfico 4). Estatisticamente, os antimicrobianos que apresentam frequência de sensibilidade mais baixa foram a amoxicilina, ampicilina, penicilina, oxacilina e cefoperazone e, portanto, frequência de resistência mais elevada, ($p < 0,001$). O perfil geral de sensibilidade para os *Staphylococcus* coagulase-negativos e de sensibilidade 66%, sensibilidade intermediária 10,6% e resistência 23,4%.

Tabela 9 - Classificação (em número absoluto e porcentagem) das estirpes de *Staphylococcus* coagulase-negativos isolados de acordo com a susceptibilidade *in vitro* aos antimicrobianos testados, considerando o total de 67 amostras de leite de bovinos leiteiros localizados no sul de Minas Gerais - São Paulo - 2012

Antimicrobiano	Sensível		Intermediário		Resistente	
	Número	%	Número	%	Número	%
Amoxicilina	4	6,0	0	0,0	63	94,0
Ampicilina	6	9,0	5	7,5	56	83,6
Cefalexina	64	95,5	1	1,5	2	3,0
Cefalotina	65	97,0	1	1,5	1	1,5
Cefoperazone	31	46,3	27	40,3	9	13,4
Cefoxitina	50	74,6	3	4,5	14	20,9
Ceftiofur	61	91,0	3	4,5	3	4,5
Clindamicina	55	82,1	9	13,4	3	4,5
Cloranfenicol	57	85,1	10	14,9	0	0,0
Enrofloxacina	55	82,1	9	13,4	3	4,5
Eritromicina	54	80,6	9	13,4	4	6,0
Gentamicina	59	88,1	3	4,5	5	7,5
Neomicina	43	64,2	19	28,4	5	7,5
Norfloxacina	57	85,1	8	11,9	2	3,0
Oxacilina	30	44,8	1	1,5	36	53,7
Penicilina	1	1,5	2	3,0	64	95,5
Sulfametoxazol + Trimetoprim	60	89,6	4	6,0	3	4,5
Tetraciclina	44	65,7	14	20,9	9	13,4

Gráfico 4 - Resultado geral das estirpes de *Staphylococcus* coagulase-negativos de acordo com a susceptibilidade *in vitro* aos antimicrobianos testados, considerando o total de 67 amostras de leite de bovinos leiteiros localizados no sul de Minas Gerais - São Paulo - 2012

Em relação aos *Staphylococcus aureus*, os antimicrobianos que apresentaram maior sensibilidade foram cefalexina (94,7%), seguido por cefoxitina e ceftiofur com (84,2%), cefalotina, cloranfenicol, enrofloxacina e sulfametoxazol + trimetoprim com (78,9%). Foram verificados índices de resistência para penicilina com (84,2%), amoxicilina e ampicilina com (57,9% e 47,4%) respectivamente, (Tabela 10 e Gráfico 5). Estatisticamente o percentual de sensibilidade mais baixo foi verificado para cefoperazone e penicilina ($p < 0,05$). Dentre os dezoito antimicrobianos testados, a penicilina apresentou o percentual de resistência mais elevada ($p < 0,004$). Quanto ao perfil geral de sensibilidade para os *Staphylococcus aureus* verificou-se 60,8% de sensibilidade, 14,1%, de sensibilidade intermediária 25,1% de resistência.

Tabela 10 - Classificação (em número absoluto e porcentagem) das estirpes de *Staphylococcus aureus* isolados de acordo com a suscetibilidade *in vitro* aos antimicrobianos testados, considerando o total de 19 amostras de leite de bovinos leiteiros localizados no sul de Minas Gerais - São Paulo – 2012

Antimicrobiano	Sensível		Intermediário		Resistente	
	Número	%	Número	%	Número	%
Amoxicilina	6	31,6	2	10,5	11	57,9
Ampicilina	8	42,1	2	10,5	9	47,4
Cefalexina	18	94,7	1	5,3	0	0,0
Cefalotina	15	78,9	1	5,3	3	15,8
Cefoperazone	5	26,3	7	36,8	7	36,8
Cefoxitina	16	84,2	1	5,3	2	10,5
Ceftiofur	16	84,2	0	0,0	3	15,8
Clindamicina	8	42,1	8	42,1	3	15,8
Cloranfenicol	15	78,9	1	5,3	3	15,8
Enrofloxacina	15	78,9	2	10,5	2	10,5
Eritromicina	14	73,7	4	21,1	1	5,3
Gentamicina	13	68,4	3	15,8	3	15,8
Neomicina	8	42,1	7	36,8	4	21,1
Norfloxacina	15	78,9	3	15,8	1	5,3
Oxacilina	8	42,1	1	5,3	10	52,6
Penicilina	3	15,8	0	0,0	16	84,2
Sulfametoxazol + Trimetoprim	15	78,9	2	10,5	2	10,5
Tetraciclina	10	52,6	3	15,8	6	31,6

Gráfico 5 - Resultado geral das estirpes de *Staphylococcus aureus* de acordo com a susceptibilidade *in vitro* aos antimicrobianos testados, considerando o total de 19 amostras de leite de bovinos leiteiros localizados no sul de Minas Gerais - São Paulo – 2012.

5.4 PESQUISA DE ADESINAS E BIOFILME EM ESTIRPES DE *STAPHYLOCOCCUS* SPP. POR MEIO DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

Em relação aos 106 isolados de *Staphylococcus* spp., (SCP ou SCN), os resultados obtidos para detecção de genes codificadores de adesinas e formador de biofilme foram: 17% (N=18) amostras positivas para o gene *cna*, 82,1 % (N=87) para o gene *eno*, 17,9% (N=19) para *ebp*, 5,7% (N=6) para *fnbB*, 71,7% (N=76) para *fib*, 56,6% (N=60) para *bap*, em nenhuma das amostras foi verificado a presença do gene *fnbA*, e em 11,3% das amostras (N=12) não foi verificada a presença de nenhum gene codificador de adesina ou formador de biofilme. A figura 3 exemplifica a amplificação de DNA.

Figura 3 - Eletroforese dos fragmentos de genes *fnbB* (524pb) e *fib* (404pb), de *Staphylococcus* spp isolados de amostras de leite, em gel de agarose a 1,5%. (1-7, 10-14= amostras testadas, M= marcador molecular, 9= controle positivo e 10= controle negativo)

Com relação à CCS, verifica-se os valores das Medianas, valores Mínimos e Máximos de todos os genes estudados em *Staphylococcus* spp., SCP, SCN e *S. aureus*, separadamente. Analisando os *Staphylococcus* spp., os maiores valores das Medianas encontrados foram para os genes *bap* e *fib*, com 780.500 e 738.000 céls./ml, seguidos por *ebp* e *eno* com 695.000 e 690.000 céls./ml respectivamente. Para SCP verificaram-se os seguintes valores de mediana: para os genes *fnbB* 1.430.000 céls./ml, *ebp* 1.027.000 céls./ml, *fib* 673.000 céls./ml e *eno* 608.500 céls./ml. Para os SCN obteve-se o mesmo valor das Medianas para os genes *bap* e *fib* 835.000 céls./ml seguidos por *eno* com 748.000 céls./ml e *ebp* com 681.500 céls./ml. Com relação à análise estatística, a frequência dos genes *eno* e *fib*, verificados em *Staphylococcus* spp. foi estatisticamente significativa ($p < 0,0001$), enquanto *ebp* foi maior nos SCP ($p < 0,0004$), (Tabela 11).

Tabela 11 - Valores das Medianas, Números Mínimos e Máximos das CCS de cada gene codificador de adesina e produtor de biofilme (*cna*, *eno*, *ebp*, *fnbB*, *fib*, *bap*) e de isolados que não apresentaram nenhum dos genes estudados em *Staphylococcus* spp., SCP e SCN - São Paulo - 2012

(continua)

Genes Codificadores de Adesinas e Biofilme	<i>Staphylococcus</i> spp., SCP, SCN e <i>S. aureus</i>	N	%	Valor Mínimo (céls.)	Valor da Mediana (céls.)	Valor Máximo (céls.)
<i>cna</i>	<i>Staphylococcus</i> spp.	18	17,0	58.000	440.500	1.743.000
	SCP	9	23,1	75.000	402.000	747.000
	<i>S. aureus</i>	9	47,4	75.000	402.000	747.000
	SCN	9	13,4	58.000	479.000	1.743.000

(conclusão)

Genes Codificadores de Adesinas e Biofilme	<i>Staphylococcus</i> spp., SCP, SCN e <i>S. aureus</i>	N	%	Valor Mínimo (cél.s.)	Valor da Mediana (cél.s.)	Valor Máximo (cél.s.)
<i>eno</i>	<i>Staphylococcus</i> spp.	87	82,1	58.000	690.000	7.130.000
	SCP	33	84,6	75.000	608.500	7.130.000
	<i>S. aureus</i>	16	84,2	75.000	534.000	7.130.000
	SCN	54	80,6	58.000	748.000	3.431.000
<i>ebp</i>	<i>Staphylococcus</i> spp.	19	17,9	75.000	695.000	4.855.000
	SCP	14	35,9	601.000	1.027.000	2.677.000
	<i>S. aureus</i>	10	52,6	75.000	580.500	1.570.000
	SCN	5	7,5	75.000	681.500	4.855.000
<i>fnbB</i>	<i>Staphylococcus</i> spp.	6	5,7	106.000	337.500	2.639.000
	SCP	4	10,3	221.000	1.430.000	2.639.000
	<i>S. aureus</i>	3	15,8	106.000	328.000	517.000
	SCN	2	3,0	106.000	337.500	517.000
<i>fib</i>	<i>Staphylococcus</i> spp.	76	71,7	94.000	738.000	7.130.000
	SCP	29	74,4	106.000	673.000	7.130.000
	<i>S. aureus</i>	13	68,4	106.000	673.000	7.130.000
	SCN	47	70,1	94.000	835.000	3.431.000
<i>bap</i>	<i>Staphylococcus</i> spp.	60	56,6	94.000	780.500	7.130.000
	SCP	15	38,5	127.000	551.000	7.130.000
	<i>S. aureus</i>	3	15,8	551.000	1.194.000	7.130.000
	SCN	45	67,2	94.000	835.000	3.431.000
negativos	<i>Staphylococcus</i> spp.	12	11,3	12.000	180.000	1.916.000
	SCP	6	15,4	12.000	149.500	1.916.000
	SCN	6	9,0	99.000	252.000	881.000

Na próxima tabela, verificamos o resultado geral (número absoluto) em relação às combinações dos genes codificadores de adesinas e formador de biofilme em *Staphylococcus* spp., SCP, SCN e *S. aureus*. Não há diferença estatisticamente significativa entre SCP, SCN e *S. aureus*. A frequência dos genes “*eno/fib/bap*” associados, é maior que todas as outras combinações ($p < 0,0001$), (Tabela 12).

Tabela 12 - Resultado geral do número absoluto de amostras em relação aos genes codificadores de adesinas e formador de biofilme (*cna*, *eno*, *ebp*, *fnbB*, *fib*, *bap*) de SCP, SCN *Staphylococcus* spp. e *S. aureus* isolados de amostras de leite apresentando mastite subclínica. - São Paulo - 2012

Fatores de virulência codificadores de adesinas	SCP (N)	SCN (N)	<i>Staphylococcus</i> spp. (N)	<i>S. aureus</i> (N)
<i>cna</i>	0	1	1	0
<i>cna/eno</i>	0	3	3	0
<i>cna/eno/ebp</i>	3	0	3	3
<i>cna/eno/ebp/fib</i>	3	0	3	3
<i>cna/eno/ebp/fib/bap</i>	0	0	0	0
<i>cna/eno/fnbb/fib</i>	3	0	3	0
<i>cna/eno/fib</i>	0	1	1	0
<i>cna/eno/fib/bap</i>	0	3	3	0
<i>cna/fib/bap</i>	0	1	1	0
<i>eno</i>	1	6	7	0
<i>eno/ebp</i>	0	1	1	0
<i>eno/ebp/fnbb/fib/bap</i>	1	1	2	0
<i>eno/ebp/fib</i>	7	1	8	4
<i>eno/ebp/fib/bap</i>	0	1	1	0
<i>eno/fib</i>	1	1	2	0
<i>eno, fib, bap</i>	14	35	49	3
<i>eno/bap</i>	0	1	1	0
<i>ebp</i>	0	1	1	0
<i>fnbb/fib</i>	0	1	1	0
<i>fib/bap</i>	0	2	2	0
<i>bap</i>	0	1	1	0
nenhum	6	6	12	3

Os valores das medianas, mínimos e máximos, para *Staphylococcus* spp. SCP, SCN, e *S. aureus*, que apresentaram a associação “*eno/fib/bap*”, estão reportados na tabela 13, e para as demais combinações de genes tabela 14. Estatisticamente a mediana da contagem de células das amostras de *Staphylococcus* spp. que apresentaram “*eno/fib/bap*” foi de 813.000 céls./ml com mínimo de 94.000 e máximo de 7.130.000 céls./ml; enquanto que a mediana dos *Staphylococcus* spp. que apresentaram os demais genes foi de 466.000 céls./ml, com mínimo de 12.000 e máximo de 4.855.000 céls./ml, ($p < 0,03$).

Tabela 13 - Resultado da combinação dos genes “*eno/fib/bap*” (N=49), número absoluto, valores das medianas, mínimos e máximos em *Staphylococcus* spp., SCP, SCN e *S. aureus* - São Paulo – 2012

Genes <i>ebp</i> , <i>fib</i> e <i>bap</i>	N	Mínimo (céls.)	Mediana (céls.)	Máximo (céls.)
<i>Staphylococcus</i> spp.	49	94.000	813.000	7.130.000
SCP	35	127.000	608.500	7.130.000
SCN	14	94.000	89.000	3.431.000
<i>S. aureus</i>	3	551000	1194000	7.130.000

Tabela 14 - Resultado da combinação dos demais genes (N=57), número absoluto, valores das medianas, mínimos e máximos em *Staphylococcus* spp., SCP, SCN e *S. aureus* - São Paulo – 2012

Demais genes	N	Mínimo (céls.)	Mediana (céls.)	Máximo (céls.)
<i>Staphylococcus</i> spp.	57	12.000	466.000	4.855.000
SCP	25	12.000	488.000	4.855.000
SCN	32	58.000	422.500	2.677.000
<i>S. aureus</i>	16	12.000	445.000	1.570.000

5.4.1 Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos para associação de “*eno/fib/bap*”, a relação com o perfil geral e demais genes estudados.

Na tabela 15 e gráfico 6 temos o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos testados das 49 amostras positivas para a associação dos genes “*eno/fib/bap*”. Os antimicrobianos que apresentaram maior frequência de sensibilidade foram cefalexina e cefalotina com (95,9%), seguido por ceftiofur com (93,9%) e sulfametoxazol + trimetoprim (89,8%). Em relação à resistência apresentaram-se com maiores índices a penicilina e amoxicilina com (98%), e ampicilina com (91,8%). Os antimicrobianos que apresentaram maior percentual de sensibilidade com ($p < 0,05$) foram cefalexina, cefalotina, ceftiofur, clindamicina, cloranfenicol, enrofloxacin, gentamicina, norfloxacin, sulfametoxazol + trimetoprim.

A tabela 16 e o gráfico 7 reportam o perfil de susceptibilidade dos antimicrobianos estudados frente às amostras positivas para as demais combinações de genes que não “*eno/fib/bap*”.

Tabela 15 – Classificação (em número absoluto e porcentagem) das estirpes de *Staphylococcus* spp. isoladas de acordo com a susceptibilidade *in vitro* aos antimicrobianos testados, considerando o total de 49 amostras positivas para a combinação dos genes “*eno/fib/bap*”. - São Paulo - 2012

Antimicrobiano	Sensível		Intermediário		Resistente	
	Número	%	Número	%	Número	%
Amoxicilina	1	2,0	0	0,0	48	98,0
Ampicilina	1	2,0	3	6,1	45	91,8
Cefalexina	47	95,9	1	2,0	1	2,0
Cefalotina	47	95,9	1	2,0	1	2,0
Cefoperazone	19	38,8	21	42,9	9	18,4
Cefoxitina	33	67,3	4	8,2	12	24,5
Ceftiofur	46	93,9	1	2,0	2	4,1
Clindamicina	42	85,7	7	14,3	0	0,0
Cloranfenicol	38	77,6	9	18,4	2	4,1
Enrofloxacina	39	79,6	7	14,3	3	6,1
Eritromicina	37	75,5	7	14,3	5	10,2
Gentamicina	41	83,7	2	4,1	6	12,2
Neomicina	24	49,0	18	36,7	7	14,3
Norfloxacina	40	81,6	8	16,3	1	2,0
Oxacilina	28	57,1	0	0,0	21	42,9
Penicilina	0	0,0	1	2,0	48	98,0
Sulfametoxazol + Trimetoprim	44	89,8	4	8,2	1	2,0
Tetraciclina	24	49,0	13	26,5	12	24,5

Gráfico 6 - Resultado geral das estirpes de *Staphylococcus* spp. de acordo com a susceptibilidade *in vitro* aos antimicrobianos testados, considerando o total de 49 isolados positivos para a combinação dos genes “*eno/fib/bap*”, em amostras de leite de bovinos leiteiros localizados no sul de Minas Gerais - São Paulo – 2012

Tabela 16 – Classificação (em número absoluto e porcentagem) das estirpes de *Staphylococcus* spp. isoladas de acordo com a susceptibilidade *in vitro* aos antimicrobianos testados, considerando as amostras positivas para demais combinações de genes (N=57) - São Paulo – 2012

Antimicrobiano	Sensível		Intermediário		Resistente	
	Número	%	Número	%	Número	%
Amoxicilina	9	15,8	3	5,3	45	78,9
Ampicilina	15	26,3	7	12,3	35	61,4
Cefalexina	54	94,7	2	3,5	1	1,8
Cefalotina	51	89,5	1	1,8	5	8,8
Cefoperazone	25	43,9	21	36,8	11	19,3
Cefoxitina	52	91,2	1	1,8	4	7,0
Ceftiofur	50	87,7	3	5,3	4	7,0
Clindamicina	38	66,7	12	21,1	7	12,3
Cloranfenicol	52	91,2	2	3,5	3	5,3
Enrofloxacina	50	87,7	4	7,0	3	5,3
Eritromicina	46	80,7	7	12,3	4	7,0
Gentamicina	49	86,0	5	8,8	3	5,3
Neomicina	40	70,2	11	19,3	6	10,5
Norfloxacina	49	86,0	6	10,5	2	3,5
Oxacilina	19	33,3	2	3,5	36	63,2
Penicilina	6	10,5	1	1,8	50	87,7
Sulfametoxazol + Trimetoprim	49	86,0	3	5,3	5	8,8
Tetraciclina	41	71,9	5	8,8	11	19,3

Gráfico 7 - Resultado geral das estirpes de *Staphylococcus* spp. de acordo com a susceptibilidade *in vitro* aos antimicrobianos testados, considerando o total de 57 isolados positivos para as demais combinações de genes em amostras de leite de bovinos leiteiros localizados no sul de Minas Gerais - São Paulo – 2012

Correlacionando as tabelas 15 e 16 observa-se que o percentual de amostras resistentes a amoxicilina, ampicilina, cefalexina e penicilina, das amostras que apresentaram “*eno/fib/bap*” é maior dos que as demais combinações de genes, ($p < 0,05$). O antimicrobiano cefoperazone não possui diferença estatística entre “*eno/fib/bap*” e demais agentes para sensibilidade ou resistência.

Sobre o percentual de amostras positivas para associação de genes “*eno/fib/bap*” que apresentaram menor percentual de sensibilidade que as demais combinações de genes obteve-se: cefoxitina (67,3% - 91,2%) com ($p < 0,01$), neomicina (49% - 70,2%) com ($p < 0,02$), tetraciclina (49% - 71,9%) com ($p < 0,001$) e cloranfenicol (77,6% - 91,2%) não apresentou diferença estatisticamente significativa; além dos antimicrobianos já apresentados como amoxicilina (2% - 15,8%) com ($p < 0,01$), ampicilina (2% - 26,3%) com ($p < 0,003$).

5.5 COMPARAÇÃO ENTRE AMOSTRAS DOS QUARTOS MAMÁRIOS E TANQUES DE REFRIGERAÇÃO

Comparando as análises dos tanques de refrigeração com as amostras dos tetos correspondentes a 1ª, 2ª, 3ª e 5ª coleta, percebe-se que as amostras de tanque não são suficientes para rastrear a qualidade do leite do rebanho. Analisando as amostras referentes aos tanques, em algumas foram isolados mais de um micro-organismo, mesmo assim, nem todos os isolados das amostras dos tetos foram verificados em amostras de tanques.

O quadro 2 reporta quais foram as bactérias isoladas de tetos e amostras de tanques referentes às quatro coletas. Na primeira delas foram isolados do tanque: *S. arlettae*, *S. cohnii* subsp. *cohnii*, *S. aureus* e *S. haemolyticus*. Quanto às amostras isoladas dos tetos, foram verificadas estirpes de *S. chromogenes*, *S. epidermidis*, *S. capitis* subsp. *capitis*, *S. schleiferi* subsp. *schleiferi*, *S. xyloso*, *S. aureus* e *S. saproprhyticus* subsp. *saproprhyticus*. Na segunda coleta isolou-se do tanque *S. intermedius*, também verificado nas amostras dos tetos, acrescido de *S. capitis* subsp. *capitis* e *S. aureus*. Na terceira coleta foram identificados *S. aureus* e *S. chromogenes*, ambas as bactérias também isoladas nas amostras dos tetos, assim como *S. capitis* subsp. *capitis*, *S. cohnii* subsp. *cohnii*, *S. warneri*, *S. epidermidis*, *S.*

xylosus, *S. arlettae*, *S. haemolyticus*, *S. hyicus* e *S. schleiferi* subsp. *coagulans*. Na quinta e última coleta, isolou-se da amostra do tanque a bactéria *S. sciuri* subsp. *sciuri*, também encontrada em amostras de tetos, assim como *S. capitis* subsp. *capitis*, *S. chromogenes*, *S. auricularis*, *S. haemolyticus*, *S. arlettae* e *S. intermedius*. Na quarta análise não houve coleta do tanque de refrigeração, pois a propriedade não possuía esse recurso.

Quadro 2 – Comparação entre as amostras de tetos e tanques de refrigeração das estirpes de *Staphylococcus* spp. isoladas de amostras de leite apresentando mastite subclínica - São Paulo - 2012

1° coleta	Bactérias isoladas de Tanque	<i>S. aureus</i> , <i>S. arlettae</i> , <i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i> e <i>S. haemolyticus</i>			
	Bactérias isoladas dos tetos	<i>S. aureus</i>	<i>S. xylosus</i>	<i>S. chromogenes</i>	<i>S. epidermidis</i>
		<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i>	<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i>	
2° coleta	Bactérias isoladas de Tanque	<i>S. intermedius</i>			
	Bactérias isoladas dos tetos	<i>S. intermedius</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	
3° coleta	Bactérias isoladas de Tanque	<i>S. aureus</i>		<i>S. chromogenes</i>	
	Bactérias isoladas dos tetos	<i>S. aureus</i>	<i>S. arlettae</i>	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	<i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i>
		<i>S. epidermidis</i>	<i>S. xylosus</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. chromogenes</i>
		<i>S. hyicus</i>	<i>S. warneri</i>	<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i>	
5° coleta	Bactérias isoladas de Tanque	<i>S. sciuri</i> subsp. <i>sciuri</i>			
	Bactérias isoladas dos tetos	<i>S. sciuri</i> subsp. <i>sciuri</i>	<i>S. arlettae</i>	<i>S. chromogenes</i>	<i>S. intermedius</i>
		<i>S. auricularis</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	

Na tabela 16 verifica-se as estirpes de *Staphylococcus* spp. isoladas de tetos, tanques e associação de bactérias encontradas em tetos e tanques, referente às quatro coletas.

Tabela 17 – Comparação entre as estirpes *Staphylococcus* spp. isoladas de tetos e tanques de refrigeração (número absoluto) de amostras de leite apresentando mastite subclínica - São Paulo - 2012

Coletas	Bactérias comuns aos tetos e tanque	Bactérias encontradas somente do tanque	Bactérias encontradas somente dos tetos	Total de bactérias isoladas
1° coleta	1	3	6	10
2° coleta	1	0	2	3
3° coleta	2	0	9	11
4° coleta	1	0	6	7
Total	5	3	23	31

O percentual de micro-organismos isolados dos tetos das vacas é maior do que os isolados nos tanques de refrigeração, estatisticamente significante ($p < 0,01$).

6 DISCUSSÃO

6.1 FREQUÊNCIA DE OCORRÊNCIA DOS PATÓGENOS

A mastite bovina é uma doença multifatorial responsável por sérias perdas econômicas em fazendas leiteiras ao redor do mundo e continua sendo uma das mais importantes doenças em bovinos leiteiros apesar dos progressos realizados na melhoria da saúde do úbere, Melchior et al. (2006). Uma das principais causas de mastite em vacas leiteiras é a infecção por bactérias, com capacidade de invadirem o epitélio mamário, sendo importantes para a patogenia do mecanismo do estabelecimento da doença, conforme López et al. (2006).

Os resultados do presente estudo foram baseados em amostras de mastite subclínica, coletadas em cinco diferentes rebanhos de bovinos leiteiros, no sul do estado de Minas Gerais durante o período de dezoito meses. Do total de 313 amostras analisadas, 60,4% (N=189) apresentaram crescimento bacteriano, sendo as demais 39,6% (N=124) negativas para a presença dos mesmos, ($p < 0,0001$). Resultado semelhante foi encontrado por Oliveira et al. (2009) em bovinos leiteiros no estado de Sergipe, com 60,8% (N=893) de amostras positivas para o crescimento bacteriano. Em um estudo similar, Freitas et al. (2005) encontraram no agreste de Pernambuco, a frequência de 59,3% (N= 984) e recentemente, Beuron (2012) encontrou 70,1% (N=1069) na região de Pirassununga no estado de São Paulo.

Dentre as amostras em que houve crescimento bacteriano, isolou-se principalmente *Staphylococcus* spp. 30,6% (N=96), em seguida *Streptococcus* spp. 17% (N=53) e *Corynebacterium* spp. 10,2% (N=32). Houve também o crescimento de colônias mistas sendo 0,6% (N=2) associação de SCP e SCN, e as outras 1,9% (N=6) SCN e *Streptococcus* spp. A frequência de *Staphylococcus* spp. foi maior que a de *Streptococcus* spp. e *Corynebacterium* spp. ($p < 0,001$). Tais resultados se assemelham aos encontrados por Mendonça et al. (1999) e Brito et al. (1999), que descrevem o gênero *Staphylococcus* como o principal patógeno isolado de mastite bovina, seguido por *Streptococcus* spp. e *Corynebacterium* spp. Costa et al. (1995) relatam o aparecimento de bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. como o principal patógeno isolado (34,1%), Freitas et al. (2007) em Teresina – Piauí, assim como Beuron (2012) em Pirassununga - São Paulo, relatam prevalência mais alta,

de respectivamente 74,6% e 62,3%. Quanto aos *Streptococcus* spp. Beuron (2012) e Souza et al. (2009) encontraram resultado semelhante, respectivamente com 17,4% e 13,4% das amostras coletadas positivas para este patógeno. Para o terceiro patógeno mais isolado, *Corynebacterium* spp., Beuron (2012) encontrou 10,9%. Barbalho e Mota (2001) encontraram frequência relativamente alta, com 27,91%, assim como Sousa et al. (2009) em 30,2% das amostras e Brito et al. (1999) em 55,2%. A alta frequência de *Corynebacterium* spp, assim como dos SCN, conforme Pitkälä et al. (2004), mostram uma redução na prevalência dos principais patógenos como *Streptococcus agalactiae*, *S. aureus*, entre outros, ao longo dos anos em rebanhos na Finlândia, mesmo sendo considerados patógenos secundários, de menor patogenicidade por alguns estudiosos (MYLLYS et al., 1998).

Neste estudo foram isoladas 36,8% (N=39) estirpes de SCP. Santos (2008) em um estudo realizado com bovinos leiteiros, também no sul de Minas Gerais, encontrou percentual semelhante com (34,3%), e Santos e Fonseca (2006) descreveu resultado um pouco acima do encontrado no presente estudo, com 39,1% em amostras de mastite subclínica. Em contrapartida Freitas et al. (2005) assim como Beuron (2012), relatam baixo percentual de isolamento para bactérias do grupo SCP, com respectivamente 1,5% e 6%.

Conforme Aldeida (2009), para amostras de SCP a detecção da coagulase é suficiente para identificação e distinção de *S. aureus* dos SCN. Mas erroneamente, o procedimento fenotípico muitas vezes é o que diferencia os *S. aureus* dos demais SCP, pela coloração amarelo-ouro que os *S. aureus* possuem. Para amostras veterinárias é de suma importância evitar falsas identificações, uma vez que as outras espécies como *S. hyicus*, *S. intermedius* e *S. schleiferi* também podem ser isoladas.

Com relação as 106 amostras de *Staphylococcus* spp., dentre os SCP isolados, os *S. aureus* foram os mais verificadas apresentando 17,9% (N=19), *S. intermedius* em 12,2% (N=13), *S. schleiferi* subsp. *coagulans* em 4,7% (N=5), *S. hyicus* em 2,0% (N=2). Resultados acima do encontrado no presente foram relatados por Santos (2006) com 32,9% de amostras positivas para *S. aureus*, para *S. intermedius* o percentual se apresentou abaixo do encontrado neste estudo, com 9,7% e para *S. hyicus* acima do encontrado, com 4,9%. De acordo com Brito et al. (2002), o percentual de isolamento de *S. intermedius* assim como de *S. hyicus* é pouco discutido na etiologia das mastites, pois são espécies encontradas em cães e suínos, e o contato íntimo com esses animais pode ter favorecido a infecção. Beuron

(2012) relatou a prevalência de *S. aureus* em 27,8%, valor também acima do encontrado no presente estudo. Tal diminuição da prevalência de *S. aureus*, demonstrada no presente estudo, talvez ocorra devido a redução no percentual de isolamentos de bactérias contagiosas, permitindo que bactérias consideradas secundárias e oportunistas tornem-se mais prevalentes, como é o caso dos SCN (MYLLYS et al., 1998; PITKÄLÄ et al., 2004).

Segundo Brito et al. (2002) assim como Freitas et al. (2005), os *Staphylococcus* spp. são os agentes etiológicos mais isolados das mastites, sendo os *Staphylococcus aureus* a espécie mais prevalente em bovinos leiteiros (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), os *Staphylococcus* coagulase-negativos têm recebido maior importância como agentes causadores de infecções intramamárias em bovinos leiteiros de todo o mundo.

Em relação aos *Staphylococcus* coagulase-negativo. Zhang e Maddox (2000) relatam que as bactérias pertencentes a esse grupo são consideradas minoria dos patógenos causadores de mastite bovina, assim como López et al. (2006), que ainda acrescentam baixo potencial de virulência associado à esses patógenos. A proporção dos casos de mastite relacionados à SCN aumentou e recentemente muitos estudos têm mostrado a importância das infecções por estes agentes na glândula mamária que usualmente causam infecções mais leves quando comparadas aos *S. aureus*. Tenhagen et al. (2006) assim como Santos (2008) reportam este grupo de bactérias como emergentes devido ao fato de infecções por *S. aureus* e *S. agalactiae* estarem controladas.

A frequência de SCN encontrada em amostras de leite no presente estudo se apresentou maior que a de SCP ($p < 0,02$), com percentual 63,2% ($N=67$). Resultado semelhante fora verificado por Motta et al. (2012) que encontraram 58,4% de SCN no estado de Pernambuco, Pitkälä et al. (2004) em 49,6% das amostras de leite bovino. Tenhagen et al. (2006), em um estudo realizado na Alemanha com 35% dos quartos mamários apresentando mastite subclínica, e na Finlândia 50%. (DINGWELL et al., 2004). Santos (2008) relatou a participação de casos de SCN em mastite subclínica em 96,6%. Recentemente outros pesquisadores isolaram este grupo de bactéria, mas em menor proporção, como Bal et al. (2010) com taxa de isolamento de 31,2%. Beuron (2012) 28,7%, e em um estudo similar na Noruega, a prevalência foi de 16% (PITKÄLÄ et al., 2004).

Dentre as espécies de SCN, Taponem e Pyörälä (2009) descrevem que as mais comumente reportadas são os *S. chromogenes* e *S. simulans*, mas também pode ser isolados *S. epidermidis*, assim como outras espécies. Supré et al. (2010) encontraram principalmente *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus cohnii* e *Staphylococcus simulans* como os mais prevalentes em casos de mastite subclínica.

Verificou-se o crescimento de doze estirpes de SCN, sendo: *S. chromogenes* em 16,5% (N=11), *S. warneri* em 15,0% (N=10), *S. cohnii* subsp. *cohnii*, *S. saprophyticus* subsp. *saprophyticus* e *S. xylosus* em 10,5% (N=7), *S. capitis* subsp. *capitis* em 8,9% (N=6), *S. arlettae* e *S. sciuri* subsp. *sciuri* em 7,4% (N=5), *S. haemolyticus* e *S. epidermidis* 4,4% (N=3), *S. auricularis* em 3,0% (N=2) e *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* em 1,5% (N=1), não havendo diferença estatística entre as espécies. Resultados semelhantes aos encontrado por Taponem et al. (2007), que relatou a presença de *S. chromogenes* como o mais frequentemente encontrado, seguido por *S. haemolyticus* e *S. epidermidis*.

Santos (2008) ao identificar amostras de mastite em rebanhos bovinos da bacia leiteira de MG descreveu a presença de 116 amostras de SCN obtidas de casos de mastite subclínica, sendo *S. chromogenes* a espécies mais isolada, em 12,5% (N=15), *S. epidermidis* 10,8% (N=13), *S. haemolyticus* 5,8% (N=7), *S. sciuri* em 2,5% (N=3), e outras espécies não encontradas neste estudo, como *S. galinarum* e *S. lentus*, além de amostras em que não foi possível a identificação das espécies sendo caracterizadas por *Staphylococcus* spp 14,3% (N=17).

Recentemente há vários estudos mostrando a alta prevalência de SCN em infecções intramamárias, variando de 8,5% a 54,3% (MOTA et al., 1999; FREITAS et al., 2005; RIBEIRO et al., 2007). Ainda com relação aos percentuais encontrados neste estudo, Ribeiro et al. (2007) isolaram 14,8% de *S. epidermidis* semelhante aos 15% encontrado por Beloti et al. (1997), e quanto aos *S. chromogenes* isolaram 15%, enquanto Brabes et al. (1999) isolaram em 11,8% das amostras, para *S. sciuri* (9,45%) frequência acima do encontrado neste estudo, e para *S. xylosus* (4,72%) e *S. warneri* (2,36%). Beloti et al. (1997) por sua vez, encontraram 5% de *S. warneri*, 0,79% de *S. epidermidis*; valores abaixo do relatado no presente estudo.

De Vlieghe et al. (2005) estudaram a ação *in vitro* de *S. chromogenes*, e perceberam que esta bactéria inibiu o crescimento de *S. aureus* e *Streptococcus* spp., o que levou a hipótese de existência de substâncias inibidoras produzidas por *S. chromogenes*, explicando por exemplo, a elevada frequência desse grupo de

bactéria (SCN), quando comparadas aos *S. aureus*. Tal fato expõe a necessidade de mais estudos a respeito do assunto.

6.2 ANÁLISE DAS MEDIANAS DAS CCS

A mastite subclínica predomina em 90% dos casos, e representa de 70-80% dos custos causados pela infecção (TIMMS; SHULTZ, 1984). Por estes motivos, o teste da canela telada, bem como o CMT são constantemente utilizados para detecção de casos clínicos e subclínicos respectivamente. Outro método bastante empregado para verificação da saúde da glândula mamária é a contagem de células somáticas (CCS).

Taponem et al. (2007) descreve que a infecção por micro-organismos induz uma reação imunológica no úbere com elevação na CCS, que não deve ser considerada como meramente colonização do canal do teto, ou situação normal do úbere. Alguns autores sugerem que as infecções por patógenos menos preocupantes como *S. chromogenes*, outros SCN, ou *Corynebacterium* spp., podem trazer benefícios ao animal, uma vez que colonizarão o canal do teto, diminuindo a chance de se infectar por patógenos como *S. aureus* (SCHUKKEN et al., 1989; MATTHEWS et al., 1990). Esse possível efeito protetor é somente teórico, e as infecções devem ser tratadas como quaisquer infecções intramamárias.

Conforme Barkema et al. (1999), a CCS é um indicador de mastite subclínica. O aumento da mesma gera a má qualidade do leite seguida por penalidades relacionadas ao pagamento por qualidade. A CCS do leite normal, originado de animais sadios é geralmente menor que 280.000 céls./ml. Em geral, o aumento de mais de 100.000 céls./ml é associada à redução na produção leiteira.

No presente estudo, o valor da mediana das CCS de *Streptococcus* spp. foi maior que o de *Staphylococcus* spp. ($p < 0,001$), assim como dos *Corynebacterium* spp. ($p < 0,001$), semelhante ao encontrado por Vianna et al. (2002), com diferença significativa ($p < 0,01$). A maior mediana encontrada foi a de *Streptococcus* spp. (1.849.000 céls./ml), seguida por SCN (729.000 céls./ml), *Staphylococcus* spp. (680.500 céls./ml), SCP (517.000 céls./ml), *Corynebacterium* spp. (298.000 céls./ml), e por fim amostras sem crescimento bacteriano (341.000 céls./ml). A mediana das CCS das amostras em que foram isoladas *Corynebacterium* spp. foram mais

elevadas que as amostras sem crescimento bacteriano. Este fato ocorreu provavelmente devido às coletas terem sido realizadas de quartos mamários positivos ao teste de CMT, indicando a presença de um processo inflamatório existente.

Comparando os achados deste estudo aos de Vianna et al. (2002) e Beloti et al. (1997), verificou-se respectivamente que a média de CCS para *Streptococcus* spp. foi de (716.000 e 2.900.000 céls./ml), SCP (1.023.000 e 2.500.000 céls./ml), SCN (415.000 e 1.200.000 céls./ml), *Corynebacterium* spp. (348.000 e 979.000 céls./ml) e amostras de quartos sem crescimento bacteriano (79.000 céls./ml).

A baixa média de *Streptococcus* spp. encontrada por Vianna et al. (2002) não corrobora com os achados deste estudo, mas sim com o de Beloti et al. (1997) e o de Ward e Schultz (1972). Quanto à média de *Corynebacterium* spp., se aproximou do valor encontrado por Vianna et al. (2002). Taponem et al. (2007) ao reportarem sobre a CCS dos quartos infectados por SCN, relataram que são de 2-3 vezes mais altas que amostras negativas, devido a infiltração de leucócitos; e citaram a mediana dos quartos infectados por SCN (355.400 céls./ml), valor abaixo do encontrado no presente estudo com 729.000 céls./ml.

De acordo com Taponem et al. (2007), o resultado encontrado para mediana de SCN foi mais baixo que do que para infecções causadas por SCP ou *Streptococcus* spp., diferente do encontrado no presente estudo, já que as amostras de SCP apresentaram mediana menor que SCN. Com relação às médias das CCS, de acordo com o descrito por Beloti et al. (1997), patógenos como *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. apresentam elevadas contagens. Mas os relatos de (LILIUS; PESONEM, 1990; TORGERSON et al., 1992), assim como de outros autores são divergentes, devido a vários fatores influenciarem na contagem de células, como o agente etiológico, frequência de infecções, quantidade e estágio de lactação - fisiologicamente elevada no período pós-parto, motivo pelo qual as coletas foram realizadas após dois meses de parição e pelo menos um mês antes do período de secagem.

No Tennessee – EUA, a proporção de infecções por SCN em rebanhos de alta CCS foi de 28% (ROBERSON et al., 2006), enquanto em rebanhos holandeses foram verificados 6% (POELAREND; HOGVEEN; SAMPIMOM, 2001). De acordo com Prestes e Landim-Alvarenga (2006), a CCS em amostras de leite contaminadas por SCN se encontram próximas a 1.000.000 céls./ml e a presença desses agentes

é maior em propriedade que reduziram o número de infecções causadas por outros patógenos.

A CCS de quartos mamários sem infecção, normalmente apresentam contagem de células abaixo de 50.000 céls./ml, conforme mencionado por Barkema et al. (1999), concordando com Taponem et al. (2007) que relataram valores entre 10.000 - 40.000 céls./ml, muito abaixo do relatado no presente estudo (341.000 céls./ml). Vale notar que somente a baixa celularidade não é suficiente para assegurar a boa qualidade do leite. O isolamento de patógenos, a adoção de medidas profiláticas, bem como a descoberta de que fatores de virulência possam se aderir a glândula mamária e levar a persistência da infecção são necessários.

6.3 AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE *IN VITRO* DAS ESTIRPES DE *STAPHYLOCOCCUS* SPP. ISOLADAS FRENTE A DIFERENTES ANTIMICROBIANOS

Andrews et al. (2008) assim como Oliver et al. (2011) relatam que as primeiras substâncias antimicrobianas surgiram em 1930, e nas décadas subseqüentes os antimicrobianos disponíveis até os tempos atuais. Desde 1940 os agentes antimicrobianos são empregados para o tratamento da mastite. Sua utilização auxilia na defesa do hospedeiro, elimina os agentes patogênicos e reduz a fisiopatologia da infecção. Além de curar casos clínicos, é utilizado como estratégia para o controle e prevenção da doença, principalmente em casos de quartos não infectados (AARESTRUP, 2005). Autores como Melchior et al. (2006) descrevem que os aspectos da farmacodinâmica e farmacocinética dos antimicrobianos utilizados para mastite tem sido discutido com respeito a resistência a terapia. A distribuição do antimicrobiano pelo tecido mamário pode ser prejudicada por alterações patológicas como necrose e isquemia, impedindo o medicamento de alcançar o local da infecção.

Conforme Beuron (2012) o objetivo da terapia antimicrobiana consiste em atingir concentrações eficazes do fármaco no local da infecção e, portanto, a escolha do antimicrobiano adequado é imprescindível no sucesso do tratamento. Embora haja diferenças entre a susceptibilidade *in vitro* e *in vivo*, a determinação do perfil *in vitro* fornecerá informações importantes sobre a eficácia do antimicrobiano,

excluindo aqueles que sob condições *in vitro* forem observados resistência (SCHWARZ et al., 2001). Para tanto, foram realizados antibiogramas de *Staphylococcus* spp., e para melhor análise, subdivididos em SCP, *S. aureus* e SCN.

Com relação as 106 amostras de *Staphylococcus* spp. os antimicrobianos com maior frequência de sensibilidade foram cefalexina (95,3%), seguidos por cefalotina e ceftiofur com (92,5% e 90,6%). Ribeiro et al. (2007) encontrou susceptibilidade semelhante para ceftiofur (95,2%). O antimicrobiano cefoperazone apesar de apresentar sensibilidade baixa quando comparado aos outros antimicrobianos, apresentou também frequência de resistência baixa, devido ao percentual de resultados intermediários ser alta, diferente do encontrado por Ribeiro et al. (2009) que verificaram 70,3% de sensibilidade para o mesmo antimicrobiano. Quanto à resistência, os antimicrobianos: penicilina, amoxicilina, ampicilina e oxacilina apresentaram os maiores índices, ($p < 0,03$), com frequência de respectivamente (92,5%, 87,7%, 75,5% e 53,8%). Resultados semelhantes foram encontrados por Freitas et al. (2005) com resistência de 80% para penicilina, 75% para amoxicilina, e abaixo do encontrado para oxacilina com frequência de resistência de apenas 15%. Santos (2006) encontrou 83,3% das amostras resistentes à penicilina, 80,5% para ampicilina. De acordo com Tavares (2000), os estafilococos apresentam resistência acima de 70% para penicilina, amoxicilina e ampicilina. Taponem e Pyörälä (2009) relataram percentual abaixo do verificado pelo presente estudo, em que 36% das amostras diagnosticadas como *Staphylococcus* spp. na Noruega, foram resistentes para penicilina, assim como na Holanda com o percentual de 41-61% e na Finlândia 32% (PITKÄLÄ et al., 2004). Analisando o perfil geral de sensibilidade para os *Staphylococcus* spp. obteve-se como frequência de sensibilidade 65,3%, sensibilidade intermediária 10,6% e resistência 24,1%.

Com relação aos *Staphylococcus* coagulase-positivos, comparando a frequência de sensibilidade deste estudo com os de Beuron (2012) verificaram-se baixo percentual para os seguintes antimicrobianos: eritromicina (74,4% - 93,3%) clindamicina (64,1% - 91,1%), oxacilina (43,6% - 88,8%), penicilina (12,8% - 77,7%), ampicilina (25,6% - 68,8%) e cefalotina (84,6% - 88,8%). Para os antimicrobianos a seguir, encontramos maior frequência no presente estudo, como para enrofloxacin (87,2% - 71,1%), sulfametoxazol+trimetoprim (84,6% - 77,7%), ceftiofur (89,7% - 66,6%) e gentamicina (79,5% - 66,6%). Em relação à resistência verificou-se que a penicilina foi o antimicrobiano de maior índice, com (87,2%), seguido por amoxicilina (76,9%), ampicilina (61,5%) e oxacilina (43,6%), ($p < 0,001$). Freitas et al. (2005)

avaliou o perfil de susceptibilidade de SCP isolados e encontraram valores semelhantes para resistência do antimicrobiano penicilina (80%), amoxicilina (75%). O percentual geral de sensibilidade, sensibilidade intermediária e resistência verificados no presente estudo assim como por Freitas et al. (2005) são semelhantes e apresentaram respectivamente (64,5%, 7% e 28,5%) e (64,1%, 10,7% e 25,2%).

Com relação aos SCN, Taponem e Pyörälä (2009), relatam que o tratamento para esse grupo de bactérias parece ser mais resistente à antimicrobianos quando comparados aos *S. aureus*. Machado et al. (2008) relatam baixa susceptibilidade para diversos antimicrobianos como ampicilina (15%), penicilina (7%), oxacilina (19%) e eritromicina (39%). Situação diferente da encontrada por Beuron (2012), que descreveu susceptibilidade acima de 80%, aos antimicrobianos, a saber: cefalotina (93,3%), eritromicina (89,9%), clindamicina (88,4%), oxacilina (85,6%), sulfametoxazol+trimetoprim (83,3%) e tetraciclina (80,1%), para os antibióticos a seguir também foram verificados bons índices de susceptibilidade, mas com frequência abaixo de 80%, penicilina (75,4%), gentamicina (72,2%), ampicilina (66,6%), ceftiofur (62%). Com relação ao perfil geral de susceptibilidade aos antimicrobianos, verificaram-se para SCN os achados de sensibilidade 66%, sensibilidade intermediária 10,6% e resistência 23,4%, abaixo da susceptibilidade de 80% registrada por Beuron (2012).

Comparados aos resultados do presente estudo foram verificados no estudo de Beuron (2012), resultado semelhante para cefalotina (97,0%), eritromicina (80,6%), clindamicina (82,1%), sulfametoxazol + trimetoprim (89,6%). Resultado diferente foi verificado para oxacilina (44,8%), assim como por Pitkälä et al. (2004) que corrobora com o de Beuron (2012) apresentando cerca de 90% de susceptibilidade. Ainda sobre o presente estudo, verificou-se para tetraciclina (13,4%) de resistência, enquanto que o estudo de Pitkälä et al. (2004) verificou 9% na Finlândia e 16% na Holanda. Para penicilina e ampicilina as frequências verificadas foram abaixo do encontrado na literatura (1,5% e 9%). Quanto a gentamicina e ceftiofur os valores verificados foram acima do encontrado em literatura (88,1% e 91,0%), que segundo Langoni et al. (2007) mesmo antiga e bastante utilizada, a gentamicina continua sendo um antimicrobiano com elevado índice de susceptibilidade, assim como descrito por Watanabe et al. (2001) e Costa et al. (2000a).

Estudos sobre a susceptibilidade de antimicrobianos à *S. aureus* apresenta resultados variados. Langoni et al. (1991) assim como Nader Filho et al. (1992)

encontraram 23,1% e 15,2% de susceptibilidade à ampicilina e 13,7% e 1,7% para penicilina. Os resultados de Costa et al. (2000b) corroboram com os anteriores, em que menos de 20% dos isolados foram suscetíveis à penicilina e ampicilina. No presente estudo, resultado semelhante fora encontrado para penicilina, com (15,8%) de sensibilidade. Para amoxicilina assim como para ampicilina a sensibilidade verificada foi de (31,6% e 42,1%) respectivamente, valor acima do verificado em literatura. Dentre os dezoito antimicrobianos testados, a penicilina apresentou o percentual de resistência mais elevado ($p < 0,004$), concordando com a literatura, devido aos antimicrobianos penicilina e ampicilina serem os mais utilizados em todo o mundo como tratamento para diversas enfermidades (BAL et al., 2010).

Em relação a frequência de sensibilidade no presente estudo, os maiores índices foram para cefalexina (94,7%), seguido por cefoxitina e ceftiofur com (84,2%), cefalotina, enrofloxacin e sulfametoxazol + trimetoprim com (78,9%). Resultado abaixo do encontrado por Beuron (2012) para ceftiofur (72,8%), e acima para sulfametoxazol + trimetoprim e enrofloxacin com (83,8%), e para cefalotina (93,3%). O estudo de susceptibilidade aos *Staphylococcus aureus* realizado por Sousa et al. (2007), encontraram 67% de sensibilidade aos diversos antimicrobianos, assim como por Rabello et al. (2005), em que 45% dos *S. aureus* foram sensíveis à oxacilina, cefalotina, sulfametoxazol+trimetoprim, gentamicina e tetraciclina. Resultado semelhante fora verificado no presente estudo, com 60,8% de sensibilidade, 14%, de sensibilidade intermediária 25,1% de resistência.

De acordo com Cunha et al. (2006) e Benites et al. (2007), a ampicilina e penicilina são os antimicrobianos que apresentam maiores percentuais de resistência, aliados a amoxicilina, corroborando com os achados deste trabalho. Como são antimicrobianos antigos e foram amplamente utilizados no passado, a frequência de resistência se apresentou elevada, mas foi possível detectar amostras sensíveis a esses fármacos sendo sugeridos em alguns casos, a utilização desses antimicrobianos, ao invés de fármacos de última geração. Tavares (2000) assim como Costa et al. (2000a) relatam que os estafilococos isolados de leite de vacas com mastite quase sempre apresentam resistência à penicilina.

Assim como no presente estudo, é possível verificar cepas sensíveis aos antimicrobianos citados, o que não é garantia de boa eficácia quando *in vivo*. A alta resistência a determinados antimicrobianos muitas vezes, se dá pelo fato da utilização indiscriminada do fármaco em questão, conforme citado por Oliveira et al. (2002) no agreste de Pernambuco. Tal fato ocorre, devido a freqüente utilização de

um determinado antimicrobiano para tratamento de animais com mastite, ou pela utilização do mesmo como tratamento de outras enfermidades.

O alto custo para realização de culturas e antibiogramas impossibilita que muitos proprietários enviem amostras ao laboratório, gerando multiresistência, principalmente com relação aos *Staphylococcus* spp. A não realização do isolamento bacteriano para cultura e antibiograma geram, além de multiresistência, elevado custo com medicamentos e baixa qualidade do leite pela presença de resíduos não permitidos por legislação.

A cura dos casos de mastite por *S. aureus*, depende de fatores como o número de lactações, CSS, manejo, induzindo a taxa de cura de 15-85%, enquanto que para os SCN a taxa é de 80-90% (PYÖRÄLÄ; PYÖRÄLÄ, 1998; TAPONEM et al., 2007). Pyörälä e Taponem (2009) reportaram o valor de 44% para a taxa de cura de mastite por SCN sem tratamento. A terapêutica de um único isolado de SCN não é economicamente justificada, a não ser que algumas bactérias do grupo sejam diagnosticadas em amostras de leite isoladas dos tetos ou de tanque de refrigeração.

Na tentativa de elevar as taxas de cura em infecções persistentes, é necessário que se faça o tratamento dos animais no período seco (NEWTON et al., 2008). Outra maneira é aumentar a duração da terapia, por exemplo, para tratamento de casos positivos para *S. aureus*. Administrar antimicrobiano por 3-4 dias resulta em 29% de cura, enquanto que o tratamento por 5 dias em 42%, (PYÖRÄLÄ; PYÖRÄLÄ, 1998).

6.4 PESQUISA DE ADESINAS E BIOFILME EM ESTIRPES DE *STAPHYLOCOCCUS* SPP. POR MEIO DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

Foster e Höök (1998) descreveram que patógenos bacterianos extracelulares como os *Staphylococcus aureus* podem se aderir aos componentes da matriz extracelular do hospedeiro e iniciar uma colonização. A aderência se torna mediada pelas proteínas das adesinas, *Microbial Surface Components Recognising Adhesive Matrix Molecules* (MSCRAMM), que muitas vezes estão aderidas à parede celular (peptidoglicano). Adesinas como *cna* e *fnbps* ficam ancoradas às células provendo o

ataque da bactéria a matriz extracelular. As fibronectinas *fnbA* e *fnbB* são comuns em isolados de *S. aureus*, e muitas vezes responsáveis por mediar o ataque das bactérias contribuindo para a aderência das mesmas ao plasma celular, causando o início da infecção. Assim, a resposta imune contra tais fatores de virulência pode ser comprometida pela produção de anticorpos desviada, reconhecendo, por exemplo, os *fnbps* depois de ligados ao organismo do hospedeiro, impossibilitando portanto, o bloqueio da adesão bacteriana.

Com respeito à adesão do biofilme na glândula mamária, Cucarella et al. (2004) relatam que a bactéria se adere ao epitélio alveolar da glândula mamária e causa dano às células epiteliais, inflamação e prejuízos ao sistema imune do hospedeiro, ativação de macrófagos, migração neutrofílica do sangue para o leite, resultando no aumento das células somáticas. Mesmo em casos quando os isolados de *S. aureus* são sensíveis aos antibióticos *in vitro*, o tratamento pode ser ineficiente devido à persistência da infecção crônica pela presença do biofilme. Baselga et al. (1993), sugeriram que amostras de *S. aureus* produtoras de biofilmes são aptas a se fixarem na mucosa da glândula e causarem infecções em maior proporção do que as não produtoras, concluindo que a presença do biofilme participa ativamente na persistência de infecções, assim como Fox, Zadoks e Gaskins (2005). Mas a produção de biofilme pode não causar uma inflamação significativa com alto fluxo de neutrófilos, apontando para a necessidade de uma análise bacteriológica e detecção de genes por meio da biologia molecular.

Os *Staphylococcus aureus* estão dentre os agentes causadores de mastite subclínica mais comuns em todo o mundo, e possui, portanto, grande importância econômica para indústrias de leite, pois o leite cru é uma fonte de micro-organismos em potencial. Este patógeno extracelular é capaz de causar infecções persistentes, pelos numerosos mecanismos de aderência e estratégias para conter a defesa do sistema imunológico, pois, tais bactérias possuem alta capacidade de produção de diversos fatores de virulência, conforme Fitzgerald et al. (2000). Mesmo assim, não se exclui a presença dos mesmos genes em outras espécies bacterianas.

A capacidade de adesão dos SCN é similar aos SCP, mas a capacidade de invasão dos *S. aureus* é maior que a os SCN, (TAPONEM; PYÖRÄLÄ, 2009). Em amostras *S. aureus* tem sido observados fatores de virulência extracelulares como fibronectina, colágeno, proteínas, e enzimas, (REINOSO et al., 2008). A capacidade dessa bactéria se aderir às proteínas da matriz extracelular é considerada essencial

para a colonização e o estabelecimento da infecção, de acordo com o descrito por Salasia et al. (2004).

As adesinas são genes que expressam diferentes proteínas envolvidas na adesão, invasão e infecção da bactéria ao hospedeiro, (PALMA et al., 1999; ZECCONI et al., 2005). A proteína ligadora de colágeno (*cna*) é considerada um importante fator de virulência em diversas infecções estafilocócicas, englobando as infecções em casos de mastite subclínica em bovinos leiteiros. Smeltzer et al. (1997) reportam que amostras de *S. aureus* não necessariamente possuem gene específico de colágeno (*cna*), enquanto Klein et al. (2012) em um estudo sobre mastite subclínica no RJ e MG verificaram 22,4% de prevalência, e Kumar et al. (2011) na Índia, encontrou 6,3% das amostras positivas para este gene. Com relação aos resultados do presente estudo, verifica-se na Tabela 11, que a frequência de *S. aureus* para este gene foi de 47,4%, concordando com os achados de Ikawaty et al. (2010) na Holanda, que encontraram 49% das amostras de *S. aureus* positivas para o gene *cna*. Para os *Staphylococcus* spp. o gene codificador de adesina (*cna*) esteve presente em 17%.

Com relação à proteína ligadora de laminina (*eno*), Kumar et al. (2011) e Almeida (2009) encontraram a presença do gene em amostras de mastite subclínica positivas para *S. aureus* em respectivamente, 100% e 44% das amostras. Resultado semelhante ao primeiro estudo citado, foi encontrado no presente trabalho com relação a presença do gene *eno* em *Staphylococcus* spp, SCP, *S. aureus* e SCN, com frequência de respectivamente (82,1%, 84,6%, 84,2% e 80,6%).

A proteína ligadora de elastina (*ebp*) foi encontrada em todos os isolados de *S. aureus* no estudo de Ikawaty (2010), portanto em 100% das amostras. Analisando os dados encontrados neste estudo, verificou-se a presença de 52,6% das amostras de *S. aureus* positivas para a presença do gene *ebp*, assim como por Kumar et al. (2011) em 60,2% das amostras. Resultado acima do encontrado para os *Staphylococcus* spp. (17,9%), SCN (7,5%).

Quanto a proteína ligadora de fibrinogênio (*fib*), Booth et al. (2001) encontraram 20,1%, e Kumar et al. (2011) apresentou o percentual de 59,4%, semelhante ao encontrado neste estudo, com 68,4% das amostras, foi verificada frequência de ocorrência semelhante para *Staphylococcus* spp. (71,7%).

A fibronectina é um importante fator de virulência que contribui para adesão e invasão da bactéria na glândula mamária. Estudos sobre a ligação da fibronectina dos *S. aureus* às proteínas do hospedeiro, mostram a inibição da fagocitose,

(IKAWATY et al., 2010). No estudo de Booth et al. (2001) foram encontradas 89,7% das amostras positivas para proteína B ligadora de fibronectina (*fnbB*), valor acima do encontrado por Ikawaty et al. (2010) com 43% assim como o de Kumar et al. (2011) com percentual 21,9% das cepas avaliadas. Os resultados do estudo em questão mostraram baixo percentual para a presença do gene *fnbB* em *S. aureus* (15,8%) assim como para os *Staphylococcus* spp. (5,7%).

A proteína A ligadora de fibronectina (*fnbA*), não foi encontrada no presente estudo, não corroborando com os resultados encontrados por Ikawaty et al. (2010) e Kumar et al. (2011), em que 96% e 100% das amostras se apresentaram positivas para o gene, assim como Salasia et al. (2004) que encontraram também 100% das amostras de mastite subclínica positivas para o gene *fnbA*, em *S. aureus*.

Oliveira et al. (2006) relatam que o biofilme é um importante fator de virulência de *Staphylococcus* spp., e facilita a aderência e colonização do epitélio da glândula mamária, dificultando a erradicação do patógeno, resultando em uma infecção persistente. Segundo Cucarella et al. (2004), quando a mastite bovina por *Staphylococcus* spp. está associada à produção de biofilme, a severidade do quadro diminui e a capacidade de colonização aumenta.

Com relação aos resultados encontrados no presente estudo para proteína associada ao biofilme (*bap*), verificou-se maior frequência do gene para os SCN (67,2%), em seguida para *Staphylococcus* spp. (56,6%), e SCP (38,5%). Para os *Staphylococcus aureus* verificou-se 15,8% das amostras positivas para o gene *bap*, semelhante ao encontrado por Baselga et al. (1993) que revelou a presença do gene em 12% das amostras testadas. Os pesquisadores Fox et al. (2005) e Cucarella et al. (2004) relatam a presença do gene em 46% e 41% das amostras, enquanto Almeida (2009) não diagnosticou a presença do gene *bap* em nenhum dos isolados.

Quanto às associações de genes mais encontradas, Kumar et al. (2011), obtiveram como resultado “*eno/fib/fnbA*” em 17,2%, “*ebp/fib/eno/fnbA*” em 15,6%, “*ebp/eno/fnbA*” em 13,3% e *eno/fnbA* em 7,8%. Os pesquisadores ainda relataram que a combinação destes genes nos quadros de mastite nunca haviam sido reportadas. No presente estudo verificamos que combinação dos genes “*eno/fib/bap*” foi a mais frequentemente encontrada, com 46,2% das amostras de *Staphylococcus* spp. Relacionando os achados deste estudo com os de Kumar et al. (2011), verifica-se que a associação dos genes não foram as mesmas, visto que Kumar e colaboradores não estudaram a presença da proteína associada ao

biofilme (*bap*), e no presente estudo não se verificou a presença da proteína A ligadora de fibronectina.

Alguns fatores de virulência, encontrados em *S. aureus*, também podem ser encontrados em SCN, assim como os formadores de biofilme. Cucarella et al. (2001) mostraram que a produção de biofilme em *S. aureus* diminui a severidade da mastite, mas aumenta a capacidade de colonização na glândula mamária. A habilidade do gênero estafilococos formar biofilme está associada a genes e proteínas, já encontrados nas seguintes espécies: *S. aureus*, e SCN (*S. epidermidis* e *S. chromogenes*) também verificadas no presente estudo. Os grupos mais reportados como produtores de biofilmes foram SCN e posteriormente SCP, juntamente com os *S. aureus* correspondendo ao relato de Cucarella et al. (2004).

Comparando os resultados encontrados para a mediana das células somáticas das amostras de *Staphylococcus* spp. que apresentaram a associação “*eno/fib/bap*” com as demais associações de genes, verifica-se que os valores da mediana, mínimo e máximo foram maiores para a combinação de genes “*eno/fib/bap*” com 813.000 céls./ml (94.000 - 7.130.000 céls./ml), contra 466.000 céls./ml, (12.000 - 4.855.000 céls./ml) para as demais associações de genes, ($p < 0,03$). De acordo com os achados do presente estudo, verificou-se também que a mediana das CCS de *S. aureus* quando comparada aos demais grupos do estudo, se apresentou elevada em relação às combinações de genes “*eno/fib/bap*”, (Tabela 13).

Cucarella et al., (2004) reportaram que a média da CCS das amostras positivas para *bap* se apresenta acima de 200.000 cél./ml, enquanto que as amostras negativas a média é menor que 200.000 céls./ml. Tais dados indicam que vacas com baixa CCS podem ser reservatórios capazes de formar biofilmes e permitir a persistência deste fator de virulência nas fazendas em que foram isolados, dificultando a erradicação de *S. aureus* nos programas de controle da mastite, já que a formação do biofilme auxilia na sobrevivência do micro-organismo.

Quando comparados aos *S. aureus*, SCN são considerados menos patogênicos que as espécies coagulase-positivas, pois fazem parte da microbiota dos animais (KLOOS; BANNERMAN, 1995). Assim sendo, são menos patogênicos, e não devem ser considerados como simples agentes da microbiota do teto, mas como agentes patogênicos causadores de mastite, conforme Taponem e Pyörälä (2009). Pesquisadores como Zhang e Maddox (2000), relatam sobre a importância dos SCN, mas afirmam que poucos sabem a respeito dos fatores de virulência que

acometem esse grupo de bactérias, enfatizando a importância dos pesquisadores realizarem maiores estudos sobre o tema.

Conforme Klein et al. (2012) os casos clínicos sempre atraem a atenção dos estudiosos e produtores de leite, mas a detecção dos fatores de virulência também encontrados nos casos subclínicos podem ajudar na decisão sobre o abate de animais infectados com isolados altamente patogênicos de *Staphylococcus aureus*. A raça pode ser outro fator predisponente, maior em mestiços, quando comparados às raças puras, mas o estudo Aires de Sousa et al. (2007) não comprovou qualquer preferência pelo patógeno.

Futuramente, seria interessante descrever previamente o papel dos componentes da superfície bacteriana envolvida na aderência e internalização no epitélio da glândula mamária, enfatizando a direção aos ligantes envolvidos na aderência das bactérias às células dos hospedeiros, utilizando a imunologia para controlar infecções intamamárias causadas por esses patógenos.

6.4.1 Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos para associação de “*eno/fib/bap*”, a relação com o perfil geral e demais genes estudados.

Uma das hipóteses mais convincentes de explicar a resistência dos quimioterápicos é a habilidade que muitos *Staphylococcus* tem, de crescer em biofilmes de tecidos infectados, e se aderir às células do hospedeiro por meio de adesinas. Segundo Amorena et al. (1999) e Melchior et al. (2006), são muitos os mecanismos que tornam a presença das adesinas e biofilmes resistentes aos antimicrobianos, como a dificuldade de penetração pela matriz do biofilme, taxa de crescimento bacteriano alterada e alteração da fisiologia celular. A presença da matriz extracelular impede a ação dos antimicrobianos, por não conseguirem atingir a parede da célula. Cucarella et al. (2004) indicou a presença do gene *bap* com maior resistência antimicrobiana quando comparados às amostras negativas, necessitando de fármacos mais eficientes, contra bactérias produtoras de biofilmes e produtoras de adesinas.

Correlacionando as tabelas 14 e 15 observa-se que o percentual de amostras resistentes a amoxicilina, ampicilina e penicilina, das amostras que apresentaram “*eno/fib/bap*” é maior dos que as demais combinações de genes, ($p < 0,05$). Sobre o

percentual de amostras positivas para associação de genes “*eno/fib/bap*” que apresentaram menor percentual de sensibilidade que as demais combinações de genes obteve-se: cefoxitina (67,3% - 91,2%) com ($p<0,01$), neomicina (49% - 70,2%) com ($p<0,02$), tetraciclina (49% - 71,9%) com ($p<0,001$) e cloranfenicol (77,6% - 91,2%) não apresentou diferença estatisticamente significativa; além dos antimicrobianos já apresentados como amoxicilina (2% - 15,8%) com ($p<0,01$), ampicilina (2% - 26,3%) com ($p<0,003$).

As infecções recorrentes geram perda de sensibilidade para praticamente todas as classes de antibióticos. Muitas bactérias estão envolvidas nos quadros de mastite, e o tratamento de infecções recorrentes pode estar relacionado a habilidade dos patógenos formarem biofilmes e apresentarem adesinas (STOODLEY et al., 2002). Portanto, o sucesso da antibioticoterapia mamária, frequentemente tem desapontado em muito a saúde do úbere, pois a CCS não é reduzida, ou começa a aumentar novamente depois de um período (MELCHIOR et al., 2006).

6.5 COMPARAÇÃO ENTRE AMOSTRAS DOS TETOS E TANQUES DE REFRIGERAÇÃO

A CCS do tanque é uma medida indireta do percentual de quartos mamários infectados no rebanho e apresenta relação positiva com a prevalência da mastite entre os animais (SANTOS, 2006). Entretanto resultados negativos não implicam em ausência de agentes patogênicos (ROBERTSON; BAILEY, 1999).

Das cinco amostras de leite coletadas de tanque de resfriamento, totalizaram oito estirpes de *Staphylococcus* spp., sendo da primeira coleta (*S. arlettae*, *S. conhnii* subsp. *conhnii*, *S. haemolyticus* e *S. aureus*), da segunda coleta (*S. intermedius*), terceira coleta (*S. aureus* e *S. chromogenes*), e quinta coleta (*S. sciuri* subsp. *sciuri*). A prevalência de *Staphylococcus* spp. foi de 100%, sendo (3/8) 37,5% de SCP e (5/8) 62,5% de SCN. Frequência acima do encontrado por Miranda-Morales et al. (2008), que verificaram no México, SCN em 38,3%, *S. aureus* em 30%; e a de outros micro-organismos como *Mycoplasma* em 55%; *Streptococcus uberis* em 37,5%.

No presente estudo, verificou-se que nem sempre as amostras coletadas dos tanques se apresentam nos tetos, e também o inverso, quando nem sempre as

amostras dos tetos se apresentam nos tanques. No quadro 2 e tabela 16, percebemos o isolamento de poucas bactérias presentes nas amostras referentes aos tanques de refrigeração. Em todas as coletas, pelo menos uma das bactérias isoladas dos tetos individualmente, esteve presente nos tanques. Apenas na primeira coleta, isolaram-se quatro micro-organismos na amostra de tanque, sendo três deles não verificadas nas amostras dos tetos individuais analisadas.

Os achados do presente estudo com relação aos isolados dos tanques de refrigeração podem ser explicados quanto à seleção de bactérias existentes nos tanques, pela própria competição bacteriana, baixa temperatura gerada pelo resfriamento do tanque, entre outros fatores que interferem para que alguns micro-organismos sejam selecionados. Portanto as coletas de leite derivadas dos tanques de refrigeração para diagnóstico de mastite pode não ser um método confiável com relação ao isolamento bacteriano de agentes associados a esta enfermidade.

7 CONCLUSÕES

- ✓ A presença de micro-organismos está associada ao processo inflamatório da glândula mamária;
- ✓ O micro-organismo mais frequentemente isolado dos casos de mastite subclínica foi *Staphylococcus* spp. e dentre estes o *Staphylococcus* coagulase-negativo foi isolado com maior frequência quando comparado aos *Staphylococcus* coagulase-positivos;
- ✓ As mastites causadas por *Staphylococcus* apresentaram frequência mais elevada e as espécies mais isoladas foram *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. chromogens* e *S. warneri*;
- ✓ O micro-organismo associado à maior contagem de células somáticas foi *Streptococcus* spp., e a menor contagem foi verificada às mastites associadas à *Corynebacterium* spp.;
- ✓ As mastites associadas à *Staphylococcus* spp. apresentaram contagem de células somáticas intermediária entre *Streptococcus* spp. e *Corynebacterium* spp. independentemente da espécie de *Staphylococcus* spp. isolada;
- ✓ Os antimicrobianos cefalexina, cefalotina e ceftiofur foram os que apresentaram maior sensibilidade aos *Staphylococcus* spp. isolados;
- ✓ Com relação aos *Staphylococcus* spp. isolados, os antimicrobianos penicilina, amoxicilina e ampicilina, foram os que apresentaram maior frequência de resistência;
- ✓ O perfil de sensibilidade e resistência aos antimicrobianos testados foram semelhante entre as espécies de *Staphylococcus* coagulase-positivo e negativo;
- ✓ Com exceção da proteína A ligadora de fibronectina (*fnbA*), todos os outros fatores de virulência estudados foram detectados;
- ✓ Os genes codificadores de adesinas detectados com maior frequência foram *eno* e *fib*;
- ✓ A presença de um único gene codificador de adesina e biofilme não apresentou diferença estatisticamente significativa com relação às contagens de células somáticas das glândulas mamárias;

- ✓ A associação dos fatores de virulência “*eno/fib/bap*” foi a mais freqüentemente detectada e apresentou reação inflamatória medida pela CCS mais elevada quando comparou-se à presença dos demais genes;
- ✓ As amostras de *Staphylococcus* spp. em que foram detectados os genes “*eno/fib/bap*” apresentaram redução da sensibilidade quando comparada as outras amostras, para os antimicrobianos cefoxitina, neomicina, tetraciclina, amoxicilina e ampicilina;
- ✓ Nas amostras coletadas dos tanques de refrigeração não foram detectadas todas as espécies de *Staphylococcus* spp. isoladas dos quartos mamários, portanto a coleta de leite de tanque de refrigeração para diagnóstico de mastite, pode não ser um método confiável para se isolar todos os agentes associados à enfermidade na propriedade.

REFERÊNCIAS

- AARESTRUP, F. M. Veterinary drug usage and antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 96, n. 4, p. 271-281, 2005.
- ALMEIDA, R. A.; OLIVER, S. P. Interaction os coagulase-negative *Staphylococcus* species with bovine mammary epithelial cells. **Microbial Pathogenesis**, v. 31, p. 205-212, 2001.
- 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.
- ANDREWS, A. H.; BLOWEY, R. W.; BOYD, H. EDDY, R. G. **Medicina Bovina: doenças e criação de bovinos.** 2. ed. São Paulo: Rocca, p.1080, 2008.
- BAL, E. B. B.; BAYAR, S.; BAL, M. A. Antimicrobial susceptibilities of Coagulase-Negative Staphylococci (CNS) and Streptococci from bovine subclinical mastitis cases. **Journal of Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 267-274, 2010.
- BANNERMAN, T. L. *Staphylococcus, Micrococcus*, and other catalase-positive cocci tah grow aerobically. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. (Eds.) **Manual of clinical microbiology.** Washington: American Society for Microbiology, 2003, p. 384-404.
- 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.
- 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.
- BELOTI, V.; MÜLLER, E. E.; FREITAS, J. C.; METTIFOGO, E. Estudo da mastite subclínica em rebanhos leiteiros no norte do Paraná. Semina: **Ciências Agrárias**, v. 18, n.1, p.45-53, 1997.
- BENITES, N. R.; MELVILLE, P. A.; COSTA, E. O. Evaluation of the microbiological status of milk and various structures in mammary glands from naturally infected dairy cows. **Tropical Animal Health and Production**, v. 35, p. 301-307, 2003.
- BENTLEY INSTRUMENTS.** Somacount 300: operator's manual. Chaska, 1995. 12 p.
- BERGONIER, D.; DE CREMOUX, R.; RUPP, R.; LAGRIFOUL, G.; BERTHELOT, X. Mastitis of dairy small ruminants. **Veterinary Research**, v. 34, n. 5, p. 689-716, 2003.
- BEURON, D. C. **Prevalência e susceptibilidade antimicrobiana de patógenos causadores de mastite em rebanhos leiteiros.** 2012. 120 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2012.

BLOOD, D. C.; RADOSTITS, O. M. Mastite, In: **Clínica Veterinária**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p. 423-470.

BOOM, R.; SOL, C. J. A.; SALIMANS, M. M. M.; JANSEN, C. L.; WERTHEIM, V.; BOOTH, M. C.; PENCE, L. M.; MAHASRESHTI, P.; CALLEGAN, M. C.; GILMORE, M. S. Clonal associations among *Staphylococcus aureus* isolates from various sites of infection. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 345-352, 2001.

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.

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.

CASSALI, G. D. Eficácia das provas indiretas para o diagnóstico da mastite bovina em comparação com o exame bacteriológico. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, v. 5, n. 25, p. 13-14, 1985.

CERQUEIRA, M. M. O. P.; SENA, M. J. Produção higiênica e fatores determinantes da qualidade do leite. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v. 1, p.115-134, 1998.

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.

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

COSTA, E. O. ; GARINO JÚNIOR, F.; MELVILLE, P. A.; RIBEIRO, A. R.; SILVA, J. A. B.; WATANABE, E. T.; VALLE, C. R. Estudo da etiologia das mastites bovinas nas sete principais bacias leiteiras do estado de São Paulo. **Núcleo de Apoio à Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira (Napgama)**, São Paulo, v. 3, n. 4, p. 6-13. 2000a.

COSTA, E. O.; BENITES, N. R.; GUERRA, J. L. MELVILLE, P. A. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* spp. isolated from mammary parenchymas of slaughtered dairy cows. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 47, n. 2, p. 99-103, 2000b.

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

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.

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 Quarterly**, v. 24, p.181-198, 2002.

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.

DILLEN, P. M. E.; VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, p. 495-503, 1990.

DINGWELL, R. T., LESLIE, K. E., SCHUKKEN, Y. H., SARGEANT, J. M., TIMMS, L. L., UFFIELD, T. F., KEEFE, G. P., KELTON, D. F., LISSEMORE, K. D., CONKLIN, J. Association of cow and quarter-level factors at drying-off with new intramammary infections during the dry period. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 63, p. 75–89, 2004.

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

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pecuária e Abastecimento, 2011. Disponível em: <<http://www.cnpq.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/producao.php>>. Acesso em: 05 ag. 2011.

FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2011. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/default.aspx>. Acesso julho 2011>. Acesso em: 05 ag. 2011.

FARNSWORTH, R. J. The Current Status of the Use o Bulk Tank Milk Cultures in Milk Quality and Mastitis Control Procedures. **Agricultural Practice and Science Journal**, v. 13, p. 5-8, 1992.

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.

FERREIRO, L. Agentes etiológicos e terapêutica da mastite bovina no Brasil. **Revista Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, p. 37-41, 1980.

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., BESSER, T. E., JACKSON, S. M. Evaluation of a coagulase-negative variant of *Staphylococcus aureus* as a cause of intramammary infections in a herd of dairy cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 09, p. 1143–1146, 1996.

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

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.

GENTILINI, E.; DENAMIEL, G.; BETANCOR, A. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis in Argentina. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 1913-1917, 2002.

GOTZ, F. *Staphylococcus* and biofilms. **Molecular Microbiology**, v. 43, p. 1367–1378, 2002.

GRAPHPAD INSTAT software. STATISTICAL ANALYSIS SYSTEMS FOR PERSONAL COMPUTERS, 1990-1993.

HAVERI, M.; TAPONEN, S.; VUOPIO-VARKILA, J.; SALMENLINNA, S.; PYÖRÄLÄ, S. Bacterial genotype affects the manifestation and persistence of bovine *Staphylococcus aureus* intramammary infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 959-961, 2005.

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.

IORIO, N. L. P.; FERREIRA, R. B. R.; SCHUENCK, R. P. Simplified and reliable scheme for species-level identification of *Staphylococcus* clinical isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, p. 2564-2569, 2007.

JAYARAO, B. M.; WANG, L. A study on the Prevalence of Gram-Negative Bacteria in Bulk Tank Milk. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 2620-2624, 1999.

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.

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, 1999, p. 264-282.

KUMAR, R.; YADAV, B. R.; ANAND, S. K. SINGH, R. S.. Prevalence os adhesin and toxin genes among isolates of *Staphylococcus aureus* obtained from mastitic cattle. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 513–521, 2011.

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.

LANGONI, H.; PINTO, M. P.; DOMINGUES, P. F.; LISTONI, F. J. P. Etiologia e susceptibilidade da mastite bovina subclínica. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 43, p.507-515, 1991.

LANGONI, H. Mastite bovina. Conceitos e Fundamentos. In: IV ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITES, 2007, Botucatu. **Anais...** Botucatu: UNESP, 2007. p. 08-17.

LILIUS, E.; PESONEM, U. Use of inflammatory cell activities in bovine milk to diagnose mastitis. **American Journal Veterinary Research**, v. 51, n. 10, p. 1527-1533, 1990.

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, J. L. A.; GUZMÁN, O. E. C.; TREJO, A. C.; AGUIRRE, V. M. B.; MEZA, J. E. L.; ALARCÓN, J. J. V.; ZARZOSA, A. O. Invasive potential of bacterial isolates associated with subclinical bovine mastitis. **Science Direct**, v. 81. p. 358-361, 2006.

LOWY, F. D. *Staphylococcus aureus* infections. **New England Journal of Medicine**, v. 339, p. 520–532, 1998.

MACK, D.; FISCHER, W.; KROKOTSCH, A.; LEOPOLD, K.; HARTMANN, R.; EGGE, H.; LAUFS, R. The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear b- 1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. **Journal of Bacteriology**, v. 178, p. 175–183 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.

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

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

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.

MICHELIN, L.; LAHUDE, M.; ARAÚJO, P. R.; GIOVANAZ, D. S. H; MÜLLER, G.; DELAMARE, A. P. L.; COSTA, S. O. P.; ECHEVERRIGARAY, S. Pathogenic factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus epidermidis* associated with nosocomial infections occurring in intensive care units. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 17-23, 2005.

MIRANDA-MORALES, R. E.; TREJO, V. R.; CANDELAS, R. S.; CASAS, E. M. C.; GONZALEZ, M. G. S.; CASTOR, R. S.; TAVERA, F. J. T. Prevalence of pathogens with bovine mastitis in bulk tank milk in Mexico. **Animal Biodiversity and Emerging Disease**, v. 1140, p. 300-302, 2008.

MOTA, R. A.; CASTRO, F. J. C. DE; OLIVEIRA, A. A. Avaliação *in vitro* da sensibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de mastite subclínica de cabras do estado de Pernambuco-Brasil. In: **Encontro de Pesquisadores em Mamites**, v.3, 1999, Botucatu. **Anais...** Botucatu: FMVZ-UNESP, 1999, p. 140.

MOTA, R. A.; MEDEIROS, E. S.; SANTOS, M. V.; PINHEIRO JUNIOR, J. W.; MOURA, A. P. B. L.; COUTINHO, L. C. A. Participação dos *Staphylococcus* spp. na etologia das mastites em bovinos leiteiros no estado de Pernambuco (Brasil). **Ciência Animal Brasileira**, v. 13, n. 1, p. 124-130, 2012.

MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; LANDRY, M. L.; PFALLER, M. A. **Manual of clinical microbiology**. 9. ed. Washington: ASM Press; 2007. p. 390-411.

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.

NADER FILHO, A.; FERREIRA, L. M.; DO AMARAL, L. A.; ROSSI JÚNIOR, O. D.; OLIVEIRA, R. P. Sensibilidade antimicrobiana dos *Staphylococcus aureus* isolados no leite de vacas com mastite. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 74, n. 1, p. 1-4, 2007.

NASCIMENTO, J. S.; FAGUNDES, P. C.; PAIVA, B. M. A.; SANTOS, K. R.; CARMO, F. B. M. Production of bacteriocins by coagulase-negative staphylococci involved in bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v. 106, p. 61–71, 2005.

NEWTON, H. T.; GREEN, M. J.; BENCHAOUI, H.; CRACKNELL, V.; ROWAN, T.; BRADLEY, A.J. Comparison of the efficacy of cloxacillin alone and cloxacillin combined with an internal teat sealant for dry-cow therapy. **Veterinary Research**, v. 162, p. 678–683, 2008.

NOGUEIRA, M. P.; TURCO, C. P.; TONINI, M. G. O. Competitividade do leite versus outras atividades agrícolas. In: CARVALHO, M. P.; SANTOS, M. V. **Estratégia e competitividade na cadeia de produção do leite**. Passo Fundo: Berthier, 2005. p. 19-30.

OLIVEIRA, A. A.; MELO, C. B.; AZEVEDO, H. C. Diagnóstico e determinação microbiológica da mastite em bovinos leiteiros nos Tabuleiros Costeiros de Sergipe. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 1, p. 226-230, 2009.

OLIVER, S. P.; JAYARAO, B. M.; MURINDA, S. E. Impact of antibiotic use in adult dairy cows on antimicrobial resistance of veterinary and humans pathogens: a comprehensive review. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 8, n. 3, p. 337-355, 2011.

PALMA, M.; HAGGAR, A.; FLOCK, J. I. Adherence of *Staphylococcus aureus* is enhanced by an endogenous secreted protein with broad binding activity. **Journal of Bacteriology**, v. 181, p. 2840–2845, 1999.

PHILPOT, W. N.; NICKERSON, S. C. **Vencendo a luta contra a mastite**. São Paulo: Milkbuzz, 2002. 192 p.

PITKÄLÄ, A.; HAVERI, M.; PYÖRÄLÄ, S.; MYLLYS, V.; HONKANEN-BUZALSKI, T. Bovine mastitis in Finland 2001—prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 2433–2441, 2004.

POELAREND, J. J.; HOGEVEEN, H.; SAMPIMOM, O. C.; SOL, J. Monitoring subclinical mastitis in Dutch dairy herds. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MASTITIS AND MILK QUALITY, 2., 2001. Vancouver, British Columbia, Proceedings of the Second, 2001. p. 145–149.

PRESTES, N. C. LANDIM-ALVARENGA, F. C. **Obstetrícia Veterinária**, Rio de Janeiro, p.97-99, 2006.

PYORÄLÄ, S. H.; PYORÄLÄ, E. O. Efficacy of parenteral administration of three antimicrobial agents in treatment of clinical mastitis in lactating cows: 487 cases (1989–1995). **Journal of American Veterinary Medicine**, v. 212, p. 407–412, 1998.

PYORÄLÄ, S.; TAPONEM, S. Coagulase-negative staphylococci—Emerging mastitis pathogens. **Veterinary Microbiology**, v. 134, p. 3–8, 2009.

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

RADOSTITIS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. **Clínica Veterinária – Um tratado de Doenças de Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos, e Equinos**. 9. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2004. p.541-626.

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.

RENEAU, J. K. Somatic Counts: Measures of Farm Management and Milk Quality. **Nacional Mastitis Council**, 2012. Disponível em: <<http://www.nmconline.org/articles/sccmgmt.pdf>>. Acesso em: 19 set. 2012.

RIBEIRO, M. E. R.; ZANELA, M. B.; GOMES, J. F. et al. Mastite bovina no sul do Rio Grande do Sul. In: ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MAMITES, v. 4, 2007, Botucatu. **Anais...** Botucatu: FMVZ-UNESP, p. 95, 2007.

ROBERSON, J. R.; FOX, L. K.; HANCOCK, D. D.; GAY, J. M.; BESSER, T. E. Prevalence of coagulase-positive staphylococci, other than *Staphylococcus aureus*, in bovine mastitis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 57, n. 1, p. 54-58, 2006.

ROBERTSON, J.; BAILEY, T. Using records to evaluate udder health. Bulk milk analysis. **Veterinary Medicine**. p.190-193,1999.

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.

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, C. D. M. ***Staphylococcus* sp. e Enterobactérias isoladas de mastite recorrente em oito rebanhos da região de Uberlândia – MG: Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos**. 2006. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias – Produção Animal) Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, 2006.

SANTOS, L. L. dos. ***Staphylococcus* Coagulase Negativo como agente de mamite em rebanhos bovinos leiteiros da região sul do estado de Minas Gerais**. 2008. 40 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2008.

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.

SCHALM, O. W. Number and types of somatic cells in normal and mastitic milk. In: **Bovine Mastitis**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1971. p.94-127.

SCHWARZ, S.; KEHRENBURG, C.; WALSH, T. R. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. **International Journal of antimicrobial agents**, v. 17, n. 6. p. 431-437, 2001.

SEO, Y. S.; LEE, D. Y.; RAYAMAHJI, N.; KANG, M. L.; YOO, H. S. Biofilm-forming associated genotypic and phenotypic characteristics of *Staphylococcus* spp. isolated from animals and air. **Research. Veterinary Science**, v. 85, p. 433-438, 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.

SCHUKKEN, Y. H.; GROOMMERS, F. J.; VAN DE GEER, D.; ERB, H. N.; BRAND, A. Risk factors for clinical mastitis in herds with a low bulk milk somatic cell count. Data and Risk factors for all cases. **Journal of Dairy Science**, v. 73, p. 3463-3471, 1990.

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

SOUSA, M. A. de; PARENTE, C. E. S. R.; MOTTA, O. V. de; SILVA, D. A.; LENCASTRE, H. de. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from buffalo, bovine, ovine, and caprine Milk samples collected in Rio de Janeiro state, Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 3845-3849, 2007.

SPINNOSA, H. S.; GÓRNIK, 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 phenomenon. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 29, p. 361-367, 2002.

SUPRÉ, K.; HAESBROUCK, F.; ZADOKS, R. N.; VANEECHOUTTE, M.; PIEPERS, S.; DE VLEGHER, 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.

TAPONEM, S.; KOORT, J.; BJÖRKROTH, J.; SALONIEMI, H.; PYÖRÄLÄ, S. Bovine intramammary infections caused by coagulase-negative staphylococci may persist throughout lactation according to amplified fragment length polymorphism-based analysis. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 3301-3307, 2007.

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

TAVARES, W. Bactérias gram positivas: resistência do estafilococo, enterococo e pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 3, p. 281-301, 2000.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos**. São Paulo: Ed Atheneu, 2002. 1216 p.

TENHAGEN, B. A.; KÖSTER, G.; WALLMANN, J.; HEUWIESER, W. Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 7, p. 2542-2551, 2006

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

TIMMS, L. L. SHULTZ, L. H. Mastitis therapy for cows with elevated somatic cell counts on clinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 27, p. 271-371, 1984.

TIMMS, L. L.; SCHULTZ, L. H. Dynamics and significance of coagulase-negative staphylococcal intramammary infections. **Journal of Dairy Science**, v. 70, p. 2648-2657, 1987.

TORGERSON, P. R.; GIBBS, H. A.; ANDERSON, D. B. High incidence of clinical mastitis due to *Staphylococcus aureus* in dairy herds with low milk cell counts. **Veterinary Research**, v. 130, p. 54-55, 1992.

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.

VANCRAEYNEST, V.; 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.

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.

VIANNA, L. C.; MÜLLER, E. E.; FREITAS, J. C. de; PRETTO-GIORDANO, L. G.; SALVADOR, R.; DIAS, J. A. Etiologia das infecções intramamárias e contagens de células somáticas em vacas primíparas. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 23, p. 3-8, 2002.

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.

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

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.

ZHANG, S.; MADDOX, C. W. Cytotoxic activity of coagulase-negative *Staphylococci* in bovine mastitis. **Infection and Immunity**, v. 68, p. 1102-1108, 2000.