DANIELE CRISTINE BEURON

**Prevalência e Susceptibilidade Antimicrobiana de Patógenos
Causadores de Mastite em Rebanhos Leiteiros**

Pirassununga

2012

DANIELE CRISTINE BEURON

Prevalência e Susceptibilidade Antimicrobiana de Patógenos Causadores de Mastite em Rebanhos Leiteiros

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Nutrição e Produção Animal

Área de concentração:

Nutrição e Produção Animal

Orientador:

Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos

Pirassununga

2012

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2649
FMVZ

Beuron, Daniele Cristine

Prevalência e susceptibilidade antimicrobiana de patógenos causadores de mastite em rebanhos leiteiros / Daniele Cristine Beuron. -- 2012.
120 f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga, 2012.

Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal.

Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos.

1. Fatores de risco. 2. Mastite bovina. 3. MRSA. 4. *Staphylococcus aureus*. 5. Susceptibilidade antimicrobiana. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Monitoramento e vigilância da resistência antimicrobiana em bactérias patogênicas para o gado de leite", protocolado sob o nº 2418/2011, utilizando 1200 (mil e duzentos) bovinos leiteiros, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos, 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 26/10/2011.

We certify that the Research "Monitoring and surveillance of antimicrobial resistance in bacteria pathogenic to dairy cattle", protocol number 2418/2011, utilizing 1200 (thousand and two hundred) dairy cattle, under the responsibility Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos, 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 10/26/2011.

São Paulo, 27 de outubro de 2011.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: Beuron, Daniele Cristine

Título: Prevalência e susceptibilidade antimicrobiana de patógenos causadores de mastite em rebanhos leiteiros

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal 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: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura _____

À Meus pais Valdir e Lourdes Beuron

Aos meus irmãos Marcelo Rodrigo e Marcos Paulo

Aos meus sobrinhos João Pedro e José Afonso

Ao meu amor Elcio

Dedico este trabalho com muito amor e gratidão

AGRADECIMENTO

Em primeiro lugar, agradeço a **Deus** por ter me dado saúde e força para recomeçar em momentos difíceis, e poder realizar este trabalho.

Aos **meus queridos e amados pais Valdir e Lourdes** pelo dom da vida, carinho, compreensão e pelas palavras de motivação. E especialmente por compreender todos os momentos de ausência.

Aos meus **dois irmãos** mais que amados **Marcelo Rodrigo e Marcos Paulo** por todo amor e carinho que eles têm por mim, e principalmente por apoiarem e entenderem minhas escolhas.

A meus dois sobrinhos lindos, **João Pedro e José Afonso** por todas as alegrias, pela esperança e força que eles me dão.

Às minhas cunhadas **Priscila e Simone**, companheiras dos meus irmãos por tornarem o dia deles melhor e por todo carinho que sempre tiveram comigo.

Ao amor da minha vida **Elcio Luis de Souza Medeiros**, que tem sido mais que um companheiro. Por todo apoio e carinho, por todo amor que tem me dado.

À minha segunda família, **Dona Maria, Seu Valter, Fo e Valtinho** por todo carinho.

Ao meu orientador, **Professor Dr. Marcos Veiga dos Santos**, exemplo de profissional, agradeço pela credibilidade, confiança, e a disponibilidade para me orientar.

À **Lucinéia e Zeca** por todo carinho, pelos ensinamentos, conselhos e pela ajuda prestada sempre em todos os momentos.

Aos meus colegas de pós-graduação **Nara, Susana, Cristina, Camila, Aline, Juliana, Marina, Juliano, Tiago, Cristian e Marcos** pela amizade, pela troca de idéias, companheirismo e por toda ajuda prestada para que este trabalho fosse realizado.

Às amigas **Cris, Nara, Susi, Camila, Aline e Ju (Barreiro)** por dividir as alegrias, as confidências, pela ajuda que sempre me deram em todos os momentos e por todo tempo que passamos juntas.

Em especial as três pessoas que foram fundamentais para que eu conseguisse realizar este trabalho: **Cristina Simões Cortinhas (Cris), Bruno Garcia Botaro (Chapolin) e José Franchini Garcia Moreno (Zeca)**, de coração, muito obrigada, sem vocês eu não teria conseguido.

À minha amiga Paula Adriane Picollo Pieruzi (**Puletti**) pela amizade, pelo carinho e companheirismo nas horas difíceis, sempre me apoiando e me incentivando, minha gratidão e minha amizade serão eternas.

À minha amiga **Eveline Zuniga** por tudo o que fez e faz por mim, sei que nossa amizade é verdadeira.

Ao meu amigo **Antônio Cândido Cerqueira Leite Ribeiro (Tonico)** pelo exemplo de ser humano, de profissional, por todo carinho e por todos os ensinamentos, agradeço a Deus ter te conhecido e poder dizer que você fez parte do meu crescimento profissional.

Aos meus **amigos** que não vejo a algum tempo que são muitos, mas que não posso deixar de mencionar sintam-se todos agradecidos por todos os anos de amizade e carinho.

À minha amiga **Fofa** que mesmo longe sempre torceu e torce por mim, nossa amizade começou na infância e vai durar eternamente.

Às minhas cinco amigas que fiz na graduação **Elisa, Elly, Lili, Mo e Carol** meu carinho por vocês continua o mesmo apesar de não nos vermos mais com tanta frequência.

A todos os meus **colegas de graduação**, por terem dividido esta fase e por todos os **amigos** que fiz durante este período.

A todos os **professores** que passaram pela minha vida, tenho certeza que cada um deles contribuiu para que chegasse até aqui.

À **Luana e Lara** por terem feito parte de um momento muito bom da minha vida e por terem me acolhido quando precisei sempre (**República Três corações**).

A todos os meus familiares, em especial minha prima **Kelli** por todo apoio e incentivo que sempre me deu, por todos os momentos que partilhamos.

A todos os **professores** do Departamento de Nutrição e Produção Animal por todo conhecimento que me foi passado durante as disciplinas que cursei.

A **todas as meninas da limpeza**, pois sem elas não teríamos um lugar tão limpo e organizado para viver, meus sinceros agradecimentos.

À **Alessandra e João Paulo** por sempre serem tão prestativos e por sempre estarem prontos a ajudar.

A todos os **funcionários** do Departamento de Nutrição e Produção animal pela dedicação e por colaborarem sempre.

Aos produtores de leite: **Doralice Foltran, Sebastião Coelho, Jorge Tuckmantel, senhor Carlos, Iara Meireles, César A. Meireles, Luiz Rosim, Luis Castiglioni, Wilson Castiglioni, José Castiglioni, Carolina Malek, Orlando Mourão, Luis Meneguete, Rose Glauce, PCAPS, Eugênio Yokoya**, pela credibilidade e disponibilidade em abrir as portas de suas propriedades para execução deste trabalho.

À **EMBRAPA GADO DE LEITE** pela oportunidade de realizar este trabalho.

À **Dra. Cida** por toda ajuda prestada, pelo carinho e atenção sempre.

Ao pessoal da Embrapa Gado de Leite: **Letícia, Fernanda, Fabiana, Marcos e Alessandro** por toda ajuda e pelo carinho que me receberam no tempo em que passei com vocês, foi curto mas importantíssimo..

À **Universidade de São Paulo** e à **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia** pela oportunidade de realização do mestrado.

Ao programa de Pós-Graduação do Departamento de Nutrição e Produção Animal (**VNP**) por ter me ofertado o curso de mestrado e ter contribuído imensamente para meu crescimento profissional.

A todos os meus colegas de pós-graduação que compartilham da mesma experiência e que contribuíram de alguma forma para meu crescimento profissional e pessoal.

Ao **CNPQ** pela bolsa concedida durante o mestrado.

E finalmente aos **animais**, pois sem eles este trabalho não seria possível, meu respeito e minha gratidão.

Enfim, **a todos aqueles** que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, e que não tenham sido citados, minha eterna gratidão.

Meus sinceros agradecimentos.

“Da vida não quero muito... Quero apenas saber que tentei tudo o que quis, tive tudo que pude, amei tudo que valia a pena e perdi apenas o que no fundo, nunca foi meu...”.

Carla de Paula

RESUMO

BEURON, D. C. **Prevalência e susceptibilidade antimicrobiana de patógenos causadores de mastite em rebanhos leiteiros** [Prevalence and antimicrobial susceptibility of pathogens causing mastitis in dairy herds]. 2012. 120 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2012.

Os objetivos do presente estudo foram: a) avaliar a frequência de isolamentos de patógenos causadores de mastite em rebanhos leiteiros comerciais; b) determinar a susceptibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. isolados de casos de mastite subclínica c) avaliar o perfil de multirresistência de *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. d) Detectar o gene *mecA* em *Staphylococcus* spp. resistentes a oxacilina/meticilina; e) avaliar a associação entre as práticas de manejo e tratamento de mastite e a susceptibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* isolados de rebanhos leiteiros. Foram selecionados para o presente estudo 13 rebanhos leiteiros a partir de um total de 60 rebanhos vinculados a um laticínio da região de Pirassununga/SP. Questionários previamente formulados foram respondidos pelos responsáveis do rebanho para avaliar a associação entre as práticas de manejo e tratamento de mastite e a susceptibilidade antimicrobiana de *S. aureus*. Após a seleção dos rebanhos e aplicação dos questionários, 1069 amostras de leite compostas foram coletadas durante 24 meses, em quatro períodos para realização de cultura e identificação dos patógenos, testes de susceptibilidade antimicrobiana e detecção do gene *mecA*. Os testes de susceptibilidade foram realizados em todos os isolados de *Staphylococcus* spp. e em 50% de *Streptococcus* spp. selecionados aleatoriamente. Os antimicrobianos testados foram: ampicilina 10 mg; clindamicina 2 µg, penicilina 1 mg; ceftiofur 30 µg; gentamicina 10 mg; sulfatrimetropin 25 µg, enrofloxacin 5 µg; sulfonamida 300 µg, tetraciclina 30 µg; oxacilina 1 mg; cefalotina 30 µg e eritromicina 5 µg. Todos os isolados de *Staphylococcus* spp. que apresentaram resistência a oxacilina/meticilina foram avaliados quanto à presença do gene *mecA*. Entre os isolados, *Staphylococcus* coagulase negativa foi o mais prevalente (28,6%), seguido por *S. aureus* (27,8%) e *Corynebacterium* spp. (10,9%). A susceptibilidade antimicrobiana dos isolados de *S. aureus* foi de 95,23% (eritromicina), 93,33% (cefalotina) e 65,71% (ampicilina). A susceptibilidade antimicrobiana dos isolados de *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN) foi de 93,33% (cefalotina), 89,91% (eritromicina) e 62,03% (ceftiofur). Entre os isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP), a susceptibilidade antimicrobiana foi de 93,33% (eritromicina), 91,11% (clindamicina e sulfonamida). A susceptibilidade antimicrobiana dos isolados de *Streptococcus agalactiae* foi de 38,46% (ampicilina) e 50% (sulfatrimetropin) e os isolados de *S. dysgalactiae* apresentaram susceptibilidade à tetraciclina de 19,44% e a clindamicina de 47,22%. A multirresistência foi maior entre os isolados de SCN (20,3%) e *S. aureus* (15,7%). Não foi detectado o gene *mecA* em nenhum dos isolados de *Staphylococcus* spp. Houve associação entre as variáveis para os seguintes antimicrobianos: a) tratamento de mastite clínica: ampicilina ($P = 0,0055$), ceftiofur ($P = 0,0481$), sulfatrimetropin ($P = 0,0293$), sulfonamida ($P = 0,0043$) e tetraciclina ($P = 0,0058$); e envio de amostras para cultura e antibiograma: ampicilina ($P = 0,0032$), tetraciclina ($P < 0,0001$). Os principais fatores de risco para susceptibilidade antimicrobiana de *S. aureus* foram o não envio de amostras para cultura e antibiograma para tetraciclina (OR=6.012), penicilina (OR=4.687), eritromicina (OR=3.059) e ampicilina (OR=2.571), tratamento de mastite clínica para ampicilina (OR=2.178), ceftiofur (OR=1.956), gentamicina (OR=1.668), oxacilina (OR= 1.132) e penicilina (OR= 1.261) e tratamento de vaca seca para enrofloxacin (OR=2.111) e tetraciclina (OR=2.075). Os microrganismos mais frequentemente isolados foram *Staphylococcus* coagulase negativa e *S. aureus*. Os testes de susceptibilidade realizados para as espécies de *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. apresentaram alta

susceptibilidade para a maioria dos antimicrobianos testados. Com exceção de *Streptococcus agalactiae* para ampicilina e sulfatrimetropin e os isolados de *S. dysgalactiae* para tetraciclina e clindamicina. A maioria dos *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. não apresentaram perfil de multirresistência. Nenhum dos isolados de *Staphylococcus* spp. fenotipicamente resistentes a oxacilina/meticilina apresentaram o gene *mecA*. O maior fator de risco associado à susceptibilidade de *S. aureus* foi em relação à tetraciclina, penicilina, eritromicina e ampicilina para o não envio de amostras para cultura e antibiograma. Dois fatores de risco importantes identificados foram relacionados à ampicilina, ceftiofur, gentamicina, oxacilina e penicilina para o tratamento de mastite clínica e à enrofloxacin e tetraciclina para o tratamento de vaca seca.

Palavras-chave: Fatores de risco. Mastite bovina. MRSA. *Staphylococcus aureus*. Susceptibilidade antimicrobiana.

ABSTRACT

BEURON, D. C. [Prevalence and antimicrobial susceptibility of pathogens causing mastitis in dairy herds]. **Prevalência e susceptibilidade antimicrobiana de patógenos causadores de mastite em rebanhos leiteiros**. 2012. 120 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2012.

The aims of this study were: a) to evaluate the frequency of mastitis pathogens in commercial dairy herds, b) to determine the antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* spp. and *Streptococcus* spp. isolated from subclinical mastitis c) to evaluate the profile of multidrug resistance of *Staphylococcus* spp. and *Streptococcus* spp. d) to detect the *mecA* gene in *Staphylococcus* spp. resistant to oxacillin / methicillin, e) to evaluate the association between management practices and treatment of mastitis, and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from dairy herds. Thirteen dairy herds were selected from a total of 60 dairy farms in the region of Pirassununga / SP. Questionnaires formulated previously were answered by dairy farmers to evaluate the association between mastitis treatment practices and antimicrobial susceptibility. A total of 1,069 composite samples of milk from all herds were collected for culture and identification of pathogens, susceptibility testing and *mecA* gene detection, over 24 months in four periods. The susceptibility tests were performed in all isolates of *Staphylococcus* spp. and in 50% of *Streptococcus* spp. randomly selected. The antimicrobials tested were ampicillin 10mg; 2µg clindamycin, penicillin 1mg; ceftiofur 30µg; gentamicin 10mg; sulfatrimetropin 25µg, 5µg enrofloxacin; 300µg sulfonamide, tetracycline 30µg; oxacillin 1mg; 30µg cephalothin and erythromycin 5µg. All *Staphylococcus* spp. that were resistant to oxacillin/methicillin in the susceptibility tests were investigated for the presence of *mecA* gene. Among the isolated bacteria, CNS was the most prevalent (28.6%), followed by *S. aureus* (27.8%) and *Corynebacterium* spp. (10.9%). The antimicrobial susceptibility of isolates of *S. aureus* was 95.23% (erythromycin), 93.33% (cephalothin) and 65.71% (ampicillin). The antimicrobial susceptibility of isolates of coagulase-negative *Staphylococcus* (CNS) was 93.33% (cephalothin), 89.91% (erythromycin) and 62.03% (ceftiofur). Among strains of coagulase positive *Staphylococcus* (CPS), the antimicrobial susceptibility was 93.33% (erythromycin), 91.11% (clindamycin and sulfonamide). The antimicrobial susceptibility of the strains of *Streptococcus agalactiae* was 38.46% (ampicillin) and 50% (sulfatrimetropin) and isolates of *S. dysgalactiae* were susceptible to tetracycline and clindamycin (19.44% to 47.22%). The multidrug resistance was higher among isolates of CNS (20.3%) and *Staphylococcus aureus* (15.7%). The *mecA* gene was not detected in any of *Staphylococcus* spp. isolates. There was an association

between variables for the following antimicrobials: a) treatment of clinical mastitis: ampicillin (P = 0.0055), ceftiofur (P = 0.0481), sulfatrimetropin (P = 0.0293), sulfonamide (P = 0.0043) and tetracycline (P = 0.0058); and sending samples for culture and antibiogram: ampicillin (P = 0.0032), tetracycline (P = <0.0001). Major risk factors for antimicrobial susceptibility of *S. aureus* were not submitting samples for culture and antibiogram for tetracycline (OR = 6.012), penicillin (OR = 4.687), erythromycin (OR = 3.059) and ampicillin (OR = 2.571), treatment of clinical mastitis: ampicillin (OR = 2.178), ceftiofur (OR = 1.956), gentamicin (OR = 1.668), oxacillin (OR = 1.132) and penicillin (OR = 1.261); and dry cow therapy: enrofloxacin (OR = 2.111) and tetracycline (OR = 2.075). The most frequent organisms isolated were coagulase negative *Staphylococcus* and *S. aureus*. The susceptibility tests performed for the species of *Staphylococcus* spp. and *Streptococcus* spp. showed high susceptibility to most antimicrobials tested. With the exception of *Streptococcus agalactiae* to ampicillin and sulfatrimetropin and isolates of *S. dysgalactiae* to tetracycline and clindamycin. Most *Staphylococcus* spp. and *Streptococcus* spp. did not show multidrug resistance profile. None of *Staphylococcus* spp. phenotypically resistant to oxacillin / methicillin showed the *mecA* gene. The major risk factor associated with susceptibility of *S. aureus* to tetracycline, penicillin, erythromycin and ampicillin was not sending samples for culture and sensitivity. Two important risk factors have been identified related to ampicillin, ceftiofur, gentamicin, penicillin and oxacillin for treatment of clinical mastitis and enrofloxacin and tetracycline for the treatment of dry cow dry cow therapy.

Keywords: Risk factors. Bovine mastitis. MRSA. *Staphylococcus aureus*. Antimicrobial Susceptibility

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Eletroforese do fragmento do gene *mecA* (533pb) de *Staphylococcus* spp. isolados de amostras de leite, em gel de agarose 2%. (M= marcador de molecular; 1 e 2 = controle positivo; 3,4,5 = amostras testadas, 6 = controle negativo)54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Amostragem dos rebanhos de acordo com o número de vacas em lactação	42
Tabela 2 - Prevalência de agentes causadores de mastite isolados de amostras de leite compostas em rebanhos leiteiros na região de Pirassununga – São Paulo	49
Tabela 3 - Distribuição da susceptibilidade "in vitro" de <i>Staphylococcus</i> spp. e <i>Streptococcus</i> spp., isolados de amostras de leite em rebanhos leiteiros da região de Pirassununga – São Paulo	51
Tabela 4 - Perfil de multirresistência de <i>Staphylococcus</i> spp. e <i>Streptococcus</i> spp. isolados de amostras de leite em rebanhos leiteiros da região de Pirassununga – São Paulo	52
Tabela 5 - Distribuição da multirresistência de acordo com as combinações de classes de antimicrobianos de <i>Staphylococcus</i> spp. e <i>Streptococcus</i> spp. isolados de amostras de leite em rebanhos leiteiros da região de Pirassununga – São Paulo	53
Tabela 6 - Frequência de práticas de manejo e tratamento de mastite e a susceptibilidade antimicrobiana de <i>S. aureus</i> frente à ampicilina entre os grupos susceptível (n=139) e resistente (n=71)	72
Tabela 7 - Frequência de práticas de manejo e tratamento de mastite e a susceptibilidade antimicrobiana de <i>S. aureus</i> frente à cefalotina entre os grupos susceptível (n=196) e resistente (n=14)	73
Tabela 8 - Frequência de práticas de manejo e tratamento de mastite e a susceptibilidade antimicrobiana de <i>S. aureus</i> frente à clindamicina entre os grupos susceptível (n=195) e resistente (n=15).....	74
Tabela 9 - Frequência de práticas de manejo e tratamento de mastite e a susceptibilidade antimicrobiana de <i>S. aureus</i> frente à ceftiofur entre os grupos susceptível (n=153) e resistente (n=57)	75
Tabela 10 - Frequência de práticas de manejo e tratamento de mastite e a susceptibilidade antimicrobiana de <i>S. aureus</i> frente à enrofloxacin entre os grupos susceptível (n=176) e resistente (n=34).....	76
Tabela 11 - Frequência de práticas de manejo e tratamento de mastite e a susceptibilidade antimicrobiana de <i>S. aureus</i> frente à eritromicina entre os grupos susceptível (n=200) e resistente (n=10)	77

Tabela 12 - Frequência de práticas de manejo e tratamento de mastite e a susceptibilidade antimicrobiana de <i>S. aureus</i> frente à gentamicina entre os grupos susceptível (n=172) e resistente (n=38).....	78
Tabela 13 - Frequência de práticas de manejo e tratamento de mastite e a susceptibilidade antimicrobiana de <i>S. aureus</i> frente à oxacilina entre os grupos susceptível (n=185) e resistente (n=25).....	79
Tabela 14 - Frequência de práticas de manejo e tratamento de mastite e a susceptibilidade antimicrobiana de <i>S. aureus</i> frente à penicilina entre os grupos susceptível (n=150) e resistente (n=60).....	80
Tabela 15 - Frequência de práticas de manejo e tratamento de mastite e a susceptibilidade antimicrobiana de <i>S. aureus</i> frente à sulfatrimetropin entre os grupos susceptível (n=175) e resistente (n=35).....	80
Tabela 16 - Frequência de práticas de manejo e tratamento de mastite e a susceptibilidade antimicrobiana de <i>S. aureus</i> frente à sulfonamida entre os grupos susceptível (n=180) e resistente (n=30).....	82
Tabela 17 - Frequência de práticas de manejo e tratamento de mastite e a susceptibilidade antimicrobiana de <i>S. aureus</i> frente à tetraciclina entre os grupos susceptível (n=191) e resistente (n=19).....	83
Tabela 18 – Fatores de risco associados à susceptibilidade antimicrobiana de <i>S. aureus</i> estimados por regressão logística.....	85

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 OBJETIVOS GERAIS	23
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
 CAPÍTULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA	24
 2 MASTITE BOVINA E SEUS PRINCIPAIS AGENTES ETIOLÓGICOS	24
2.1 PRINCIPAIS AGENTES CAUSADORES DE MASTITE	25
2.2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	25
2.2.2 <i>Staphylococcus coagulase negativa</i> (SCN)	26
2.2.3 <i>Streptococcus agalactiae</i>	27
2.2.4 <i>Streptococcus dysgalactiae</i>	27
2.2.5 <i>Streptococcus uberis</i>	28
2.3 AGENTES ANTIMICROBIANOS	28
2.5 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA	31
2.6 <i>Staphylococcus aureus</i> RESISTENTE À METICILINA (MRSA)	35
2.7 PROGRAMAS DE MONITORAMENTO E VIGILÂNCIA DA RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA	36
 CAPÍTULO 2 - ISOLAMENTO E PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE PATÓGENOS CAUSADORES DE MASTITE	38
 RESUMO	38
ABSTRACT	39
3 INTRODUÇÃO	40
4 MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1 LOCAIS E SELEÇÃO DE REBANHOS	42
4.2 COLETA DE LEITE E PREPARO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE	43
4.3 CULTIVO MICROBIOLÓGICO E IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA	43
4.4 CRIOPRESERVAÇÃO DOS ISOLADOS BACTERIANOS	44
4.5 TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA	44
4.6 MULTIRRESISTÊNCIA	45

4.7 DETERMINAÇÃO DE <i>S. aureus</i> RESISTENTES A METICILINA (MRSA)	45
4.7.1 Extração do DNA.....	45
4.7.2 Reação de Amplificação.....	46
4.7.3 Eletroforese em gel de agarose.....	46
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
5 RESULTADOS.....	48
5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS REBANHOS.....	48
5.2 PREVALÊNCIA DOS PATÓGENOS	48
5.3 SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE <i>Staphylococcus</i> spp. .E <i>Streptococcus</i> spp.	49
5.4 MULTIRRESISTÊNCIA.....	52
5.5 DETERMINAÇÃO DE <i>S. aureus</i> RESISTENTES A METICILINA (MRSA)	53
6 DISCUSSÃO.....	55
6.1 PREVALÊNCIA DOS PATÓGENOS	55
6.2. SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE <i>Staphylococcus</i> spp. E <i>Streptococcus</i> spp.	58
6.3 MULTIRRESISTÊNCIA.....	60
6.4 DETERMINAÇÃO DE <i>S. aureus</i> RESISTENTES A METICILINA (MRSA)	61
7 CONCLUSÃO	64

CAPÍTULO 3 – PRÁTICAS DE MANEJO E TRATAMENTO DE MASTITE

ASSOCIADAS À SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE

<i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	65
---	-----------

RESUMO	65
---------------------	-----------

ABSTRACT.....	66
----------------------	-----------

7 INTRODUÇÃO.....	67
--------------------------	-----------

8 MATERIAL E MÉTODOS.....	69
----------------------------------	-----------

8.1 SELEÇÃO DE REBANHOS LEITEIROS E ANÁLISES LABORATORIAIS.....	69
---	----

8.2 QUESTIONÁRIO PARA AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DAS PRÁTICAS DE MANEJO E TRATAMENTO DE MASTITE E A SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE <i>S. aureus</i>	69
--	----

8.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	70
-------------------------------	----

9 RESULTADOS	71
9.1 CARACTERIZAÇÃO DOS REBANHOS	71
9.2 ASSOCIAÇÃO ENTRE AS PRÁTICAS DE TRATAMENTO DE MASTITE E A SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE <i>S. aureus</i>	71
9.3 FATORES DE RISCO ASSOCIADOS À SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE <i>S. aureus</i>	83
10 DISCUSSÃO	86
11 CONCLUSÃO.....	90
12 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	91
REFERÊNCIAS	93
ANEXOS	110

1 INTRODUÇÃO

A mastite bovina é considerada a principal doença em rebanhos leiteiros em todo mundo devido, aos prejuízos econômicos que acarreta ao produtor, decorrentes principalmente da diminuição da secreção láctea e à perda da qualidade do leite (HOGEVEEN et al., 2011). É considerada a enfermidade endêmica mais prevalente e onerosa da produção bovina leiteira mundial, além de representar um problema de saúde pública (BRADLEY, 2002; BARKEMA et al., 2009). As infecções bacterianas são a causa mais predominante de mastite bovina. Numerosos microrganismos associados aos casos de mastite já foram isolados do leite, a maioria das bactérias incluem espécies de *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Enterococcus* e *Corynebacterium* spp. (BARLOW, 2011).

A terapia antimicrobiana é uma das principais ferramentas para o tratamento e controle de infecções intramamárias em vacas leiteiras (ERSKINE et al., 2003). Desde a introdução da penicilina na década de 1940, os agentes antimicrobianos são empregados tanto na medicina humana quanto na promoção da saúde e do bem-estar animal (BARLOW, 2011). No tratamento de mastite, vários antimicrobianos são utilizados principalmente para tratar infecções causadas por *Staphylococcus* spp.: macrolídeos, lincosamidas, beta-lactâmicos, aminoglicosídeos, e tetraciclina (AARESTRUP; JENSER, 2007; LUTHJE; SCHWARZ, 2007). No entanto, a eficiência desses agentes é comprometida quando a resistência antimicrobiana emerge em patógenos relevantes como *S. aureus* e *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN). A população de microrganismos resistentes é influenciada por fatores como: a pressão seletiva, o tipo de antimicrobiano administrado e a frequência de mutação de genes de resistência em diferentes microrganismos (SCHWARZ et al., 2001).

Um dos instrumentos recomendados para a redução do impacto da disseminação da resistência antimicrobiana é a cultura microbiológica e os testes de susceptibilidade. A base ideal para a escolha do agente antimicrobiano inclui confirmação laboratorial do agente patogênico e avaliação da susceptibilidade antimicrobiana *in vitro*. Um dos principais métodos utilizados é o teste de disco difusão em ágar que oferece resultados dos padrões de resistência ou susceptibilidade, de uma bactéria específica a determinados antimicrobianos. Esses testes auxiliam na tomada de decisão, na utilização do antimicrobiano correto e combate aos agentes causadores de mastite (HENDRIKSEN et al., 2008; SCHWARZ et al., 2010).

Dentro deste contexto, um dos patógenos mais estudados quanto à resistência antimicrobiana é *Staphylococcus aureus*, devido à importância como agente causador da mastite e pela dificuldade de controle (RUSSI et al., 2008; TURUTOGLU et al., 2009; SHI et al., 2010; SPOHR et al., 2011). Destaca-se como um dos microrganismos mais frequentemente associado às infecções intramamárias de bovinos em todos os continentes e o agente que isoladamente determina as maiores perdas na pecuária leiteira (BARKEMA et al., 2006; HOGEVEEN et al., 2011).

O aumento da prevalência de *S. aureus* multirresistentes causadores de mastite bovina ocorre principalmente em cepas resistentes à meticilina, denominadas de MRSA (methicillin resistant *S. aureus*), as quais apresentam como característica principal a multirresistência a todos os antimicrobianos do grupo beta-lactâmicos. A origem de resistência aos beta-lactâmicos se dá por um gene denominado “mecA” que codifica uma proteína de ligação à penicilina (PBP2a ou PBP). A pesquisa do gene mecA nos estafilococos é um instrumento auxiliar para a determinação de aspectos epidemiológicos da doença. Existe uma heterogeneidade genética considerável em populações naturais de MRSA (HOLMES; ZADOKS, 2011; SPOHR et al., 2011). Um grande número de genes que carregam a resistência com diferentes mecanismos têm sido identificados (KHAN et al., 2000; LUTHJE; SCHWARZ, 2007).

Numerosas técnicas moleculares têm sido aplicadas na investigação epidemiológica da resistência antimicrobiana, com a finalidade de identificar e rastrear padrões de infecção. A técnica de PCR (*Polimerase Chain Reaction*) é utilizada para confirmação da resistência para meticilina, após detecção da resistência à oxacilina *in vitro* (HOLMES; ZADOKS, 2011).

Vários estudos sobre os padrões de susceptibilidade de patógenos causadores de mastite têm sido relatados em outros países (DE OLIVEIRA et al., 2000; TENHAGEN et al., 2006; BENGTSSON et al., 2009; BAL et al., 2010; KALMUS et al., 2011; PARK et al., 2012), e os resultados têm sido bastante variáveis. Diferentes estudos têm demonstrado crescente frequência de resistência entre os patógenos causadores de mastite (MYLLYS et al., 1998) ou aumento de susceptibilidade (ERSKINE et al., 2002) enquanto outros relataram nenhuma mudança nos padrões de resistência (MAKOVEC; RUEGG, 2003). A prevalência do gene mecA foi estudada em alguns países (NAM et al., 2011; SPOHR et al., 2011; HARAN et al., 2012; PRABHU et al., 2012) e todos têm demonstrado a importância da relação da genotipagem com a resistência antimicrobiana, principalmente em relação aos antimicrobianos do grupo beta-lactâmicos. No Brasil, apesar da existência de estudos sobre susceptibilidade antimicrobiana de agentes causadores de mastite (COSTA et al., 2000;

FREITAS et al., 2005; NADER FILHO, 2007; SANTOS 2006), ainda não foram avaliadas a associação entre as práticas relacionadas ao tratamento e a susceptibilidade antimicrobiana de patógenos causadores de mastite, bem como os possíveis fatores de risco. Da mesma forma, poucos estudos avaliaram a presença do gene *mecA* em MRSA isolados de mastite bovina.

1.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a prevalência e a susceptibilidade antimicrobiana de isolados de *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. de mastite subclínica em vacas leiteiras de rebanhos comerciais do Estado de São Paulo.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar o perfil de multirresistência de *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp.;
- b) Detectar o gene *mecA* em *Staphylococcus* spp., resistentes à oxacilina (MRSA);
- c) Avaliar a associação entre práticas de manejo e tratamento e a susceptibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus aureus*;
- d) Avaliar fatores de risco associados à susceptibilidade antimicrobiana de *S. aureus*.

CAPÍTULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA

2 MASTITE BOVINA E SEUS PRINCIPAIS AGENTES ETIOLÓGICOS

A mastite bovina caracteriza-se pela inflamação da glândula mamária por consequência da invasão microbiana, principalmente bactérias, fungos, leveduras e algas (BRADLEY, 2002; SORDILLO, 2011). É a doença mais importante dos rebanhos leiteiros em todo o mundo devido à alta incidência de casos clínicos, alta prevalência de infecções subclínicas e aos prejuízos econômicos que acarreta (HOGVEEN et al., 2011). As estimativas das perdas de produção podem variar de 10 a 30% da produção leiteira por lactação, e isso é influenciado por diversos fatores como: gravidade da infecção, microrganismo causador, duração da infecção, idade do animal, época, estado nutricional e potencial genético (SORDILLO, 2011).

A infecção intramamária pode se manifestar clinicamente, com sinais clínicos locais ou sistêmicos, e principalmente alterações visuais do leite (HORTET; SEEGER, 1998) ou sob a forma subclínica, pelo aumento da contagem celular do leite, alterações de composição e principalmente, diminuição da produção de leite pela vaca. Apesar do grande número de pesquisas sobre controle da mastite, trata-se ainda de uma doença com alta prevalência em rebanhos leiteiros (HALASA et al., 2007; CONTRERAS; RODRÍGUEZ, 2011).

Classicamente, as mastites de etiologia infecciosa são epidemiologicamente agrupadas em contagiosa ou ambiental, diferem essencialmente em função da capacidade adaptativa do agente infeccioso ao hospedeiro (BARKEMA et al., 2006; RIEKERINK et al., 2008). Desta forma, classificam-se como agentes contagiosos aqueles que têm como reservatório a glândula mamária, e como agentes ambientais aqueles cuja fonte primária é o próprio ambiente do animal (esterco, lama, curral). No primeiro grupo encontram-se *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, e *Corynebacterium bovis* e no segundo grupo, *Streptococcus uberis* e outros, *Staphylococcus* coagulase negativa, enterobactérias, *Actinomyces pyogenes*, *Pseudomonas* spp., além de leveduras e algas clorofiladas do gênero *Prototheca* spp. (BRADLEY, 2002; CONTRERAS; RODRÍGUEZ, 2011). Entre os coliformes, *Escherichia coli* é o agente mais prevalente nos casos de mastite clínica, podendo causar casos agudos em razão da ação de toxinas (BHATT et al., 2011).

Os agentes causadores de mastites podem também ser classificados de acordo com a gravidade em agentes principais ou secundários. Os agentes principais são os que provocam um impacto considerável na saúde da vaca, na qualidade do leite e na produtividade (ZADOKS; FITZPATRICK, 2009). Os agentes secundários são aqueles encontrados normalmente na pele do úbere e que podem ser considerados parte da microbiota do úbere. Os agentes principais estão associados à ocorrência de mastites clínicas, e dentro deste grupo *Staphylococcus aureus* é uma das principais causas de mastite clínica, e também é o microrganismo mais frequentemente isolado em casos de mastite subclínica (GENTILINI et al., 2000)

2.1 PRINCIPAIS AGENTES CAUSADORES DE MASTITE

2.2.1 *Staphylococcus aureus*

Até o momento, mais de 50 espécies de *Staphylococcus* e subespécies foram caracterizadas. O gênero está dividido em estafilococos coagulase positiva e estafilococos coagulase negativa, com base na sua capacidade para coagular o plasma. (BARKEMA et al., 2009). *S. aureus* é o principal agente etiológico de infecções no úbere em rebanhos leiteiros. É um microrganismo geralmente encontrado no interior da glândula mamária, no canal ou na pele do teto, especialmente quando há lesão na pele.

A mais importante fonte de infecção para *S. aureus* dentro do rebanho são glândulas mamárias infectadas, ducto do teto colonizado, tetos lesionados infectados, conjunto de teteiras do equipamento de ordenha, pano comum para secar animais e mãos do ordenhador, sendo o momento da ordenha o mais importante na transmissão de *S. aureus* entre vacas (BRADLEY, 2002). Uma vez instalado no interior da glândula mamária, esse agente tem a capacidade de fixar-se às células epiteliais, produzir diversas toxinas e estabelecer a infecção (GÜLER et al., 2005). Estas toxinas são responsáveis por surtos de intoxicação alimentar em humanos (LLEWELYN; COHEN, 2002) e podem também contribuir para a persistência e aumento de lesões nas glândulas mamárias de bovinos. As lesões causadas por *S. aureus* podem resultar em necrose do estroma e parênquima mamário. A necrose resulta em perda de função secretora e consequente redução da produção de leite (BARKEMA et al., 2006).

Na grande maioria dos países, este agente pode ser encontrado em praticamente todos os rebanhos leiteiros, com a prevalência que varia de 81 a 94% (COSTA et al., 2000; DE

OLIVEIRA et al., 2000; GENTILINI et al., 2000; CONTRERAS; RODRÍGUEZ, 2011). A infecção por *S. aureus* tem principalmente caráter subclínico e crônico. Esta espécie tende a induzir uma resposta imune mais branda que contribui para uma habilidade de estabelecer infecções intramamárias crônicas. Casos subclínicos crônicos de mastite causada por *S. aureus* promovem atrofia do alvéolo mamário, fibrose e micro-abscessos, o que limita a ação fagocítica de células e a ação de antimicrobianos, causando infecções profundas no tecido mamário, com episódios de liberação de bactérias dos quartos mamários infectados acompanhados de alta contagem de célula somática (CCS) (BANNERMAN et al., 2004).

A terapia da vaca seca e durante a lactação fazem parte de programas de controle do *S. aureus*. Fatores relacionados às características individuais, da infecção e do tratamento tem grande influência nas taxas de cura (BARKEMA et al., 2006). Em relação ao animal, as taxas de cura podem variar consideravelmente, pois dependem da resposta do animal, dos fatores de virulência do patógeno, do padrão de susceptibilidade e da eficácia do tratamento. Essas taxas tendem a diminuir com o aumento da idade do animal, com o aumento da CCS e o número de quartos infectados por vaca, o que resulta em maior duração da infecção e da contagem bacteriana total no leite (CBT). Geralmente, os casos de mastite causada por *S. aureus* são subclínicos, crônicos e de longa duração, podendo persistir por semanas ou meses (LLEWELYN; COHEN, 2002).

Estudos de impacto econômico da mastite sobre a cadeia leiteira sugerem que a infecção intramamária por *S. aureus* causa perdas não somente na diminuição da produtividade do animal doente (SHI et al., 2010; HOGVEEN et al., 2011), mas também na redução da qualidade do leite por elevada contagem de células somáticas (GENTILINI et al., 2000)

2.2.2 *Staphylococcus coagulase negativa* (SCN)

São agentes comensais, os quais são encontrados na pele dos tetos e do úbere. Apesar disso, algumas espécies têm capacidade de colonizar o canal do teto, podem dar origem a infecções persistentes, em que há aumento na CCS (GILLESPIE et al., 2009). Além do aumento da CCS, a infecção também pode provocar alterações no tecido da glândula mamária que levam a uma diminuição da produção de leite (TAPONEN et al., 2007). SCN normalmente são classificados como agentes secundários, uma vez que a patogenicidade é baixa ou mesmo ausente. As espécies mais frequentemente isoladas nas infecções intramamárias são: *Staphylococcus chromogenes*, *S. epidermitis*, *S. haemolyticus*, *S. hyicus*, *S.*

simulans, *S. xylosus*. (THORBERG et al., 2009). As infecções por SCN estão presentes em 10 a 20% dos quartos e a infecção é mais frequente no início da lactação. No entanto, algumas semanas após o parto ocorre grande declínio da infecção em resultado da cura espontânea (GILLESPIE et al., 2009).

2.2.3 *Streptococcus agalactiae*

Este agente é uma das espécies de estreptococos mais comumente identificadas e tem sido detectada em 31 a 48% de amostras de leite de tanque (ZADOKS et al., 2011). Este microrganismo tem a habilidade de entrar pelo canal do teto e causar infecções subclínicas, levando a uma diminuição na produção de leite e é considerado um agente muito importante nos rebanhos brasileiros. Pode ser isolado também de superfícies contaminadas com leite, tais como teteiras e mãos dos ordenhadores (SAMPIMON et al., 2009).

Nos países, como Canadá, estudos apontam que cerca de 40 a 50% dos rebanhos apresentam ao menos uma vaca infectada por *S. agalactiae* (RIEKERINK et al., 2008). Os animais que apresentam mastite causada por *S. agalactiae* desempenham importante papel de reservatório no rebanho, e a transmissão ocorre principalmente durante o período da ordenha, porém bezerras criadas em bezerreiros coletivos e que recebem leite de vacas com mastite também podem adquirir a infecção (BAL et al., 2010). A infecção por esse agente manifesta-se na grande maioria das vezes na forma subclínica, com acentuado aumento de CCS (GUERIN-FAUBLEE et al., 2002)

A resposta à antibioticoterapia no tratamento de infecções causadas por *S. agalactiae* permite a sua erradicação em um rebanho infectado. O programa de controle do *S. agalactiae* é baseado na cultura microbiológica e tratamento de todos os quartos infectados (GUERIN-FAUBLEE et al., 2002; RATO et al., 2007).

2.2.4 *Streptococcus dysgalactiae*

Diferentes linhagens de *S. dysgalactiae* apresentam não somente padrões epidemiológicos ambientais, mas também contagiosos (WYDER et al., 2011). Portanto, este microrganismo é considerado um agente ambiental, mas com ocorrência de transmissão entre vacas, e pode permanecer viável durante um longo período no ambiente (PHUEKTES et al.,

2003). Já foi isolado a partir de glândulas mamárias infectadas e lesões presentes no teto. *S. dysgalactiae* é transmitido principalmente durante a ordenha (CALVINHO et al., 1998), no entanto, existem potenciais reservatórios extra mamários, tais como amígdalas, boca e vagina (GUERIN-FAUBLEE et al., 2002). Também está envolvido na mastite de verão que afeta vacas secas e novilhas durante os meses de verão. Os casos clínicos de *S. dysgalactiae* tendem a ser esporádicos, com maior frequência de ocorrência no início da lactação, devido à infecção durante o período seco e tendem a durar menos de um mês (RATO et al., 2007). No entanto, algumas infecções podem tornar-se persistentes, o que resulta em aumento da CCS e possibilidade de se tornarem fontes de novas infecções (DENAMIEL et al., 2005; BENGTSSON et al., 2009).

2.2.5 *Streptococcus uberis*

Além da glândula mamária de vacas infectadas, *S. uberis* pode ser encontrado em diversos locais, como, por exemplo, na superfície da pele, trato genital, no solo e esterco (BRADLEY, 2002). Este patógeno está associado com infecções intramamárias clínica e subclínica. Este microrganismo pode ser isolado a partir de glândulas mamárias durante o período de lactação e de vacas não lactantes (REINOSO et al., 2011). Além disso, fatores como pressão de vácuo da ordenhadeira têm sido associados com a taxa de incidência de mastite clínica causada por *S. uberis* (PHUEKTES et al., 2003; BARKEMA et al., 2006). Outro problema potencial, é que a infecção pode permanecer durante longos períodos e a ausência de tratamento, pode provocar graves perdas na produção de leite (ODIERNO et al., 2006; ZADOKS; FITZPATRICK, 2009).

2.3 AGENTES ANTIMICROBIANOS

As primeiras substâncias antimicrobianas foram introduzidas na década de 1930 e nas décadas subsequentes surgiu a maioria dos antimicrobianos disponíveis até hoje (ANDREWS et al., 2008; OLIVER et al., 2011).

Os agentes antimicrobianos são substâncias de origem natural, semissintética ou sintética que matam ou inibem o crescimento de um microrganismo. Os termos “agente

antimicrobiano” e "antibacteriano" englobam todos os antibióticos, bem como compostos sintetizados ou modificados, que tem o mesmo efeito (COOKSEY, 1998).

Existem quatro maneiras em que os antimicrobianos são utilizados em animais: 1) terapêutica: com o objetivo de controlar uma infecção bacteriana existente; 2) metafilática: termo controverso, referindo-se ao uso com fins terapêuticos e profiláticos; 3) profilática: usada em indivíduos ou grupos. Em vacas leiteiras são usados antimicrobianos no fim do período de lactação pela via intramamária para prevenir mastite e 4) promotor de crescimento em animais de produção: antimicrobianos são usados como suplemento alimentar, continuamente, em doses subterapêuticas (SCHWARZ et al., 2001; CLOETE, 2003).

Os agentes antimicrobianos têm sido empregados no tratamento da mastite desde a década de 1940. Seu uso auxilia na defesa do hospedeiro, elimina os agentes patogênicos e reduz as consequências fisiopatológicas da infecção. Além de ser um componente essencial para a cura dos casos clínicos de mastite e eliminação da infecção, representa uma estratégia para o controle, prevenção e diminuição da disseminação para os quartos não infectados (AARESTRUP, 2005).

O objetivo da terapia antimicrobiana consiste em atingir concentrações eficazes do fármaco no local da infecção, portanto a escolha de um antimicrobiano adequado é imprescindível no sucesso do tratamento. Deve-se considerar a provável capacidade de ação, absorção e penetração do antimicrobiano no local da infecção, e a manutenção de uma concentração efetiva. A capacidade de absorção de um medicamento depende do tipo de lesão, do tecido envolvido e de barreiras naturais presentes no leite local (ANDREWS et al., 2008).

Os agentes antimicrobianos são administrados via intramamária ou sistêmica para diminuir a incidência e a duração de infecções do úbere, portanto o objetivo da terapia é manter a maior concentração possível de antimicrobiano no quarto afetado por um período suficiente para eliminar o agente causador (ERSKINE et al., 2003). Emprega-se a terapia antimicrobiana no tratamento de mastite clínica durante a lactação e de mastite subclínica no final da lactação (BARLOW, 2011). A taxa de passagem de um agente antimicrobiano para o leite após a administração parenteral depende do grau de ionização, solubilidade lipídica, e extensão do plasma da proteína de ligação (ANDREWS et al., 2008).

Os antimicrobianos mais comumente utilizados em animais de produção podem ser divididos em sete classes incluindo os β -lactâmicos (ampicilina, amoxicilina, cloxacilina, cefalotina, cefoperazona, ceftiofur e penicilina G), tetraciclina (oxitetraciclina, tetraciclina e clortetraciclina), aminoglicosídeos (estreptomicina, neomicina e gentamicina), fluoroquinolonas (enrofloxacina, danofloxacina), macrolídeos (eritromicina), lincosamidas e

sulfonamidas (sulfametazina) (POL; RUEGG, 2007b; SAINI et al., 2012). Porém, há uma grande diferença, no mundo todo, em relação à regulamentação, disponibilidade de mercado, distribuição e utilização de produtos antimicrobianos em veterinária. As classes de beta-lactâmicos e aminoglicosídeos estão entre os medicamentos mais utilizados para o tratamento de mastite (COSTA et al., 2000).

Os antimicrobianos podem atuar de diversas maneiras, nos processos metabólicos ou em estruturas do microrganismo, que causam a inibição dos processos de multiplicação da célula bacteriana ou à sua sobrevivência. O mecanismo de ação é exercido por interferência na síntese da parede celular, de ácidos nucleicos, e na síntese proteica, alterações na permeabilidade da membrana citoplasmática e interferência na replicação do cromossomo (TENOVER, 2006). A atividade dos antimicrobianos depende da ligação dos mesmos aos seus alvos bioquímicos, com saturação suficiente para bloquear a função celular normal e deter o crescimento microbiano. Um destes alvos é a parede celular, cuja estrutura única oferece importantes componentes para ligação de muitos antimicrobianos. As penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos contêm em sua estrutura um anel beta-lactâmico, que interage com proteínas denominadas PBPs (*Penicillin Binding Protein*), inibindo a reação de transpeptidação. Com isso, há o impedimento da formação das ligações entre as cadeias adjacentes dos peptídeoglicanos, ocasionando uma perda na rigidez da parede celular. (ACAR, 2001; CLOETE, 2003). Acredita-se, também, que tais drogas possam atuar promovendo a ativação de enzimas autolíticas, resultando na degradação da parede (FISHER et al., 2005). Outro importante mecanismo de ação é a inibição da síntese de proteínas. Neste grupo estão os macrolídeos, como eritromicina, claritromicina e azitromicina, e as lincosamidas, que se ligam à subunidade ribossomal 50S e inibem a translocação do complexo ribossômico (CLOETE, 2003; TENSION; MANKIN, 2006). Os aminoglicosídeos (estreptomicina, gentamicina, canamicina,) interferem com a formação do complexo de iniciação, a primeira interagindo com a subunidade 50S do ribossomo, e os últimos com a subunidade 30S. As tetraciclinas também se ligam à subunidade ribossomal 30S (sítio A), impedindo a ligação do aminoacetil-tRNA, enquanto o cloranfenicol se liga à subunidade ribossomal 50S, inibindo a ligação do tRNA e da peptidil transferase e, assim, a elongação do peptídeo (TENSION; MANKIN, 2006). As quinolonas (ácido nalidíxico, ciprofloxacino, norfloxacino, entre outros) inibem a replicação do DNA e a transcrição por meio da inibição da DNA girase ou da topoisomerase IV (HAWKEY, 2003). Outro importante mecanismo de ação é o antagonismo metabólico, que ocorre, geralmente, por meio de inibição competitiva.

Neste grupo, estão trimetopim e as sulfonamidas, que afetam enzimas da via metabólica do ácido fólico (TAVARES, 2002).

A escolha de um agente antimicrobiano adequado é crucial em qualquer regime terapêutico. Os agentes antimicrobianos podem ser subdivididos em substâncias de amplo espectro, que podem inibir o crescimento ou até mesmo matar um amplo número de bactérias; e de estreito espectro, que são mais específicos, para tratamento de patógenos, gêneros ou espécies específicas. A base ideal para a escolha do agente antimicrobiano inclui confirmação laboratorial do patógeno (exame microbiológico) e uma precisa avaliação da susceptibilidade antimicrobiana *in vitro*. Embora haja uma diferença entre a susceptibilidade antimicrobiana *in vitro* e *in vivo*, a determinação do perfil de susceptibilidade *in vitro* irá fornecer informações importantes sobre a eficácia do antimicrobiano e irá excluir aqueles antimicrobianos que, sob condições *in vitro*, a resistência é observada (SCHWARZ et al., 2001).

A identificação e isolamento do patógeno causador da infecção intramamária em amostras de leite é considerada o diagnóstico definitivo da mastite bovina (ERSKINE et al., 2003). Os métodos convencionais de identificação bacteriana baseiam-se, essencialmente, na cultura do microrganismo, seguida de análise das características fenotípicas, provas bioquímicas e seu perfil enzimático (HOGAN et al., 1999). A cultura microbiológica auxilia um programa de controle específico, para detectar a presença de um patógeno novo ou emergente, avaliar a eficiência do tratamento ou estabelecer padrões de susceptibilidade. Mas o sucesso do programa de controle varia dependendo do tipo de organismo, metodologia de coleta de amostra e procedimentos laboratoriais (SCHLEGLOVA et al., 2001).

2.5 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

O surgimento de bactérias resistentes foi observado logo após a descoberta dos primeiros antimicrobianos na medicina humana e veterinária na década de 1940 (CLARKE, 2006). Ela provavelmente surgiu há milhões de anos atrás em bactérias produtoras de antimicrobianos vivendo no solo, e foi subsequentemente transferida para espécies bacterianas (AARESTRUP, 2005).

Várias publicações descreveram a susceptibilidade antimicrobiana de patógenos causadores de mastite bovina de populações selecionadas ao longo dos últimos cinquenta anos (BARLOW, 2011). A resistência antimicrobiana de *S. aureus* à penicilina é provavelmente a

mais conhecida (GENTILINI et al., 2000). Muitos autores relataram cepas resistentes em *S. aureus* isolados de mastite bovina em diferentes países. A frequência de resistência de *S. aureus* à penicilina na Itália foi de 47% (MORONI et al., 2006), na Argentina 40% (GENTILINI et al., 2000), no Uruguai 47% (GIANNEECHINI et al., 2002) e 52% na Finlândia (PITKALA et al., 2004). Na Alemanha verificou-se que a resistência à ampicilina aumentou significativamente ao longo da primeira lactação (TENHAGEN et al., 2006), sugerindo que a pressão seletiva favoreceu o aumento da resistência. Essa tendência foi observada em isolados do leite de animais de fazendas orgânicas, que foram mais susceptíveis à penicilina quando comparados com isolados de fazendas convencionais (TIKOFISKY et al., 2003). As diferenças nas taxas de resistência à penicilina entre os diversos países podem estar relacionadas ao controle de mastite, pois em alguns países a utilização de agentes antimicrobianos é estritamente regulamentada (BAL et al., 2010).

Segundo Schwarz et al. (2001), a emergência de populações bacterianas resistentes pode ocorrer devido alguns fatores: a) repetida exposição a um agente antimicrobiano, b) acesso das bactérias a um pool de genes de grande resistência em um ambiente multi-bacteriano, e c) presença de elementos genéticos móveis. O fenômeno da resistência bacteriana é uma resposta evolutiva destes microrganismos à presença de agentes antimicrobianos no ambiente. Um conjunto integrado de elementos de resistência promove a proteção bacteriana contra os antimicrobianos (VAN HOEK et al., 2011).

A origem da resistência antimicrobiana pode ser genética ou não (cromossômica e extra cromossômica). Na resistência de origem não genética, ou seja, fenotípica, a bactéria adquire resistência à determinada droga, momentaneamente e, não consegue transmiti-la para sua progênie. Este mecanismo de origem não genética, geralmente está relacionado a processos de multiplicação bacteriana necessária para a maioria das ações antibacterianas das drogas. Diversos mecanismos emergentes de resistência aos antimicrobianos foram recentemente descritos. E embora exista uma grande variedade de mecanismos de resistência aos antimicrobianos, um dos mecanismos mais importantes é a produção de beta-lactamases contra os beta-lactâmicos (VAN HOEK et al., 2011). A primeira beta-lactamase foi identificada em *Escherichia coli*, durante estudos para a utilização de penicilina na prática médica. O grau de resistência da bactéria depende da quantidade de enzima produzida, da habilidade dessa enzima em hidrolisar o antimicrobiano em questão (potência) e da velocidade com que o beta-lactâmico penetra pela membrana externa da bactéria (permeabilidade da membrana) (BRADFORD, 2001).

O desenvolvimento de enzimas que degradam (beta-lactamases) ou alteram a estrutura química do agente antimicrobiano (aminoglicosídeo cinases) pode ocorrer em qualquer espécie bacteriana. Exemplos clássicos são os estafilococos resistentes à penicilina G, produtores de beta-lactamases, e bactérias Gram negativas produtoras de enzimas de adenilação, fosforilação, ou acetilação, que alteram e inativam os aminoglicosídeos (VAN HOEK et al., 2011).

As bactérias podem ser naturalmente resistentes. A resistência natural ou intrínseca faz parte das características biológicas primitivas dos microrganismos. Resulta da expressão de genes que codificam estruturas ou mecanismos que impedem a ação do antimicrobiano sobre seu alvo (WANNAMACHER, 2004). Resistência intrínseca ou natural decorre de um fator inerente estrutural ou funcional, associado com espécies bacterianas, um gênero ou mesmo um grande grupo. Por exemplo, bactérias gram-negativas são intrinsicamente resistentes aos glicopeptídeos, porque sua membrana externa é impermeável a esses antimicrobianos. A resistência adquirida tem origem genética e decorre de modificações na estrutura ou no funcionamento da célula bacteriana que bloqueiam a ação dos antimicrobianos. As bactérias podem adquirir genes de resistência pela captura de DNA (transformação), via bacteriófagos (transdução) ou pela transferência de célula para célula (conjugação). A conjugação é o mais importante mecanismo para a transferência de genes de resistência, devido a seu vasto espectro de hospedeiros e à localização frequente de genes de resistência em elementos conjugativos como plasmídeos e transposons. A capacidade de transferência de genes entre membros da população bacteriana permite a disseminação da resistência entre bactérias patogênicas, entre bactérias comensais, e entre essas duas populações. A resistência bacteriana pode ocorrer por mutações (deleções, inserções ou mutações de ponto), propagação clonal ou por transferência horizontal de genes de resistência localizados em vários tipos de elementos genéticos móveis (CHAMBERS, 1997).

O processo de conjugação requer contato físico, bactéria-bactéria, em que uma das células, a doadora, transfere através de fímbria ou pilus sexual o material genético a outra, chamada receptora. As bactérias possuem um único cromossomo circular, disperso pelo citoplasma, composto de DNA (cadeia dupla) que contém informações, incluindo as indispensáveis à vida da célula (ANDREWS et al., 2008). Além do DNA cromossômico, as células bacterianas podem conter pequenas moléculas circulares de DNA denominadas plasmídeos. Ao receber o material genético sob a forma de plasmídeos que pode conter genes determinantes de resistência (plasmídeos R), a bactéria receptora a partir desse momento pode expressar uma nova característica, tornando-se resistente. Pode ainda conjugar com outra

bactéria, atuando agora como doadora, pois junto com genes de resistência, ela recebe genes conjugativos (plasmídeos F), permitindo então repetir o processo (AARTS et al., 2001). Quando possuem mais de um determinante de resistência, esses elementos podem transferir resistência múltipla para vários antimicrobianos, caracterizando os microrganismos como multirresistentes (ACAR, 2001; SALISBURY et al., 2002).

Os plasmídeos podem estar integrados no cromossomo, sendo capazes de transferir genes cromossômicos. Os plasmídeos replicam-se independentes do cromossomo, carregam genes que não são essenciais para a vida das bactérias e podem ser transferidos por conjugação, de uma bactéria para outra. A transferência de fragmentos de DNA cromossômico e de plasmídeos é altamente disseminada nos procariotos, sendo uma das causas da diversidade genética observada nas bactérias (TENOVER, 2006).

A transformação é um processo no qual há lise de determinado microrganismo com liberação de seu material genético para o meio, dessa forma, outra bactéria é capaz de captar esse DNA incorporando-o ao seu genoma. A transdução envolve a incorporação de DNA bacteriano cromossômico ou plasmidial por um bacteriófago durante seu processo de infecção celular. Após a lise celular, esse bacteriófago atua então como um vetor e ao infectar nova célula pode introduzir o DNA contendo o gene de resistência, tornando-a resistente à determinada droga. Ocorre somente entre bactérias de uma mesma espécie e exerce papel importante na transferência de plasmídeos R (resistência) entre *S. aureus* (AARESTRUP, 2005; SAKWINSKA et al., 2011). No processo de transposição, os genes são transferidos dentro de uma mesma célula por intermédio dos transposons (DNA). Estes segmentos podem se auto transferirem de uma molécula de DNA para outra (CHAMBERS, 1997).

A pressão seletiva do antimicrobiano favorece a seleção e manutenção de bactérias resistentes (COOKSEY, 1998). A resistência aos antimicrobianos observada em patógenos de animais tem duas implicações importantes. A primeira diz respeito à redução das taxas de cura da doença e a segunda refere-se ao potencial de bactérias resistentes transferirem resistência a bactérias susceptíveis (TENOVER, 2006). A habilidade bacteriana de mobilizar genes e a pressão seletiva promovida pelos antimicrobianos facilita a distribuição de genes de resistência através das populações microbianas. A transferência de genes de resistência e a manutenção de bactérias resistentes no ambiente são favorecidas, particularmente, pela presença de antimicrobianos em concentrações subterapêuticas durante um longo período de tempo (PIDDOCK et al., 1998; SALYERS, 2002).

Tendências temporais de susceptibilidade antimicrobiana de patógenos causadores de mastite têm sido descritos em vários países. Uma análise retrospectiva foi feita por Erskine et

al. (2002), onde foram analisadas 2778 amostras enviadas para um laboratório de Michigan, EUA, de 1994 a 2000. Esses autores relataram que não houve mudanças significativas na susceptibilidade para a maioria das espécies examinadas. Observaram um aumento na proporção de isolados de *S. aureus* susceptíveis à ampicilina, penicilina e eritromicina. Em relação à penicilina, a porcentagem dos isolados de *S. aureus* susceptíveis passou de 38,4% em 1994 para 60,9% em 2000. Dados semelhantes foram encontrados por Makovec e Ruegg (2003), que realizaram um estudo com 8.905 isolados bacterianos obtidos a partir de amostras de leite enviadas para o estado de Wisconsin, EUA, entre 1994 e 2001. Não foram observadas alterações significativas de susceptibilidade antimicrobiana para a maioria dos patógenos testados, porém a susceptibilidade de *S. aureus* à penicilina aumentou de 51 para 70%.

2.6 *Staphylococcus aureus* RESISTENTE À METICILINA (MRSA)

Logo após a criação da meticilina, um beta-lactâmico sintético resistente à ação das beta-lactamases, foi descrito por Jevons (1961), o primeiro caso de resistência a esse antimicrobiano em *S. aureus*. Os estafilococos resistentes à oxacilina, análogo à meticilina são resistentes a todos os antimicrobianos beta-lactâmicos atualmente disponíveis, o que dificulta o tratamento contra infecções estafilocócicas. Nas últimas décadas, tem-se observado a emergência desses microrganismos resistentes, dentre os quais se destaca *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA – Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*). Essas linhagens são comumente relatadas em humanos, entretanto, nos últimos anos, há registros de aumento de casos de infecções em animais domésticos (; MIDDLETON et al., 2005; RICH et al., 2005).

A tipagem molecular ou genotipagem é essencial para determinar a fonte de transmissão, avaliar o padrão de transmissão na emergência da resistência e estudar a evolução e organização molecular de bactérias resistentes. A técnica de PCR (*Polimerase Chain Reaction*) é necessária para confirmação da resistência para meticilina, após detecção da resistência à oxacilina *in vitro*. A genotipagem permite distinguir entre a disseminação clonal da resistência ou a disseminação horizontal e é usada para monitorar a distribuição global de bactérias resistentes (AARTS et al., 2001). Dois tipos de resistência à oxacilina podem ser observados em *S. aureus*.

A resistência clássica, ou intrínseca, é determinada pela presença do gene *mecA* localizado no cromossomo bacteriano. Esse gene é responsável pela síntese de proteínas

ligadoras de penicilina (PBPs) alteradas, conhecidas como PBP2a ou PBP2', ("ProteinBindingPenicilin"), que possuem baixa afinidade com os beta-lactâmicos, chamada de PBP2 ou PBP2^a, resistentes as penicilinas, presente na membrana que ao substituírem outras PBPs acabam conferindo baixa afinidade tanto à oxacilina, quanto à outros antimicrobianos beta-lactâmicos (CHAMBERS, 1997).

O outro tipo de resistência é a *borderline*, ou intermediária, ocorre quando isolados de *S. aureus* que apresentam susceptibilidade reduzida à meticilina/oxacilina produzem uma grande quantidade de beta-lactamases. A resistência *borderline* pode ocorrer também devido às modificações nas PBPs 1, 2 e 4 (ACAR, 2001; MATHEW et al., 2007). A beta-lactamase está incluída entre os principais mecanismos de resistência aos beta-lactâmicos, drogas frequentemente usadas para o tratamento de infecções intramamárias. Essa enzima age no anel beta-lactâmico, provocando a hidrólise e a inativação do antibiótico. Ela é usualmente encontrada em isolados *Staphylococcus* spp. (AARESTRUP, 2005; MATHEW et al., 2007)

2.7 PROGRAMAS DE MONITORAMENTO E VIGILÂNCIA DA RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

Há uma grande preocupação internacional a respeito do risco da transferência de bactérias resistentes entre animais e o homem e da transferência de genes de resistência de bactérias de animais para patógenos humanos. O risco de aquisição de bactérias resistentes ocorre via cadeia alimentar, mas pode ser maior para os indivíduos que estão em estreito contato com os animais ou seus produtos, como os trabalhadores rurais, fazendeiros, veterinários, ou trabalhadores que manuseiam os produtos de origem animal no ambiente da indústria (BARLOW, 2011). Assim, a ocorrência de resistência aos antimicrobianos em um país é hoje um problema para todos os países. Isto tem enfatizado a necessidade de iniciativas globais e o estabelecimento de sistemas de monitoramento para determinar a ocorrência de resistência em todos os países. No entanto, a maioria dos relatórios são baseados em estudos de investigação, e são severamente dificultados pela falta de seleção critérios epidemiológicos adequados e são baseados principalmente em isolados patogênicos de animais clinicamente doentes e talvez medicados. Por conseguinte, é muito difícil e às vezes impossível comparar resultados de estudos realizados em diferentes países ou em tempos diferentes (BAGER, 2000).

A informação sobre a ocorrência de resistência é necessário a nível local, regional e internacional para orientar e detectar alterações que requerem estratégias de intervenção. Para cumprir estes requisitos, sistemas de monitoramento contínuo das mudanças na ocorrência de resistência são necessários para otimizar estratégias de tratamento e controlar o aparecimento e aumento da resistência antimicrobiana (AARESTRUP, 2004). O primeiro programa sistemático de monitoramento do emprego de antimicrobianos e da resistência antibacteriana de bactérias isoladas de animais, de alimentos e do homem foi estabelecido na Dinamarca, em 1995 (AARESTRUP, 2004; HAMMERUM et al., 2007). Outros já foram estabelecidos em vários países, entre eles, Alemanha, Bélgica, Espanha, Estados Unidos, França, Hungria, Japão, Reino Unido e Suécia (HENDRIKSEN et al., 2008)

Os programas requerem o uso de metodologias padronizadas, para que se possam comparar resultados obtidos em diferentes laboratórios, regiões ou países. Na Europa, a Suécia e a Dinamarca foram os primeiros países a estabelecer programas de controle de uso de antimicrobianos na produção animal (DEHAUMONT, 2004; OIE, 2008a).

Para os testes de susceptibilidade antimicrobiana, é recomendado seguir a padronização do *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI, anteriormente NCCLS) para bactérias isoladas de animais, e adotar os critérios de controle de qualidade recomendados (CLSI, 2008). Um método muito empregado para avaliar a susceptibilidade aos antimicrobianos é a difusão do antibiótico em camada de ágar a partir de discos de papel de filtro (disco difusão). Entretanto, esse método pode ser influenciado pela quantidade do antimicrobiano nos discos, densidade do gel de ágar, difusibilidade do agente em solução aquosa, força iônica da composição do meio de cultura, profundidade do ágar e a concentração da suspensão bacteriana usada como inóculo. É necessária, ainda, a inclusão de bactérias de referência como *S. aureus* ATCC 25923 e ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, para garantir a validade e a qualidade dos resultados. Os passos referentes ao isolamento e identificação dos agentes da mastite também necessitam ser padronizados (OIE, 2008b).

Além do monitoramento, muitos programas contemplam a pesquisa genética para definir as bases da resistência, contribuindo para avaliação dos riscos da disseminação de resistência de bactérias dos animais para o homem (AARESTRUP, 2004). Entre as bactérias patogênicas, são monitorados *S. aureus* e *Staphylococcus* coagulase negativa isolados de mastite bovina (CAPRIOLI et al., 2000; AARESTRUP, 2004).

CAPÍTULO 2 - ISOLAMENTO E PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE PATÓGENOS CAUSADORES DE MASTITE

RESUMO

Os objetivos do presente estudo foram: a) avaliar a frequência de isolamentos de patógenos causadores de mastite em rebanhos leiteiros comerciais; b) determinar a susceptibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. isolados de casos de mastite subclínica c) avaliar o perfil de multirresistência de *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. d) detectar o gene *mecA* em *Staphylococcus* spp. resistentes a oxacilina/meticilina. Foram selecionados para o presente estudo 13 rebanhos leiteiros a partir de um total de 60 rebanhos vinculados a um laticínio da região de Pirassununga/SP. Após a seleção dos rebanhos, 1069 amostras de leite compostas foram coletadas durante 24 meses, em quatro períodos para realização de cultura e identificação dos patógenos, testes de susceptibilidade antimicrobiana e detecção do gene *mecA*. Os testes de susceptibilidade foram realizados em todos os isolados de *Staphylococcus* spp. e em 50% de *Streptococcus* spp. selecionados aleatoriamente. Os antimicrobianos testados foram: ampicilina 10 mg; clindamicina 2 µg, penicilina 1 mg; ceftiofur 30 µg; gentamicina 10 mg; sulfatrimetropin 25 µg, enrofloxacin 5µg; sulfonamida 300 µg, tetraciclina 30 µg; oxacilina 1 mg; cefalotina 30 µg e eritromicina 5 µg. Todos os isolados de *Staphylococcus* spp. que apresentaram resistência a oxacilina/meticilina foram avaliados quanto à presença do gene *mecA*. Entre os isolados, *Staphylococcus* coagulase negativa foi o mais prevalente (28,6%), seguido por *S. aureus* (27,8%) e *Corynebacterium* spp. (10,9%). A susceptibilidade antimicrobiana dos isolados de *S. aureus* foi de 95,23% (eritromicina), 93,33% (cefalotina) e 65,71% (ampicilina). A susceptibilidade antimicrobiana dos isolados de *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN) foi de 93,33% (cefalotina), 89,91% (eritromicina) e 62,03% (ceftiofur). Entre os isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP), a susceptibilidade antimicrobiana foi de 93,33% (eritromicina), 91,11% (clindamicina e sulfonamida). A susceptibilidade antimicrobiana dos isolados de *Streptococcus agalactiae* foi de 38,46% (ampicilina) e 50% (sulfatrimetropin) e os isolados de *S. dysgalactiae* apresentaram susceptibilidade à tetraciclina de 19,44% e a clindamicina de 47,22%. A multirresistência foi maior entre os isolados de SCN (20,3%) e *S.aureus* (15,7%). Não foi detectado o gene *mecA* em nenhum dos isolados de *Staphylococcus* spp. Os microrganismos mais frequentemente isolados foram *Staphylococcus* coagulase negativa e *S. aureus*. Os testes de susceptibilidade realizados para as espécies de *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. apresentaram alta susceptibilidade para a maioria dos antimicrobianos testados. Com exceção de *Streptococcus agalactiae* para ampicilina e sulfatrimetropin e os isolados de *S. dysgalactiae* para tetraciclina e clindamicina. A maioria dos *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. não apresentaram perfil de multirresistência. Nenhum dos isolados de *Staphylococcus* spp. fenotipicamente resistentes a oxacilina/meticilina apresentaram o gene *mecA*.

Palavras-chave: Mastite bovina., MRSA., Susceptibilidade antimicrobiana

ABSTRACT

The aims of this study were: a) to evaluate the frequency of mastitis pathogens in dairy herds, b) to determine the antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* spp. and *Streptococcus* spp. c) to evaluate the profile of multidrug resistance of *Staphylococcus* spp. and *Streptococcus* spp. d) Find the *mecA* gene in *Staphylococcus* spp. resistant to oxacillin / methicillin. Thirteen herds were selected from approximately 60 dairy farms in the region of Pirassununga / SP. After the farms selection and the application of the questionnaires, 1069 composite samples of milk from all herds were collected for culture and identification of pathogens, susceptibility testing and *mecA* gene detection, over 24 months in four periods. The susceptibility tests were performed on all isolates of *Staphylococcus* spp. and in 50% of *Streptococcus* spp. The antimicrobials tested were ampicillin 10 mg; 2 µg clindamycin, penicillin 1 mg; ceftiofur 30 µg; gentamicin 10 mg; sulfatrimetropin 25 µg, 5 µg enrofloxacin; 300 µg sulfonamide, tetracycline 30 µg; oxacillin 1 mg; 30 µg cephalothin and erythromycin 5 µg. All *Staphylococcus* spp. that were resistant to oxacillin susceptibility tests were investigated for the presence of *mecA* gene. Among the bacteria isolated CNS was the most prevalent (28.6%), followed by *S. aureus* (27.8%) and *Corynebacterium* spp. (10.9%). The antimicrobial susceptibility of isolates of *S. aureus* was 95.23% (erythromycin), 93.33% (cephalothin) and 65.71% (ampicillin). The antimicrobial susceptibility of isolates of coagulase-negative *Staphylococcus* (CNS) was 93.33% (cephalothin), 89.91% (erythromycin) and 62.03% (ceftiofur). Among strains of coagulase positive *Staphylococcus* (CPS), the antimicrobial susceptibility was 93.33% (erythromycin), 91.11% (clindamycin and sulfonamide). The antimicrobial susceptibility of the strains of *Streptococcus agalactiae* was 38.46% (ampicillin) and 50% (sulfatrimetropin) and isolates of *S. dysgalactiae* were susceptible to tetracycline and clindamycin (19.44% to 47.22%). The multidrug resistance was higher among isolates of CNS (20.3%) and *Staphylococcus aureus* (15.7%). The *mecA* gene was not detected in any of *Staphylococcus* spp isolates. The results indicated that the most common microorganisms isolated were coagulase-negative *Staphylococcus* and *S. aureus*. The susceptibility tests performed for the species of *Staphylococcus* spp. and *Streptococcus* spp. demonstrated high susceptibility to most antimicrobials tested. With the exception of *Streptococcus agalactiae* to ampicillin and sulfatrimetropin and isolates of *S. dysgalactiae* tetracycline and clindamycin that showed low susceptibility. Most *Staphylococcus* spp. and *Streptococcus* spp. did not show multidrug resistance profile. None of *Staphylococcus* spp. phenotypically resistant to oxacillin / methicillin showed the *mecA* gene.

Keywords: Bovine mastitis., MRSA., Antimicrobial susceptibility

3 INTRODUÇÃO

Os antimicrobianos são usados extensivamente em sistemas de produção de leite para o tratamento e controle de doenças infecciosas. Estas substâncias são administradas via intramamária ou sistêmica para diminuir a incidência e a duração de infecções do úbere nos rebanhos leiteiros. Os antimicrobianos mais utilizados para o tratamento e prevenção de doenças em vacas leiteiras são penicilina, estreptomicina, cefalosporina, e tetraciclina (OLIVER; MURINDA, 2012).

A mastite é a razão mais frequente para o uso de antimicrobianos em rebanhos leiteiros. Ainda que o controle desta enfermidade seja fundamentado na adoção de medidas higiênico-sanitárias, a antibioticoterapia possibilita a redução das infecções intramamárias e consequentemente a redução de fontes de infecção (ERSKINE et al., 2003). Uma variedade de agentes patogênicos causadores de mastite é isolada em vacas leiteiras, entre os quais *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulase negativa*, *Streptococcus spp.*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* (PIEPERS et al., 2007; RIEKERINK et al., 2008). Desta forma, a utilização de cultura microbiológica e testes de susceptibilidade antimicrobiana *in vitro* são medidas recomendadas para o estabelecimento de tratamentos de mastite (SCHWARZ et al., 2010).

A resistência antimicrobiana de patógenos causadores de mastite em vacas leiteiras tem sido documentada em vários países (OWENS et al., 1997; ERSKINE et al., 2002; MAKOVEC; RUEGG, 2003; PITKALA et al., 2004). No entanto, não há evidências científicas que demonstrem que se trata de um fenômeno emergente (ERSKINE et al., 2004; OLIVER et al., 2011). Os estudos mais frequentes de susceptibilidade antimicrobiana em isolados de mastite foram realizados em *Staphylococcus aureus* (DE OLIVEIRA et al., 2000; GENTILINI et al., 2000; EL BEHIRY et al., 2012; HARAN et al., 2012). Infecções intramamárias causadas por *S. aureus* podem resultar em mastites clínicas ou subclínicas e são usualmente associadas à alta contagem de células somáticas (CCS). *S. aureus* está entre os principais microrganismos causadores de mastite e é considerado um importante patógeno por ser resistente a diversos antimicrobianos utilizados para o tratamento desta doença, principalmente antimicrobianos do grupo beta-lactâmicos (MOON et al., 2007).

Os beta-lactâmicos se ligam a proteínas que participam da síntese da parede celular, chamadas PBPs (proteínas ligadoras de penicilina), o que impede a formação da parede celular e resulta em lise bacteriana. O mecanismo de resistência à meticilina está relacionado ao desenvolvimento de uma PBP adicional, a PBP2a, que não tem afinidade por antimicrobianos beta-lactâmicos. A codificação dessas novas PBPs, que torna os *S. aureus*

resistentes à oxacilina, está relacionada à aquisição do gene *mecA*. Esse gene é parte integrante de um elemento genômico denominado "cassete cromossômico estafilocócico *mec*" (SCC*mec*) (CHAMBERS, 1997).

No Brasil, diversos estudos têm determinado os padrões de susceptibilidade antimicrobiana de agentes patogênicos da mastite (FREITAS, 2005; SANTOS 2006; NADER FILHO, 2007; MEDEIROS et al., 2009), porém poucos avaliaram os padrões de susceptibilidade e a presença do gene *mecA* em *S. aureus*. Portanto, os objetivos do presente estudo foram determinar a prevalência e o perfil de susceptibilidade dos principais patógenos causadores de mastite frente aos antimicrobianos e sua multirresistência, e determinar a ocorrência do gene *mecA* em amostras de *S. aureus* resistentes a meticilina-oxacilina (MRSA).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAIS E SELEÇÃO DE REBANHOS

A seleção dos rebanhos foi realizada a partir da caracterização de fazendas leiteiras de Pirassununga/SP e região, a partir do conjunto de 60 rebanhos leiteiros vinculados a um laticínio captador de leite. Considerou-se, ainda, a disponibilidade e o interesse do proprietário em participar do estudo, e também a distância (máxima 80 km) entre as propriedades e o laboratório para realização das análises.

Foram levantados os dados de produção de leite e o número de vacas em lactação para determinar o número de rebanhos a serem amostrados. O total de rebanhos selecionados foi baseado no número de amostras necessárias para estimar a frequência de resistência antimicrobiana de *Staphylococcus* spp. (*S. aureus* e *S. coagulase* negativa). Foram considerados para esse cálculo a variação da prevalência de 1 a 50%, com base em resultados de prevalência descritos por Langoni et al. (1991), Costa et al. (1995), Brito e Brito (1996), Brito et al. (1999). A amostragem definida atendeu aos requisitos descritos pela OIE (2008b).

Uma vez definida a população e o número de rebanhos a serem amostrados, 13 rebanhos foram escolhidos de forma aleatória para coleta de amostras de leite. As propriedades sorteadas localizaram-se nos municípios de Leme, Santa Rita do Passa Quatro, Descalvado, São João da Boa Vista e Pirassununga. O número de amostras de leite coletadas por rebanho está descrito na tabela 1 e variou de acordo com o número de vacas em lactação (GRAAT; FRANKENA, 1997).

Tabela 1 - Amostragem dos rebanhos de acordo com o número de vacas em lactação

Vacas em lactação	Frequência dos rebanhos	n de rebanhos selecionados	n de vacas a serem coletadas	n esperado de amostras leite por coleta
10-19	29	6	Todas	72
20-29	13	3	Todas	73
30-39	8	2	Todas ou 30 se > 30	60
40-49	2	0	-	0
50-60	4	1	30 (sorteio)	30
>60	4	1	30 (sorteio)	30
Total	60	13	-----	265

Na primeira visita, os proprietários foram convidados a participar do projeto e um questionário foi aplicado em cada propriedade para coleta de dados e futuras análises sobre possíveis fatores de risco e associações entre as práticas de tratamento utilizadas e a susceptibilidade antimicrobiana. Após a primeira visita, foram realizadas quatro coletas em períodos diferentes (janeiro/2010; agosto/2010; janeiro/2011 e julho/2011).

4.2 COLETA DE LEITE E PREPARO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE

A coleta de leite foi realizada de forma asséptica ao início de cada ordenha de cada quarto mamário, por meio de ordenha manual, para compor uma amostra representativa dos quatro quartos mamários de cada vaca selecionada. Cada amostra foi coletada diretamente em tubo esterilizado (40 mL), e imediatamente acondicionada em caixa térmica à 4° C e transportada até o Laboratório de Qualidade do Leite do Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (VNP-FMVZ/USP), onde foram armazenadas a – 20° C até a realização das análises.

4.3 CULTIVO MICROBIOLÓGICO E IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA

O procedimento de cultivo microbiológico e identificação de patógenos seguiu a metodologia proposta por NMC (2004). Para o isolamento primário dos microrganismos, foram semeados aproximadamente 10 µL de leite em ágar sangue ovino 5%, em placas de Petri estéreis (90x15 mm), com auxílio de uma alça de platina calibrada. As placas foram incubadas a 37°C, e realizadas leituras após 24 e 48 horas. As bactérias foram identificadas com base na morfologia das colônias, sendo observadas as características de crescimento como tamanho, tipo, coloração e produção de hemólise. Os cultivos foram classificados como bacteriologicamente positivos pela presença de três ou mais colônias idênticas. Cada isolado bacteriano foi submetido a exame microscópico, após coloração de Gram, para a identificação dos grupos de microrganismos.. Para cocos Gram-positivos, os testes de catalase foram realizados para distinguir catalase negativa (*Streptococcus* spp.) e catalase positiva (*Staphylococcus* spp.). Estafilococos foram divididos em dois grupos com base no teste da coagulase: *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP) e *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN). Os SCP foram ainda subdivididos em dois grupos pelo teste de Voges-Proskauer (prova da acetoina) e classificados da seguinte forma: *Staphylococcus aureus* (acetoina positiva) e *Staphylococcus* coagulase positiva (acetoina negativa). Estreptococos foram

identificados por meio dos testes de CAMP (*Christie, Atkins e Munch-Petersen*), esculina, bile esculina, NaCl 6,5%, e teste de hidrólise de hipurato. Para microrganismos Gram-negativos foram realizados os seguintes testes bioquímicos: Citrato; Oxidase (Probac, São Paulo, Brasil); Fermentação/Oxidação; Uréia; Nitrito; Indol e Motilidade em meio Sulfeto Indol Motilidade (SIM); produção de gás sulfídrico (H₂S), fermentação de glicose, sacarose e lactose, e produção de gás em Ágar *Triple Sugar Irion* (TSI). Foram utilizadas ainda amostras para controle de qualidade das culturas microbiológicas: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619.

4.4 CRIOPRESERVAÇÃO DOS ISOLADOS BACTERIANOS

Após identificação, os isolados bacterianos foram mantidos em caldo BHI com 20% de glicerol em tubos criogênicos a -20°C para posterior avaliação da susceptibilidade antimicrobiana e determinação do gene *mecA*.

4.5 TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA

Os testes de susceptibilidade antimicrobiana foram realizados de acordo com CLSI (2008) em todos os isolados de *Staphylococcus* spp. (*S. aureus*, SCN, SCP) e em 50% dos isolados de *Streptococcus* spp. (*S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* e *S. esculina* positiva) selecionados de forma aleatória.

Para o preparo dos inóculos foram utilizadas culturas em caldo BHI (brain hearth infusion), previamente incubadas por 24 horas e posteriormente ajustadas com a turbidez da escala 0,5 de MacFarland. Uma vez ajustada a turbidez do inóculo, a semeadura foi feita por meio de *swab* estéril na superfície de ágar Mueller-Hinton. Os discos de antimicrobianos foram depositados sobre o meio com auxílio de um dispensador (OXOID, Basingstoke, Inglaterra). As placas foram incubadas à 35°C e a leitura dos halos de inibição foi realizada após 18 horas de incubação. A cepa *S. aureus* ATCC 25923 foi utilizada como controle do teste. As zonas de inibição do crescimento (diâmetro) foram medidas em milímetros. O diâmetro da zona foi relacionado com a susceptibilidade do isolado e a taxa de difusão da droga através do meio. Os diâmetros das zonas de inibição de cada antimicrobiano foram interpretados de acordo com os critérios do CLSI (2008).

Os antimicrobianos testados e suas respectivas concentrações foram os seguintes: ampicilina 10 µg; clindamicina 2 µg; penicilina 1 µg; ceftiofour 30 µg; gentamicina 10 µg;

sulfatrimetropin 25 µg; enrofloxacin 5 µg; sulfonamida 300 µg; tetraciclina 30 µg; oxacilina 1 µg; cefalotina 30 µg; eritromicina 5 µg (OXOID, *Basingstoke, Inglaterra*). Os antimicrobianos foram selecionados conforme a frequência de utilização no tratamento de infecção intramamária bovina no país (CLSI, 2008).

4.6 MULTIRRESISTÊNCIA

Os isolados foram classificados em multirresistentes quando estes apresentaram resistência a três ou mais classes de antimicrobianos.

4.7 DETERMINAÇÃO DE *S. aureus* RESISTENTES A METICILINA (MRSA)

Foram incluídos neste estudo, todos os isolados de *Staphylococcus* spp. que apresentaram resistência à oxacilina/meticilina no teste de disco difusão. Foram considerados resistentes todos aqueles que apresentaram halo ≥ 12 mm. As análises foram realizadas no laboratório de Microbiologia e Genética da Empresa Brasileira de Pesquisa em Gado de Leite (EMBRAPA) – Juiz de Fora, MG.

4.7.1 Extração do DNA

Para extração de DNA foi utilizada a técnica descrita por Rosec e Gigaud (2002), com modificações. O DNA foi extraído a partir de lise térmica. As bactérias foram cultivadas em 5mL de caldo BHI, seguindo-se incubação à 35°C por 24 horas. O volume de 1,0 mL da cultura foi centrifugado a 12.000 x g /10 minutos e o sobrenadante descartado. O sedimento foi suspenso em 500µL de 0,1 M Tris HCl / 0,05 M EDTA, seguindo-se centrifugação (12.000 x g/10 minutos), e descarte do sobrenadante. O sedimento foi ressuspenso em 200µL de 0,1 M Tris HCl / 0,05 M EDTA, e à suspensão foram adicionados 10µL de lisostafina (1mg/mL) e 8µL de lisozima. Esta suspensão foi homogeneizada e incubada à 37°C por 30 minutos.

Após a incubação foram adicionados 10 µL de proteinase K (20mg/mL), seguindo-se agitação da suspensão e incubação a 60°C por 20 minutos. Após, a mistura foi aquecida à 100°C por 10 minutos.

A suspensão obtida foi centrifugada à 12.000 x g /2 minutos e o sobrenadante transferido para novo micro tubo, e estocado à -20°C. A quantificação do DNA genômico foi

realizada pelo espectrofotômetro (*Nanodrop®* ND-1000 *Wilmington-Delaware, EUA*), utilizando uma concentração de DNA de 100mg/μL e empregando-se os comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm.

4.7.2 Reação de Amplificação

Para amplificação do fragmento de 533 pb do gene *mecA* foram utilizados os seguintes oligonucleotídeos iniciadores: 5' - AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C - 3' e 5' - AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C - 3'. As reações de PCR foram realizadas com volume final de 50 μL, contendo 13,2μL de água purificada; 2,5μL de tampão 10x; 2,0μL de MgCl₂ ; 1μL de dNTP; 2,5μL de cada oligonucleotídeo iniciador; 0,3μL de Taq DNA polimerase e 1 μL de DNA molde.

As reações foram realizadas em termociclador GeneAmp PCR/System 9700 (Applied Biosystems, California, EUA) submetidas a um ciclo inicial de 5 minutos à 95°C, seguida de 40 ciclos de amplificação (1 minuto a 95°C para desnaturação, 1 minuto a 55°C para anelamento, 1 minuto a 72°C), sendo finalizada com uma etapa de extensão de 5 minutos a 72°C.

4.7.3 Eletroforese em gel de agarose

Após a reação de amplificação, os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2% preparado em solução tampão 1,0 X TBE e corado com brometo de etídeo. O DNA foi corado em solução aquosa de Brometo de etídio e posteriormente fotografado sob transiluminação ultravioleta. O tamanho dos produtos amplificados foram comparados e foi verificado se as bandas obtidas no gel correspondiam ao tamanho das bandas de genes *mecA* descritos na literatura (533pb). Os Marcadores de peso molecular utilizados foram de 100 a 2000 pb (Bio Basic, Canada inc).

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos à análise estatística descritiva. Os testes de susceptibilidade foram determinados utilizando os pontos de interrupção recomendados pelo CLSI (2008). Os isolados que apresentaram susceptibilidade intermediária foram considerados resistentes. Os patógenos que apresentaram resistência a três ou mais classes de antimicrobianos foram classificados como multirresistentes (SCHWARZ et al., 2010).

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS REBANHOS

Dos rebanhos estudados, 77 % foram constituídos por vacas mestiças (Holandês x Gir, com diferentes graus de sangue), e 23% de animais da raça Holandesa. O número médio de vacas em lactação foi de 50 animais por rebanho, tendo o rebanho menor 11 vacas em lactação e o maior 90. A produção variou de 80 a 1000 litros/dia. As características de manejo e as práticas de controle de mastite foram bem diversificadas, sendo compostas por rebanhos que realizavam pré dipping (n=5) e pós dipping (n= 6), utilização de papel toalha antes da ordenha (n= 7), realização do teste de caneca (n=5), CMT (n=2). Rebanhos com ordenha manual (n=4), ordenha mecânica em sistema canalizado (n= 4) ou balde ao pé (n= 5), propriedades onde os animais eram ordenhados na sala de ordenha (n= 5) ou no próprio curral (n=8); e aquelas que mantinham o bezerro no momento da ordenha (n=10) e aquelas que não (n=3). Todos os rebanhos (n=13) possuíam assistência veterinária. Das 13 propriedades estudadas apenas 2 (15,3%) já tinham enviado amostras para realização de cultura microbiológica e antibiograma e 100% delas realizavam contagem mensal de CCS do tanque (n=13). Todas as propriedades possuíam tanque de expansão.

5.2 PREVALÊNCIA DOS PATÓGENOS

Das 1069 amostras de leite analisadas, 756 (70,7%) apresentaram crescimento bacteriano, e 313 (29,3%) foram negativas a cultura microbiológica. O microrganismo mais frequentemente isolado foi *Staphylococcus coagulase negativa* (SCN) (28,57%) seguido por *Staphylococcus aureus* (27,77%), *Corynebacterium* spp. (10,97%), *Streptococcus agalactiae* (8%), *S. dysgalactiae* (6,2%), SCP (6%), *Streptococcus* esculina positiva (3,2%), *Arcanobacterium* spp. (4,9%) e *Bacillus* spp. (2,5%) (Tabela 2).

Tabela 2 - Prevalência de agentes causadores de mastite isolados de amostras de leite compostas em rebanhos leiteiros na região de Pirassununga – São Paulo

	Nº de isolamentos	(%)
Número de amostras analisadas	1069	100
Número de culturas negativas	313	29,3
Número de culturas positivas	756	70,7
<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa	216	28,6
<i>Staphylococcus aureus</i>	210	27,8
<i>Corynebacterium</i> spp. ³	83	10,9
<i>Streptococcus agalactiae</i>	60	8
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	47	6,2
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	45	6
<i>Arcanobacterium</i> spp.	37	4,9
<i>Streptococcus</i> esculina positiva ²	24	3,2
<i>Bacillus</i> spp.	19	2,5
<i>Nocardia</i> spp.	8	1,1
<i>Prototheca</i> spp.	3	0,4
<i>Serratia</i> spp.	1	0,1
<i>Enterococcus</i> spp.	1	0,1
Leveduras	2	0,2

³*Corynebacterium* spp.: bactéria com características morfológicas e culturais de *C. bovis*.

²Este grupo inclui *S. uberis* (20) e *Streptococcus* esculina positiva não identificados até espécie (4).

5.3 SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE *Staphylococcus* spp. E *Streptococcus* spp.

Os antimicrobianos foram agrupados em categorias de acordo com as classes do princípio ativo: beta-lactâmicos, macrolídeos/lincosamidas; aminoglicosídeos, sulfonamidas; fluorquinolonas e outros (tetraciclina).

Entre os isolados (n = 1069), 542 testes de susceptibilidade foram realizados para os seguintes microrganismos: SCN (n = 216), *S. aureus* (n = 210), SCP (n = 45). *Streptococcus dysgalactiae* (n = 36), *S. agalactiae* (n = 26) e *S. esculina* positiva (n = 9) (Tabela 4).

A susceptibilidade antimicrobiana dos isolados de *Staphylococcus* spp. independente da espécie analisada ficou acima de 70% em todos os antimicrobianos testados, com exceção de ampicilina, ceftiofur e enrofloxacino, que variou de 62,03 % a 68,88% . A susceptibilidade de *S. aureus* foi de 65,71% para ampicilina, 71,42% para penicilina e 72,85% para ceftiofur. A susceptibilidade observada para: eritromicina foi de 95,23%, clindamicina 92,85%, cefalotina 93,33% e para tetraciclina 90,95%. Dos 216 SCN testados, os antimicrobianos que tiveram a susceptibilidade acima de 80% foram: cefalotina (93,33%), seguido por eritromicina (89,91%), clindamicina (88,42%), oxacilina (85,64%), sulfonamida (84,72%),

sulfatrimetropin (83,33%), e tetraciclina (80,09%). A susceptibilidade foi observada para ampicilina, ceftiofur e enrofloxacin foi abaixo de 70% (66,66%, 62% e 67,59%), respectivamente. Para os isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva, a susceptibilidade ficou acima de 90% para eritromicina (93,33%), clindamicina (91,11%) e sulfonamida (91,11%). Os demais antimicrobianos apresentaram a seguinte susceptibilidade: ceftiofur (66,66%), gentamicina (66,66%) e ampicilina (68,88%).

Dos 36 isolados de *Streptococcus dysgalactiae*, a susceptibilidade ficou acima de 80% para todos os antimicrobianos testados, exceto eritromicina (72,22%), clindamicina (47,22%) e tetraciclina (19,44%), 100% dos isolados foram susceptíveis a ceftiofur, gentamicina e sulfatrimetropin. A susceptibilidade dos 26 isolados de *S. agalactiae* ficou acima de 80%, exceto para ampicilina (38,46%) e sulfatrimetropin (50%), 100% dos isolados foram susceptíveis a cefalotina, ceftiofur, eritromicina, clindamicina, eritromicina e tetraciclina. Os outros isolados de estreptococos e que não foram identificados por espécie (n= 9) apresentaram susceptibilidade acima de 70%, exceto para clindamicina (66,66%) e tetraciclina (55,55%), 100% foram susceptíveis a oxacilina e cefalotina.

Tabela 3 - Distribuição da susceptibilidade "in vitro" de *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp., isolados de amostras de leite em rebanhos leiteiros da região de Pirassununga – São Paulo

		<i>Staph. aureus</i>		SCN		SCP		<i>Strep. dysgalactiae</i>		<i>Strep. agalactiae</i>		<i>Outros Strep.¹</i>	
		(n=210)		(n=216)		(n=45)		(n=36)		(n=26)		(n=9)	
Classe de antimicrobianos	Antimicrobianos	Nº testes	S (%)	Nº testes	S (%)	Nº testes	S (%)	Nº testes	S (%)	Nº testes	S (%)	Nº testes	S (%)
Beta-lactâmicos	Ampicilina	138	65,71	144	66,66	31	68,88	29	80,55	10	38,46	8	88,88
	Cefalotina	196	93,33	196	93,33	40	88,88	34	94,44	26	100	9	100
	Penicilina	150	71,42	163	75,46	35	77,77	32	88,88	21	80,76	8	88,88
	Oxacilina	185	88	185	85,64	40	88,88	33	91,66	22	84,61	9	100
	Ceftiofur	153	72,85	134	62	30	66,66	36	100	26	100	7	77,77
Macrolídeos/ Lincosamidas	Eritromicina	200	95,23	194	89,91	42	93,33	26	72,22	26	100	7	77,77
	Clindamicina	195	92,85	191	88,42	41	91,11	17	47,22	26	100	6	66,66
Aminoglicosídeos	Gentamicina	172	81,90	156	72,22	30	66,66	36	100	24	92,3	7	77,77
Sulfonamidas	Sulfonamida	180	85,71	183	84,72	41	91,11	34	94,44	24	92,3	7	77,77
	Sulfatrimetropin	176	83,80	180	83,33	35	77,77	36	100	13	50	7	77,77
Fluorquinolona	Enrofloxacina	176	83,80	146	67,59	32	71,11	33	91,66	24	92,3	7	77,77
Outros	Tetraciclina	191	90,95	173	80,09	33	73,33	7	19,44	26	100	5	55,55

¹Este grupo inclui *S. uberis* (2) e estreptococos esculina positiva não identificados até espécie (7).

5.4 MULTIRRESISTÊNCIA

A multirresistência foi atribuída a microrganismos que apresentaram resistência fenotípica a três ou mais classes de antimicrobianos. Os isolados de *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. foram agrupados em cinco perfis de multirresistência (não multirresistentes, resistentes a 3 classes, resistentes a 4 classes, a 5 classes ou a 6 classes) (Tabela 5).

Tabela 4 - Perfil de multirresistência de *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. isolados de amostras de leite em rebanhos leiteiros da região de Pirassununga – São Paulo

amostras de leite em recipientes fechados da região de Itapussulândia - São Paulo											
Patógeno	Perfil de multirresistência										
	NM ¹		3 classes		4 classes		5 classes		6 classes		Total
	N	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	
<i>S.aureus</i>	177	84,2	20	9,5	9	4,3	4	2	-	-	210
SCN	172	79,6	10	4,6	25	11,5	8	3,8	1	0,5	216
SCP	32	71	2	5	5	11	6	13	-	-	45
<i>S. agalactiae</i>	26	100	0	-	0	-	0	-	-	-	26
<i>S. dysgalactiae</i>	31	86	4	11	1	3	-	-	-	-	36
Outros estreptococos ²	7	77,7	-	-	1	11	1	11	-	-	9
Total	445		36		41		19		1		542

¹ NM= não multirresistentes (0-2 classes).

² Este grupo inclui *S.uberis* (2) e estreptococos esculina positiva (7).

A maioria dos microrganismos (82,1%) não apresentou perfil de multirresistência. Em relação a *S. aureus*, 15,7% dos isolados apresentaram multirresistência aos seguintes perfis: 3 classes (9,5%); 4 classes (4,3%) e 5 classes (2%). O microrganismo com maior percentual de multirresistência foi SCN (20,3%), com a seguinte distribuição de multirresistência (perfil 4 classes: 11,5%; perfil 3 classes: 4,6%; perfil 5 classes: 3,8% e perfil 6 classes: 0,5%). Entre os isolados de SCP 28,8% apresentaram multirresistência para os seguintes perfis: perfil 5 classes: 13%, perfil 4 classes: 11%, perfil 3 classes: 5%. *S. agalactiae* não apresentou multirresistência a nenhum dos perfis estudados. Dos isolados de *S. dysgalactiae* 13,8% foram multirresistentes e 22,22% isolados de outros estreptococos foram multirresistentes. Os isolados de *S. aureus* apresentaram multirresistência de 5,23% entre as combinações das classes beta-lactâmicos, fluorquinolonas e sulfonamidas. SCN apresentou percentual de 4,6% de multirresistência para as combinações de beta-lactâmicos, aminoglicosídeos, fluorquinolonas e sulfonamidas. Entre os isolados de SCP, 6,6% foi resistente para as

seguintes combinações de classes: beta-lactâmicos, aminoglicosídeos, sulfonamidas, fluorquinolonas e tetraciclinas. Entre os estreptococos testados, 8,3% dos isolados de *S. dysgalactiae* apresentaram multirresistência para as combinações: beta-lactâmicos, macrolídeos e tetraciclinas.

Tabela 5 - Distribuição da multirresistência de acordo com as combinações de classes de antimicrobianos de *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. isolados de amostras de leite em rebanhos leiteiros da região de Pirassununga – São Paulo

Classes de antimicrobianos	<i>S. aureus</i>	SCN ²	SCP ³	<i>S. agalactiae</i>	<i>S. dysgalactiae</i>	Outros estreptococos ⁴
amino, sulfa, tet ¹	1	-	-	-	-	-
amino, tet, macro	1	-	-	-	-	-
amino, beta, sulfa	2	-	-	-	-	-
amino, beta, flúor	1	-	-	-	-	-
beta, macro, tet	2	3	1	-	3	-
beta, fluor, sulfa	11	5	-	-	-	-
beta, amino, sulfa	-	-	1	-	-	-
beta, sulfa, tet	-	-	-	-	1	-
beta, macro, flúor	1	1	-	-	-	-
beta, sulfa, macro	1	1	-	-	-	-
beta, amino, fluor, tet	3	7	-	-	-	-
beta, amino, fluor, sulfa	1	10	3	-	-	1
beta, macro, sulfa, flúor	3	3	1	-	-	-
beta, macro, sulfa, tet	2	4	0	-	1	-
beta, amino, fluor, macro	-	1	0	-	-	-
amino, sulfa, fluor, tet	-	0	1	-	-	-
beta, amino, sulfa, fluor, macro	2	3	-	-	-	1
beta, amino, sulfa, fluor, tet	2	5	6	-	-	-
beta, amino, sulfa, fluor, tet, macro	-	1	-	-	-	-

¹(amino = aminoglicosídeos; sulfa = sulfonamidas; tet = tetraciclinas; macro = macrolídeos, beta = beta-lactâmicos; fluor = fluorquinolonas).

²SCN=*Staphylococcus* coagulase negativa.

³SCP= *Staphylococcus* coagulase positiva.

⁴ Este grupo inclui *S. uberis* (2) e estreptococos esculina positiva não identificados até espécie (7).

5.5 DETERMINAÇÃO DE *S. aureus* RESISTENTES A METICILINA (MRSA)

Dos 471 isolados de *Staphylococcus* spp., 61 (25 *S. aureus*, 31 *Staphylococcus* coagulase negativa e 5 *S. coagulase* positiva) apresentaram resistência fenotípica a oxacilina e foram testados quanto a presença do gene *mecA*. Os resultados de eletroforese do fragmento do gene *mecA* (533pb) de *Staphylococcus* spp. isolados de amostras de leite, em gel de

agarose 2%, realizada para três amostras com controles positivo e negativo estão representados na figura 1. Nenhum dos isolados pesquisados apresentou segmentos de DNA amplificados com tamanho semelhante ao esperado para o gene *mecA*. Apesar de duas amostras terem apresentado bandas próximas, quando comparadas ao produto obtido com os controles, observou-se que as mesmas migraram em posições acima destes.

Figura 1 - Eletroforese do fragmento do gene *mecA* (533pb) de *Staphylococcus* spp. isolados de amostras de leite, em gel de agarose 2%. (M= marcador de molecular; 1 e 2 = controle positivo; 3,4,5 = amostras testadas, 6 = controle negativo).

6 DISCUSSÃO

6.1 PREVALÊNCIA DOS PATÓGENOS

Os resultados do presente estudo foram baseados em uma análise de amostras compostas de leite coletadas durante um período de dois anos. Das 1069 amostras analisadas, 70,7% apresentaram crescimento bacteriano. Freitas et al. (2005) observaram no agreste do Estado de Pernambuco uma frequência de 59,3% de amostras positivas ao exame microbiológico em um total de 984 amostras de leite examinadas. Em outro estudo realizado por Oliveira et al. (2009) em rebanhos bovinos leiteiros nos Tabuleiros Costeiros de Sergipe, foi observada frequência aproximada ao do presente estudo, com 60,8% de amostras positivas de um total de 893 de amostras de leite submetidas ao exame microbiológico. Andrade et al. (2009) observaram o crescimento de microrganismos em 90,1% de um total de 1072 amostras provenientes de rebanhos da região metropolitana de Curitiba, Estado do Paraná.

Os patógenos do gênero *Staphylococcus spp.* foram o grupo predominante de bactérias isoladas neste estudo. Tais resultados são similares com estudos finlandeses e alemães (PITKALA et al., 2004; TENHAGEN et al., 2006). Recentemente, *Staphylococcus coagulase negativa* (SCN) tem sido identificado como um grupo de agentes patogênicos com crescente importância em termos de incidência de mastite bovina (BAL et al., 2010). No presente estudo, a prevalência de SCN foi de 28,7 %. Resultados semelhantes foram descritos por Bal et al., (2010) em que a taxa de isolamento de SCN foi de 31,22%, e inferiores a taxa encontrada por Pitkala et al., (2004) que encontraram SCN em 49,6% das amostras de leite analisadas.

Em relação à prevalência de *Staphylococcus aureus*, no presente estudo, o percentual de isolamentos foi de 27,8%. Em muitos países a prevalência de *S. aureus* e *S. agalactiae*, tem diminuído (PITKALA et al., 2004). SCN e *Corynebacterium bovis*, considerados patógenos secundários da mastite, tornaram-se mais prevalentes (MYLLYS et al., 1998; PITKALA et al., 2004). Pitkala et al. (2004) mostraram uma redução da prevalência de patógenos principais como *S. agalactiae* e *S. aureus* ao longo dos anos em rebanhos finlandeses. Entretanto, o *C. bovis* e *Staphylococcus coagulase negativa*, considerados microrganismos de menor patogenicidade, têm se tornado mais frequente em tais rebanhos.

Em um estudo realizado por Bal et al. (2010), a taxa de isolamento de SCN foi 31,22%, superior a obtida em amostras na argentina (13,6%) (GENTILINI et al., 2002). Segundo Gentilini et al. (2002), atualmente SCN têm recebido maior importância como

agentes causadores de infecções intramamárias em bovinos leiteiros em todo o mundo. A elevada proporção de SCN está em conformidade com outros dados publicados. Nos Estados Unidos, um estudo recente mostrou que uma média de 15% do rebanho foi infectada com SCN (SCHUKKEN et al., 2009), o mesmo patógeno também foi isolado com maior frequência na Finlândia (49,6%) e nos Estados Unidos (78,2%) (PITKALA et al., 2004; RAJALA-SCHULTZ et al., 2004), o que reforça a importância deste microrganismo nas infecções intramamárias.

No Brasil, *Staphylococcus* spp., seguidos dos *Streptococcus* spp. e *Corynebacterium bovis*, são citados como os principais microrganismos associados aos casos de mastite bovina (BRITO et al., 1999; MENDONÇA et al., 1999). Ferreira et al. (2007) descreveram o gênero *Staphylococcus* spp. como o mais prevalente (74,6%) em casos de mastite bovina na região de Teresina- Piauí. COSTA et al. (1995) também relataram que o principal agente etiológico nos casos de mastite bovina em propriedades nos Estados de São Paulo e Minas Gerais foi *Staphylococcus* spp. (34,09%), cuja frequência foi menor que a encontrada no presente estudo (62,3%). Na região do agreste do Estado de Pernambuco, Freitas et al. (2005), verificaram que os microrganismos mais comuns foram *Staphylococcus* coagulase negativa (36%), *Corynebacterium* spp. (34,8%) e *S. aureus* (13,6%). Oliveira et al. (2011), encontraram no estado do Pará, o percentual de 25% de *Staphylococcus* coagulase negativa, 16,7% de *Staphylococcus aureus*, 8,3% de *Streptococcus* spp. e de *Corynebacterium* spp.

Corynebacterium spp. foi o terceiro patógeno mais isolado no presente estudo (10,9%). Barbalho e Mota, (2001) relataram que os *Staphylococcus* spp. corresponderam à 38,76% do total de agentes isolados, e o gênero *Corynebacterium* spp. foi isolado com frequência relativamente alta (27,91%) nos casos estudados. Brito et al. (1999) relataram maior prevalência para *Corynebacterium* spp. (55,2%) como agente etiológico de mastite bovina em rebanhos localizados na Zona da Mata e Campo das Vertentes do Estado de Minas Gerais. Outro estudo realizado por Souza et al. (2009), também evidenciaram a alta prevalência de *Corynebacterium* spp. (30,2%) em rebanhos no estado de Minas Gerais e Rio de Janeiro. Características epidemiológicas das infecções causadas por *Corynebacterium* spp. têm sido relacionadas com a ausência ou a ineficiência do processo de desinfecção de tetos após a ordenha (BEXIGA, 2005). *C. bovis* é causa de infecções subclínicas e é considerado por alguns autores um microrganismo comensal da glândula mamária (PITKALA et al., 2004). Entretanto, a sua elevada prevalência em infecções intramamárias e a sua influência negativa na produção leiteira sugerem que talvez seja mais apropriado não considerá-lo como um patógeno secundário (ZAFALON et al., 2007).

Ainda em relação aos patógenos Gram-positivos, no presente estudo *Streptococcus spp.* apresentaram frequência de 17,4% (131/756) nas amostras analisadas, Souza et al. (2009) verificaram em 13,4%. Medeiros e Souza (2009) relataram a presença de 6 % para *S. agalactiae* e apenas 2% para *S. dysgalactiae* na região de Cerqueira Cesar - SP. Segundo Santos et al. (2007) *S. agalactiae* apresenta maior capacidade de sobreviver e de se multiplicar em sítios extra mamários. Além disso, um estudo realizado por Souza et al. (2009), demonstrou um aumento de CCS causada principalmente por este microrganismo. Quanto à mastite ambiental causada pelas demais espécies de estreptococos, destaca-se *S. dysgalactiae*, que apresentou prevalência de 6,2% neste estudo. Estes microrganismos são importantes na epidemiologia da mastite, uma vez que podem causar tanto mastite ambiental, quanto mastite contagiosa, como é o caso de *Streptococcus dysgalactiae*.

6.2. SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE *Staphylococcus spp.* E *Streptococcus spp.*

No presente estudo o percentual de susceptibilidade antimicrobiana foi acima de 60% em todos os isolados de *Staphylococcus spp.* como já apontado em estudos anteriores em vários países (ERSKINE et al., 2002; BENGTSSON et al., 2009). Outros estudos também têm encontrado níveis mais altos de susceptibilidade em países como a Dinamarca e Noruega, onde tem sido mantida uma política rigorosa sobre o uso de antimicrobianos em práticas veterinárias (PITKALA et al., 2004). Estes resultados estão de acordo com outros estudos que vêm documentando uma diminuição da emergência de resistência antimicrobiana nos últimos anos (BARLOW, 2011).

E relação à susceptibilidade de *S. aureus* no presente estudo, 71,42%, foram susceptíveis à penicilina e 65,71%, à ampicilina. Estudos sobre a susceptibilidade a antimicrobianos de *S. aureus* isolados de rebanhos brasileiros tem apresentado resultados variados. Os percentuais em rebanhos do Estado de São Paulo relatados por Langoni et al. (1991) e Nader Filho et al. (1992) foram, respectivamente, 23,1 e 15,2% para ampicilina e 13,7% e 1,7% para penicilina. Situação semelhante, com baixa porcentagem de susceptibilidade, foi relatada por Costa et al. (2000), em 45 *Staphylococcus spp.* isolados do parênquima mamário. Menos de 20% dos isolados foram susceptíveis à penicilina e à ampicilina. Zafalon et al. (2008) também encontraram baixa porcentagem de susceptibilidade à penicilina (20,7%).

Brito et al. (2001) avaliaram a susceptibilidade a antimicrobianos de 112 *S. aureus* isolados de 33 rebanhos da Zona da Mata de Minas Gerais. As bactérias foram susceptíveis à maioria dos antimicrobianos testados, apresentando resistência somente para penicilina/ampicilina (35%), tetraciclina e tilosina (7%). Rabello et al. (2005) relataram alta susceptibilidade entre 107 *S. aureus* isolados de nove rebanhos do Estado do Rio de Janeiro, com resistência somente para ampicilina/penicilina (55%), tetraciclina (7,4%) e eritromicina (2,8%). Os antimicrobianos pertencentes à classe dos beta-lactâmicos, que incluem penicilina e ampicilina são usados comumente em todo o mundo para tratamento de mastite. Portanto, são esperados níveis de susceptibilidade mais baixos para a classe de beta-lactâmicos, entre os isolados (BAL et al., 2010). No presente estudo, os estafilococos apresentaram susceptibilidade antimicrobiana para o grupo de beta-lactâmicos, com uma variação de 62 % a 68,88%. A susceptibilidade de *S. aureus* para eritromicina foi de 95,23%, para clindamicina 92,85%, cefalotina 93,33% e tetraciclina 90,95%. Machado et al. (2008) relatou baixa

susceptibilidade a vários antimicrobianos em 109 *Staphylococcus* coagulase negativa: ampicilina (15%), penicilina (7%), sulfonamidas (11%), novobiocina (11%), lincomicina (24%), canamicina (21%), estreptomicina (37%), eritromicina (39%) e oxacilina (19%). Situação diferente em comparação com o presente estudo, em que todos os SCN testados apresentaram susceptibilidade antimicrobiana acima de 80%: cefalotina (93,33%), seguido por eritromicina (89,91%), clindamicina (88,42%), oxacilina (85,64%), sulfonamida (84,72%), sulfatrimetropin (83,33%), e tetraciclina (80,09%). Dados semelhantes aos encontrados por Bal et al. (2010) que encontraram maior susceptibilidade à cloranfenicol (96%), tetraciclina (86%) e clindamicina (86%).

Diferenças de susceptibilidade antimicrobiana observadas para os aminoglicosídeos, macrolídeos e grupos de fluorquinolonas podem ter algumas explicações. Uma delas são as limitações no nível de rebanho e detecção de mastite clínica e subclínica (RUEGG; REINEMANN, 2002). A susceptibilidade antimicrobiana pode ser maior em isolados obtidos a partir de mastite subclínica, já que a maioria desses casos não passam por tratamentos. No entanto, Taponen et al. (2006) não detectaram nenhuma diferença entre as taxas de cura das espécies de SCN isoladas de casos clínicos e subclínicos.

Espécies de estreptococos são conhecidas por serem importantes patógenos causadores de infecções intramamárias bovinas (DENAMIEL et al., 2005). Vários estudos têm sido publicados sobre a susceptibilidade antimicrobiana de estreptococos isolados de mastite bovina (GUERIN-FAUBLEE et al., 2002; ROSSITTO et al., 2002; DENAMIEL et al., 2005; BAL et al., 2010). Entre os *Streptococcus spp.* isolados no presente estudo, a susceptibilidade foi acima de 70%, porém, duas exceções foram observadas: a baixa susceptibilidade de *Streptococcus dysgalactiae* frente a tetraciclina (19,4%) e a clindamicina (47,2%) e de *S. agalactiae* à ampicilina (38,4%). Duarte et al. (2004) estudaram as características de susceptibilidade antimicrobiana de *S. agalactiae* envolvidos em mastite bovina. Nenhum dos isolados foi susceptível à gentamicina. A susceptibilidade à tetraciclina e à eritromicina foram encontradas em 55,3% e 89,5% dos isolados, respectivamente. No presente estudo a susceptibilidade de *S. agalactiae* foi de 100% para tetraciclina e eritromicina e 80,76% para penicilina. Resultados semelhantes foram encontrados por Bal et al. (2010), a susceptibilidade à penicilina foi de 85% e aos observados por Denamiel et al. (2005) na Argentina que encontraram 100% de susceptibilidade à penicilina em isolados de *S. agalactiae* e 98% para *S. dysgalactiae*. No presente estudo, a susceptibilidade de *S. dysgalactiae* frente à penicilina foi de aproximadamente 90%. Porém, houve baixo percentual de susceptibilidade para tetraciclina (19,44%) e clindamicina (47,22%).

Guerin-Faubleee et al. (2002) também relataram baixa frequência de susceptibilidade à tetraciclina entre os *Streptococcus spp.* (58%). Apenas 9,5% dos *S. dysgalactiae* foram susceptíveis à tetraciclina em comparação com 78% dos *S. uberis* e 62,5% dos isolados de *S. agalactiae*. Já a susceptibilidade aos macrolídeos e/ou lincosamidas nos isolados testados, foi de 79% para eritromicina e 77% para lincomicina. Resultados semelhantes com os achados de Botrel et al. (2010). *S. dysgalactiae* mostrou baixa susceptibilidade à tetraciclina (35 - 42%) e aos macrolídeos e lincosamidas (5%). Estes resultados são semelhantes com resultados já publicados (ROSSITTO et al., 2002; HENDRIKSEN et al., 2008).

6.3 MULTIRRESISTÊNCIA

No presente estudo, a multirresistência foi atribuída aos patógenos que foram resistentes a três ou mais classes de antimicrobianos (SCHWARZ et al., 2010). Um total de 17,9 % dos isolados apresentaram multirresistência.

Medeiros et al. (2009) avaliaram o perfil de susceptibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus spp.* isolados de amostras de leite com mastite subclínica em três diferentes regiões de Pernambuco. Foram isolados 58,4 % de SCN, 28,9 % de *S. aureus* e 12,7% de SCP. De um total de 291 isolados, 181 foram considerados multirresistentes, e 18,3% foram resistentes a mais de oito antimicrobianos.

No presente estudo, SCN foi o microrganismo com maior percentual de multirresistência (20,3%), 22,7% foram resistentes a pelo menos quatro classes de antimicrobianos (beta-lactâmicos, fluorquinolonas, sulfonamidas e aminoglicosídeos). Entre os *S. aureus* isolados, 15,71% apresentaram multirresistência, dos quais 11 foram resistentes a três classes de antimicrobianos (beta-lactâmicos fluorquinolonas e sulfonamidas). *Streptococcus spp.* apresentaram baixo nível de multirresistência, 9,8% foram multirresistentes. A multirresistência foi maior para os isolados de *S. dysgalactiae* (19,2%).

Foi encontrada maior multirresistência neste estudo, quando comparado com resultados de outros autores. Oliveira et al. (2002) e Cardoso et al. (2000) não relataram qualquer multirresistência em *Staphylococcus spp.* isolados de amostras de leite de Pernambuco e Minas Gerais, respectivamente.

Nader Filho et al. (2007) pesquisaram a susceptibilidade antimicrobiana de 72 *S. aureus* isolados de amostras de leite em 10 propriedades rurais no estado de São Paulo e verificaram que todos os isolados foram resistentes a pelo menos 2 ou mais antimicrobianos. Sendo a maioria (48,6%) resistente à ampicilina e penicilina. Lange et al. (1999) em um

estudo com 66 isolados de *S. aureus* obtidos a partir de amostras de leite de vacas com mastite subclínica no sul de Brasil observaram resistência à penicilina e ampicilina em 43,9% dos isolados, avaliados individualmente ou em combinação com outros agentes antimicrobianos. Cento e um estafilococos coagulase positiva isolados de amostras de leite de vacas localizadas na área central da Argentina foram testados em 8 antimicrobianos; 47,5% foram resistentes à penicilina e ampicilina (CALVINHO et al., 2002).

Zafalon et al. (2008) isolaram 212 *S. aureus* obtidos de 58 fazendas leiteiras do estado de São Paulo para realização de testes de susceptibilidade e apenas uma amostra foi resistente a sete antimicrobianos e 33,8% foram susceptíveis a todos os antimicrobianos. No presente estudo, a susceptibilidade a todos os antimicrobianos testados foi de 82,1%. Resultados semelhantes foram obtidos por Aarestrup et al. (1995), que isolaram 105 *S. aureus* de mastite bovina na Dinamarca, e verificaram que 81% dos isolados foram susceptíveis a todos os antimicrobianos testados.

André et al. (2006) verificaram que, dentre *S. aureus* obtidos a partir de manipuladores, amostras de leite cru e queijo, 15,4% foram suscetíveis a todos os antimicrobianos testados (eritromicina, ciprofloxacina, tetraciclina, gentamicina, vancomicina, oxacilina e penicilina) e 25% foram resistentes a mais de um antimicrobiano.

Côrrea et al. (2005), isolaram um total de 95 *Staphylococcus* coagulase positiva de 635 amostras de leite com mastite provenientes de 72 fazendas de leite nos estados de Ceará, Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraíba, Paraná, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo, entre 2000 e 2003. Os isolados foram caracterizados em relação à resistência a 15 antimicrobianos. E 100% dos isolados foram multirresistentes, 33,6% apresentaram multirresistência entre 7 a 9 agentes antimicrobianos.

6.4 DETERMINAÇÃO DE *S. aureus* RESISTENTES A METICILINA (MRSA)

No presente estudo, todos os *Staphylococcus spp.* isolados que apresentaram resistência a oxacilina/meticilina pelo teste de susceptibilidade foram analisados quanto à presença do gene *mecA*. Foram incluídos para análise 25 *S. aureus*, 31 *Staphylococcus* coagulase negativa e 5 *S. coagulase* positiva. Foi verificado que nenhum dos isolados possuía o gene *mecA*. Resultados semelhantes foram obtidos por Pereira et al. (2009), em Portugal, 38% dos isolados de *S. aureus* apresentaram fenótipo de resistência para meticilina/oxacilina, porém em apenas 0,6 % dos isolados foi detectado a presença do gene *mecA* e Ciftci et al.

(2009) na Turquia, 22% dos isolados de *S. aureus* apresentaram resistência fenotípica à meticilina/oxacilina, e apenas 4 isolados foram positivos para o gene *mecA*

No presente estudo, testes adicionais não foram realizados, mas sugere-se que estes isolados possam ser hiperprodutores de beta-lactamases ou apresentarem mecanismos de resistência adicional, como sugerido também por Martineau et al. (2000). A explicação para o fato de algumas bactérias não possuírem o gene *mecA* porém apresentarem o fenótipo de resistência para os antibióticos beta-lactâmicos ou possuírem este gene e não apresentarem fenótipo de resistência, pode estar em um grupo de bactérias denominadas resistentes a meticilina *borderline* (ou com pequeno nível de resistência). Essas cepas são caracterizadas por possuírem concentração inibitória mínima para meticilina no valor limite ou pouco acima do valor da susceptibilidade. As cepas *borderline* podem ser divididas em duas categorias: cepas que contém o gene *mecA* e são extremamente heterogêneas na produção de PLP 2a (possuem subpopulações de células resistentes, embora isto possa ser uma pequena parte, que conseguem crescer em altas concentrações de antimicrobiano) e cepas *borderline* que não contém o gene *mecA*, não possuem subpopulações altamente resistentes e acredita-se que sua resistência deve-se à hiperprodução de beta-lactamases ou à reduzida afinidade pelas PLPs 1 e 2 (CHAMBERS, 1997). Bal et al. (2010), detectaram a presença de beta-lactamases em 24 de 81 amostras de SCN (29,26%). As taxas de resistência à meticilina genotípicas e fenotípicas entre os isolados do SCN foram 21,95% e 1,22%, respectivamente. .

Além destes resultados, alguns estudos vêm fornecendo informações a respeito da contaminação por cepas MRSA no leite com mastite bovina em países como Uruguai (2,0%), EUA (0,6%) e Suíça (1,4%) (ERSKINE et al., 2002; GIANNEECHINI et al., 2002; HUBER et al., 2010). Na Turquia, Turutoglu et al. (2009) descreveram 16,6% de *S. aureus* isolados de amostras de leite de bovinos fenotipicamente resistentes a meticilina que continham o gene *mecA*.

Na Índia, Kumar et al. (2010), descreveram o gene *mecA* em apenas um rebanho, coletaram amostras de leite de mastite clínica e subclínica a cada semestre durante dois anos. 7.8% dos *S. aureus* pesquisados continham o gene *mecA*. Os isolados de *S. aureus* que foram resistentes à meticilina também apresentaram resistência a outros antimicrobianos do grupo beta-lactâmicos: penicilina G (13,9%), Cloxacilina (5.2%), ampicilina (6%), amoxicilina (4.3%) e amoxicilina-clavulanato (2,6%).

No Brasil, Diniz et al. (2010) pesquisaram o gene *mecA* em isolados de amostras de leite provenientes de animais com histórico de mastite recorrente em Minas Gerais. A análise

molecular demonstrou que 33,78% dos isolados possuíam o gene *mecA*, sendo mais frequentemente isolados em *S. aureus* e SCN, com índices de 48% e 32%

No Rio Grande do Sul, Soares et al. (2008) analisaram 72 isolados de SCN a partir de amostras do conduto auditivo de cães (32), de mastite bovina (16) e de infecções humanas (24). Os SCN isolados de humanos apresentaram 79,2% de resistência à oxacilina. Os isolados de mastite bovina não apresentaram resistência à oxacilina e 5,5% dos SCN pesquisados apresentaram o gene *mecA*. Todos os isolados *mecA* positivos foram provenientes de amostras de animais, sendo três *S. xylosus* e uma *S. epidermidis*.

7 CONCLUSÃO

Os microrganismos mais frequentemente isolados de amostras de leite nos rebanhos estudados foram *Staphylococcus* coagulase negativa e *S. aureus*. Os testes de susceptibilidade realizados para as espécies de *Staphylococcus spp.* e *Streptococcus spp.* apresentaram alto percentual de susceptibilidade para a maioria dos antimicrobianos testados. Com exceção de ampicilina e sulfatrimetropin para os isolados de *Streptococcus agalactiae* e tetraciclina, clindamicina para *S. dysgalactiae*. A maioria dos *Staphylococcus spp.* e *Streptococcus spp.* pesquisados não apresentaram perfil de multirresistência, porém SCN foi o microrganismo com maior número de isolados multirresistentes. Nenhum dos isolados fenotipicamente resistentes a oxacilina/meticilina apresentaram o gene *mecA*.

CAPÍTULO 3 – PRÁTICAS DE MANEJO E TRATAMENTO DE MASTITE ASSOCIADAS À SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE *Staphylococcus aureus*

RESUMO

Os objetivos do presente estudo foram avaliar a associação entre as práticas de manejo e tratamento de mastite e a susceptibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* isolados de rebanhos leiteiros. Foram selecionados para o presente estudo 13 rebanhos de um total de 60 rebanhos vinculados a um laticínio da região de Pirassununga/SP. Questionários previamente formulados foram respondidos pelos responsáveis do rebanho para avaliar a associação entre as práticas de manejo e tratamento de mastite e a susceptibilidade antimicrobiana e os possíveis fatores de risco. Após a seleção dos rebanhos e aplicação dos questionários, foram isolados 210 *S. aureus* de amostras compostas de leite coletadas durante 24 meses, em quatro períodos para realização dos testes de susceptibilidade. Os antimicrobianos testados foram: ampicilina 10 µg; clindamicina 2 µg; penicilina 1µg; ceftiofur 30 µg; gentamicina 10 µg; sulfatrimetropin 25 µg; enrofloxacina 5 µg; sulfonamida 300 µg; tetraciclina 30 µg; oxacilina 1 µg; cefalotina 30 µg e eritromicina 5 µg. Houve associação entre variáveis para os seguintes antimicrobianos: a) tratamento de mastite clínica: ampicilina (P = 0,0055), ceftiofur (P = 0,0481), sulfatrimetropin (P= 0,0293), sulfonamida (P = 0,0043) e tetraciclina (P = 0,0058); e envio de amostras para cultura e antibiograma: ampicilina (P=0,0032), tetraciclina (P=<0,0001). Os principais fatores de risco para susceptibilidade antimicrobiana de *S. aureus* foram o não envio de amostras para cultura e antibiograma para tetraciclina (OR=6.012), penicilina (OR=4.687), eritromicina (OR=3.059) e ampicilina (OR=2.571), tratamento de mastite clínica para ampicilina (OR=2.178), ceftiofur (OR=1.956), gentamicina (OR=1.668), oxacilina (OR= 1.132) e penicilina (OR= 1.261) e tratamento de vaca seca para enrofloxacina (OR=2.111) e tetraciclina (OR=2.075). O maior fator de risco associado à susceptibilidade de *S. aureus* foi em relação à tetraciclina, penicilina, eritromicina e ampicilina para o não envio de amostras para cultura e antibiograma. Dois fatores de risco importantes identificados foram relacionados à ampicilina, ceftiofur, gentamicina, oxacilina e penicilina para o tratamento de mastite clínica e à enrofloxacina e tetraciclina para o tratamento de vaca seca.

Palavras-chave: Fatores de risco. Mastite bovina. *Staphylococcus aureus*. Susceptibilidade antimicrobiana

ABSTRACT

The aims of this study were to evaluate the association between management practices and treatment of mastitis and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from dairy herds. Thirteen herds were selected from a total of 60 dairy farms in the region of Pirassununga / SP. Questionnaires formulated previously were answered by dairy farmers to evaluate the association between management practices and mastitis treatment and antimicrobial susceptibility. After the farms selection and the application of the questionnaires, 210 composite samples of milk with *S. aureus* were isolated from composite milk samples from all herds, over 24 months in four periods. The antimicrobials tested were ampicillin 10 mg; clindamycin 2 µg, penicillin 1 mg; ceftiofur 30 µg; gentamicin 10 mg; sulfatrimetropin 25 µg; enrofloxacin 5 µg; sulfonamide 300 µg, tetracycline 30 µg; oxacillin 1mg; cephalothin 30µg and erythromycin 5µg. There was an association between variables for the following antimicrobial: a) the treatment of clinical mastitis: ampicillin (P = 0.0055), ceftiofur (P = 0.0481), sulfatrimetropin (P = 0.0293), sulfonamide (P = 0.0043) and tetracycline (P = 0.0058); sending samples for culture and sensitivity: ampicillin (P = 0.0032), tetracycline (P = <0.0001). Major risk factors for susceptibility antimicrobial *S. aureus* were not submitting samples for culture and antibiogram for tetracycline (OR = 6.012), penicillin (OR = 4.687), erythromycin (OR = 3.059) and ampicillin (OR = 2.571), treatment of clinical mastitis: ampicillin (OR = 2.178), ceftiofur (OR = 1.956), gentamicin (OR = 1.668), oxacillin (OR = 1.132) and penicillin (OR = 1.261); and treatment of dry cow: enrofloxacin (OR = 2.111) and tetracycline (OR = 2.075). The major risk factor associated with susceptibility of *S. aureus* was compared to tetracycline, penicillin, erythromycin and ampicillin for not sending samples for culture and sensitivity. Two important risk factors have been identified related to ampicillin, ceftiofur, gentamicin, penicillin and oxacillin for treatment of clinical mastitis and enrofloxacin and tetracycline for the treatment of dry cow dry cow therapy.

Keywords: Risk factors. Bovine mastitis. *Staphylococcus aureus*. Antimicrobial susceptibility

7 INTRODUÇÃO

A mastite é uma das enfermidades mais frequentes em rebanhos leiteiros e é a principal causa do uso de antimicrobianos em vacas leiteiras adultas (POL; RUEGG, 2006). Os antimicrobianos são usados extensivamente em animais produtores de alimentos para o tratamento de enfermidades e em alguns casos melhorar o desempenho animal. Em fazendas leiteiras, antimicrobianos, como a penicilina, cefalosporina, tetraciclina e outros, são utilizados para o tratamento e prevenção de mastite causada por bactérias Gram positivas e Gram negativas (OLIVER; MURINDA, 2012). Alguns fatores que podem contribuir para a resistência antimicrobiana incluem as pressões ambientais e o amplo uso de antimicrobianos na medicina humana e animal (HAWKEY, 2008). Sendo assim, as fazendas leiteiras e as práticas de criação formam um ambiente ideal para a pressão seletiva e podem favorecer a disseminação de cepas resistentes (ACAR; MOULIN, 2006).

O surgimento e a disseminação da resistência antimicrobiana é o resultado de inúmeras interações complexas entre os antimicrobianos, microrganismos, e os ambientes envolvidos. Uma das principais causas é devido à frequência com que novos fenótipos de resistência emergentes estão ocorrendo (BRONZWAER et al., 2004).

As ferramentas de diagnóstico que incluem testes para a identificação exata de microrganismos patogênicos para a determinação de sua susceptibilidade aos agentes antimicrobianos desempenham um papel fundamental para evitar as infecções bacterianas e consequentemente a resistência antimicrobiana (AARESTRUP 2004; SCHWARZ et al., 2010). A disponibilidade de pesquisas sobre o uso de antimicrobianos ajuda na interpretação de padrões e tendências da resistência antimicrobiana e servem como base de avaliação de risco, para tomada de decisão de medidas de controle e avaliação do efeito das intervenções para controlar a resistência antimicrobiana (WHO, 2003). As pesquisas sobre a susceptibilidade antimicrobiana em animais produtores de alimentos são importantes para o desenvolvimento de políticas nacionais e internacionais para conter a resistência antimicrobiana. Nos Estados Unidos, várias pesquisas sobre o uso de antimicrobianos em bovinos de leite tem sido realizadas (ZWALD et al., 2004; SAWANT et al., 2005; POL; RUEGG, 2007a).

S. aureus é considerado um dos patógenos mais importantes nas causas de mastite clínica, e é o microrganismo mais frequentemente isolado em casos de mastite subclínica em todo o mundo (WAAGE, 1997; SAMPIMON et al., 2009). E tem sido um dos principais

microrganismos estudados sobre a susceptibilidade antimicrobiana, devido à alta prevalência em todas as formas de mastite em vacas leiteiras (MALINOWSKI et al., 2002). Pela ampla distribuição nos rebanhos leiteiros, os estafilococos representam risco aos consumidores de produtos lácteos, em razão do seu potencial de produção de enterotoxinas resistentes aos tratamentos térmicos comumente aplicados ao leite (MARTINS et al., 2006). *S. aureus*, além de ser responsável por grandes prejuízos à pecuária leiteira, apresenta resistência a diversos antimicrobianos utilizados rotineiramente no tratamento de mastite (FREITAS et al., 2005).

E embora, já tenham sido descritos vários mecanismos de resistência para os antimicrobianos atualmente disponíveis, muitos aspectos de desenvolvimento e disseminação da resistência antimicrobiana, permanecem incertos. Apesar da resistência antimicrobiana entre patógenos causadores de mastite ter sido documentada por quase quatro décadas, não há evidências científicas que demonstrem que se trata de um fenômeno emergente ou em progressão (OLIVER et al., 2011). As pesquisas sobre a quantidade de agentes antimicrobianos utilizados em vacas leiteiras e sobre os procedimentos de tratamento aplicados por profissionais e agricultores são limitados (DANMAP, 2003).

Alguns estudos avaliaram as tendências de susceptibilidade antimicrobiana de bactérias causadoras de mastite durante vários períodos de tempo e em diferentes regiões (MYLLYS et al., 1998; ERSKINE et al., 2002; PETROVSKI et al., 2011) e os resultados mostraram haver uma variação entre as regiões estudadas, porém não existem dados na literatura que comprovem um aumento significativo da resistência antimicrobiana ao longo do tempo (OLIVER et al., 2011). Outros estudos avaliaram a eficácia de diferentes tratamentos para *S. aureus* (SHPIGEL et al., 2006; SEKKIN et al., 2010), e as taxas de cura tem sido variadas. Além disso, vários estudos têm demonstrado a variação entre a susceptibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus aureus*: 7 a 63% para a penicilina (WATTS; SALMON, 1997; GÜLER et al, 2005), 0 a 93% para eritromicina (FINRES, 2007;. WANG et al., 2008), de 0 a 28% para tetraciclina (WATTS; SALMON, 1997;. GÜLER et al., 2005), e de 4,5 a 7,5% para sulfadimetoxina (MAKOVEC; RUEGG, 2003; SABOUR et al., 2004). Porém, não há estudos sobre a relação entre as práticas de manejo e tratamento de mastite e a susceptibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* causadores de mastite bovina. Portanto, os objetivos do presente estudo foram avaliar a associação entre as práticas de manejo e tratamento de mastite em rebanhos leiteiros e a susceptibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* e os possíveis fatores de risco.

8 MATERIAL E MÉTODOS

8.1 SELEÇÃO DE REBANHOS LEITEIROS E ANÁLISES LABORATORIAIS

A descrição detalhada do local e seleção das propriedades leiteiras, coleta de amostras, análises microbiológicas e susceptibilidade antimicrobiana encontram-se nos itens 3.4.1, 3.4.2, 3.4.3, 3.4.4 e 3.4.5 desta dissertação, respectivamente.

8.2 QUESTIONÁRIO PARA AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DAS PRÁTICAS DE MANEJO E TRATAMENTO DE MASTITE E A SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE *S. aureus*

Os questionários foram previamente formulados e respondidos pelos responsáveis pelo manejo do rebanho. No momento da primeira visita feita à propriedade, foram anotadas, informações sobre os dados dos produtores e da fazenda: nome, telefone, localização e coordenadas da propriedade, características gerais de rebanho e infraestrutura (identificação e localização, número de animais, produção total e individual, tipo de sistema de produção, tipo e local de ordenha, local de armazenamento do leite, número total de animais e de vacas em lactação, identificação dos animais amostrados, data da coleta das amostras), e ainda questões sobre programa de controle e prevenção de mastite.

Após sua elaboração, foi realizado um teste piloto com o questionário para avaliação do formato e da qualidade dos dados. Após os devidos ajustes, o questionário foi aplicado em todas as fazendas participantes (n=13). Alguns dos itens incluídos estão relacionados abaixo.

- Número de amostras analisadas por rebanho e número de isolamentos positivos
- Se é feito o tratamento na secagem;
- Se há registro do tratamento;
- Se é feito tratamento para os casos clínicos;
- Se há registro dos tratamentos clínicos;
- Se faz (ou já fez) cultura e teste de susceptibilidade a antimicrobianos de agentes da mastite do rebanho.

8.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados no programa Statistical Analysis System (SAS Institute Inc., 2010). Para análise estatística entre as frequências das respostas obtidas para cada antimicrobiano testado, foi utilizado o teste qui-quadrado (proc FREQ), considerando-se um valor de $P \leq 0,05$.

Para a análise dos fatores de risco, foram utilizados modelos de regressão logística múltipla, considerando como variável dependente a susceptibilidade antimicrobiana (resistente ou susceptível). As associações com significância ($P \leq 0,2$) foram selecionadas e incluídas na subsequente análise de regressão logística multivariada pelo *modelo logit* (proc LOGIT). Essa probabilidade foi estipulada para que possíveis fatores de risco do evento não fossem excluídos da análise.

Os critérios de decisão para a escolha das variáveis testadas no modelo de regressão logística foram aqueles que ofereciam explicação biológica coerente para o aumento da resistência antimicrobiana. Após a seleção do modelo final de regressão logística, foi observado o coeficiente beta (β) de cada variável independente para se estimar *Odds ratio* (OR) com um intervalo de confiança (IC) de 95%.

9 RESULTADOS

9.1 CARACTERIZAÇÃO DOS REBANHOS

A descrição detalhada da caracterização dos rebanhos encontra-se no item 3.5.1 desta dissertação.

9.2 ASSOCIAÇÃO ENTRE AS PRÁTICAS DE TRATAMENTO DE MASTITE E A SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE *S. aureus*.

Na tabela 6 estão descritas as variáveis relacionadas às práticas de tratamento associadas à susceptibilidade antimicrobiana de *S. aureus* frente à ampicilina. Foram observadas diferenças entre os grupos susceptível e resistente para as seguintes variáveis: tratamento de mastite clínica ($P=0,0055$) e envio de amostras para cultura e antibiograma ($P=0,0032$). Oitenta e três dos isolados (59,71%) de *S. aureus* do grupo susceptível pertenciam aos rebanhos que não tratavam mastite clínica. Enquanto que 56 (78,87%) *S. aureus* do grupo resistente foram isolados de rebanhos que realizavam tratamento dos casos de mastite clínica. Já para o envio de amostras para cultura e antibiograma, um total de 129 (92,81%) *S. aureus* do grupo susceptível foram isolados de rebanhos que enviavam amostras para cultura e antibiograma, e os *S. aureus* do grupo resistente, 56 (78,87%) foram isolados de fazendas que não enviavam amostras para realização de tal prática. Não foram observadas diferenças ($P \geq 0,05$) entre as demais variáveis estudadas.

Tabela 6 - Frequência de práticas de manejo e tratamento de mastite e a susceptibilidade antimicrobiana de *S. aureus* frente à ampicilina entre os grupos susceptível (n=139) e resistente (n=71)

Variáveis	Susceptibilidade antimicrobiana - Ampicilina		P ¹
	Susceptível	Resistente	
	n (%)	n (%)	
Tratamento de mastite clínica			
Sim	55(40,29)	56(78,87)	0,0055
Não	83(59,71)	15(21,13)	
Tratamento de vaca seca			
Sim	70 (50,36)	38 (53,52)	0,6646
Não	69 (49,64)	33 (46,48)	
Envia amostras para cultura e antibiograma			
Sim	129 (92,81)	15 (21,13)	0,0032
Não	10 (7,19)	56 (78,87)	
Respeita o período de carência			
Sim	126 (90,65)	62 (87,32)	0,4569
Não	13 (9,35)	9 (12,68)	
Protocolo de tratamento de mastite			
Sim	75 (53,96)	33 (46,48)	0,3050
Não	64 (46,04)	38 (53,52)	
Registro de tratamento da mastite			
Sim	14 (10,07)	7 (9,86)	0,9612
Não	125 (89,93)	64 (90,14)	

¹Probabilidade calculada pelo teste qui-quadrado

Não foram observadas diferenças para cefalotina ($P \geq 0,05$) entre as variáveis estudadas (Tabela 7).

Tabela 7 - Frequência de práticas de manejo e tratamento de mastite e a susceptibilidade antimicrobiana de *S. aureus* frente à cefalotina entre os grupos susceptível (n=196) e resistente (n=14)

Variáveis	Susceptibilidade Antimicrobiana – Cefalotina		P ¹
	Susceptível	Resistente	
	n (%)	n (%)	
Tratamento de mastite clínica			
Sim	128 (65,31)	11 (78,57)	0,3108
Não	68 (34,69)	3 (21,43)	
Tratamento de vaca seca			
Sim	77 (39,29)	6 (42,86)	0,7917
Não	119 (60,71)	8 (57,14)	
Envia amostras para cultura e antibiograma			
Sim	25 (12,76)	3 (21,43)	0,3564
Não	171 (87,24)	11 (78,57)	
Respeita o período de carência			
Sim	176 (89,80)	12 (85,71)	0,6300
Não	20 (10,20)	2 (14,29)	
Protocolo de tratamento de mastite			
Sim	49 (50,51)	6 (42,86)	0,5801
Não	97 (49,49)	8 (57,14)	
Registro de tratamento da mastite			
Sim	20 (10,20)	1 (7,14)	0,7122
Não	176 (89,80)	13 (92,86)	

¹Probabilidade calculada pelo teste qui-quadrado

Não foram observadas diferenças para clindamicina ($P \geq 0,05$) entre as variáveis estudadas (Tabela 8).

Tabela 8 - Frequência de práticas de manejo e tratamento de mastite e a susceptibilidade antimicrobiana de *S. aureus* frente à clindamicina entre os grupos susceptível (n=195) e resistente (n=15)

Variáveis	Susceptibilidade Antimicrobiana – Clindamicina		P ¹
	Susceptível	Resistente	
	n (%)	n (%)	
Tratamento de mastite clínica			
Sim	128 (65,64)	11 (73,33)	0,5439
Não	67 (34,36)	4 (26,67)	
Tratamento de vaca seca			
Sim	108 (55,38)	9 (60)	0,7288
Não	87 (44,62)	6 (40)	
Envia amostras para cultura e antibiograma			
Sim	84 (43,08)	8 (53,33)	0,4404
Não	111 (52,92)	7 (46,67)	
Respeita o período de carência			
Sim	171 (87,69)	13 (86,67)	0,9076
Não	24 (12,31)	2 (13,33)	
Protocolo de tratamento de mastite			
Sim	100 (51,28)	8 (53,33)	0,8783
Não	95 (48,72)	7 (46,67)	
Registro de tratamento de mastite			
Sim	19 (9,74)	2 (13,33)	0,6552
Não	176 (90,26)	13 (86,67)	

¹Probabilidade calculada pelo teste qui-quadrado

Foram observadas diferenças entre os grupos susceptível e resistente à ceftiofur para as seguintes variáveis: tratamento de mastite clínica (P=0,0481) e respeito do período de carência (P=0,0108). Noventa e três (60,78%) dos isolados de *S. aureus* do grupo susceptível eram de origem dos rebanhos que não tratavam mastite clínica. E entre aqueles do grupo resistente 43 (75,44%) dos *S. aureus* foram isolados de rebanhos que realizavam tratamento para os casos de mastite clínica. Quanto à prática de respeito pelo período de carência dos antimicrobianos, um total de 142 (92,81%) dos *S. aureus* do grupo susceptível foram isolados de fazendas que faziam uso de tal prática, e entre os *S. aureus* do grupo resistente, o maior percentual 46 (80,70%) estava entre os rebanhos que não respeitavam tais recomendações. Não foram observadas diferenças (P ≥ 0,05) entre as demais variáveis (Tabela 9).

Tabela 9 - Frequência de práticas de manejo e tratamento de mastite e a susceptibilidade antimicrobiana de *S. aureus* frente à ceftiofur entre os grupos susceptível (n=153) e resistente (n=57)

Variáveis	Susceptibilidade antimicrobiana - Cefotiofur		P ¹
	Susceptível	Resistente	
	n (%)	n (%)	
Tratamento de mastite clínica			
Sim	60 (39,22)	43 (75,44)	0,0481
Não	93 (60,78)	14 (24,56)	
Tratamento de vaca seca			
Sim	62 (40,52)	24 (42,11)	0,8357
Não	91 (59,48)	33 (57,89)	
Envia amostras para cultura e antibiograma			
Sim	19 (12,42)	6 (10,53)	0,7066
Não	134 (87,58)	51 (89,47)	
Respeita o período de carência			
Sim	142 (92,81)	11 (19,30)	0,0108
Não	11 (7,19)	46 (80,70)	
Protocolo de tratamento de mastite			
Sim	86 (56,21)	37 (64,91)	0,2549
Não	67 (43,79)	20 (35,09)	
Registro de tratamento de mastite			
Sim	17 (11,11)	4 (7,02)	0,3793
Não	136 (88,89)	53 (92,98)	

¹Probabilidade calculada pelo teste qui-quadrado

Foram observadas diferenças entre os grupos susceptível e resistente à enrofloxacin para a seguinte variável: tratamento de vaca seca (P=0,0490). Cento e dezenove (67,61%) das cepas de *S. aureus* do grupo susceptível foram isolados de rebanhos que não realizavam tratamento de vaca seca, enquanto que (17) 50% dos *S. aureus* do grupo resistente faziam parte dos rebanhos que mantinham a prática de tratar os animais no período seco. Não foram observadas diferenças entre as demais variáveis (P ≥ 0,05) (Tabela 10).

Tabela 10 - Frequência de práticas de manejo e tratamento de mastite e a susceptibilidade antimicrobiana de *S. aureus* frente à enrofloxacin entre os grupos susceptível (n=176) e resistente (n=34)

Variáveis	Susceptibilidade Antimicrobiana – Enrofloxacin		P ¹
	Susceptível	Resistente	
	n (%)	n (%)	
Tratamento de mastite clínica			
Sim	105 (59,66)	22 (64,71)	0,5816
Não	71 (40,34)	12 (35,29)	
Tratamento de vaca seca			
Sim	57 (32,39)	17 (50)	0,0490
Não	119 (67,61)	17 (50)	
Envia amostras para cultura e antibiograma			
Sim	22 (12,50)	3 (8,82)	0,5445
Não	154 (87,50)	31 (91,18)	
Respeita o período de carência			
Sim	158 (89,77)	30 (88,24)	0,7887
Não	18 (10,23)	4 (11,76)	
Protocolo de tratamento da mastite			
Sim	90 (51,14)	18 (52,94)	0,8471
Não	86 (48,86)	16 (47,06)	
Registro de tratamento da mastite			
Sim	18 (10,23)	3 (8,82)	0,8028
Não	158 (89,77)	31 (91,18)	

¹Probabilidade calculada pelo teste qui-quadrado

Não foram observadas diferenças para eritromicina ($P \geq 0,05$) entre as variáveis estudadas (Tabela 11).

Tabela 11 - Frequência de práticas de manejo e tratamento de mastite e a susceptibilidade antimicrobiana de *S. aureus* frente à eritromicina entre os grupos susceptível (n=200) e resistente (n=10)

Variáveis	Susceptibilidade antimicrobiana - Eritromicina		P ¹
	Susceptível	Resistente	
	n (%)	n (%)	
Tratamento de mastite clínica			
Sim	133 (66,50)	6 (60)	0,6715
Não	67 (33,50)	4 (40)	
Tratamento de vaca seca			
Sim	83 (41,50)	3 (30)	0,4705
Não	117 (58,50)	7 (70)	
Envia amostras para cultura e antibiograma			
Sim	22 (11)	3 (30)	0,0702
Não	178 (89)	7 (70)	
Respeita o período de carência			
Sim	180 (90)	8 (80)	0,3136
Não	20 (10)	2 (20)	
Protocolo de tratamento de mastite			
Sim	105 (52,50)	3 (30)	0,1647
Não	95 (47,50)	7 (70)	
Registro de tratamento da mastite			
Sim	19 (9,50)	2 (20)	0,2801
Não	181 (90,50)	8 (80)	

¹Probabilidade calculada pelo teste qui-quadrado

Não foram observadas diferenças para gentamicina ($P \geq 0,05$) entre as variáveis estudadas (Tabela 12).

Tabela 12 - Frequência de práticas de manejo e tratamento de mastite e a susceptibilidade antimicrobiana de *S. aureus* frente à gentamicina entre os grupos susceptível (n=172) e resistente (n=38)

Variáveis	Susceptibilidade Antimicrobiana – Gentamicina		P ¹
	Susceptível	Resistente	
	n (%)	n (%)	
Tratamento de mastite clínica			
Sim	110 (63,95)	29 (76,32)	0,1449
Não	62 (36,05)	9 (23,68)	
Tratamento de vaca seca			
Sim	67(38,95)	19 (50)	0,2101
Não	105 (61,05)	19 (50)	
Envia amostras para cultura e antibiograma			
Sim	22 (12,79)	3 (7,89)	0,3990
Não	150 (87,21)	35 (92,11)	
Respeita o período de carência			
Sim	156 (90,70)	32 (84,21)	0,2373
Não	16 (9,30)	6 (15,79)	
Protocolo de tratamento de mastite			
Sim	88 (51,16)	20 (52,63)	0,8698
Não	84 (48,84)	18 (47,37)	
Registro de tratamento de mastite			
Sim	15 (8,72)	6 (15,79)	0,1887
Não	157 (91,28)	32 (84,21)	

¹Probabilidade calculada pelo teste qui-quadrado

Foram observadas diferenças entre os grupos susceptível e resistente à oxacilina para a seguinte variável: protocolo de tratamento de mastite (P=0,0125). Cento e um (54,59%) do *S. aureus* do grupo susceptível foram isolados de rebanhos que mantinham um protocolo e tratamento de mastite. Enquanto que 18 (72%) dos *S. aureus* do grupo resistente foram isolados de rebanhos que não mantinham um protocolo para o tratamento de mastite. Em relação às demais variáveis, não foram observadas diferenças ($P \geq 0,05$) (Tabela 13).

Tabela 13 - Frequência de práticas de manejo e tratamento de mastite e a susceptibilidade antimicrobiana de *S. aureus* frente à oxacilina entre os grupos susceptível (n=185) e resistente (n=25)

Variáveis	Susceptibilidade Antimicrobiana – Oxacilina		P ¹
	Susceptível	Resistente	
	n (%)	n (%)	
Tratamento de mastite clínica			
Sim	126 (68,11)	13 (52)	0,1100
Não	59 (31,89)	12 (48)	
Tratamento de vaca seca			
Sim	80 (43,24)	6 (24)	0,0663
Não	105 (56,76)	19 (76)	
Envia amostras para cultura e antibiograma			
Sim	22 (11,89)	3 (12)	0,9875
Não	163 (88,11)	22 (88)	
Respeita o período de carência			
Sim	168 (90,81)	20 (80)	0,0976
Não	17 (9,19)	5 (20)	
Protocolo de tratamento de mastite			
Sim	101 (54,59)	7 (28)	0,0125
Não	84 (45,41)	18 (72)	
Registro de tratamento de mastite			
Sim	76 (41,08)	12 (48)	0,5105
Não	109 (58,92)	13 (52)	

¹Probabilidade calculada pelo teste qui-quadrado

Foram observadas diferenças entre os grupos susceptível e resistente à penicilina para as seguintes variáveis: tratamento de vaca seca (P=0,0163), protocolo de tratamento de mastite (P=0,0026) e registro de tratamento de mastite (P=0,0417). Em relação ao tratamento de vaca seca, 80 (53,33%) *S. aureus* do grupo susceptível foram isolados dos rebanhos que não realizavam tratamento nos animais no período seco. Entre aqueles do grupo resistente 39 (50%) dos isolados de *S. aureus* eram de origem dos rebanhos que faziam tratamento de vaca seca. Quanto à utilização de protocolo de mastite, 87 (58%) dos *S. aureus* do grupo susceptível foram isolados de fazendas que faziam uso de protocolo, e entre os *S. aureus* do grupo resistente, o maior percentual 39 (65%) foi isolado dos rebanhos que não mantinham um protocolo de tratamento de mastite. Em relação ao registro dos casos de tratamento de mastite, o maior percentual de *S. aureus* do grupo susceptível 131 (87,33%) foi isolado de rebanhos que mantinham registro dos casos de mastite, já dos *S. aureus* do grupo resistente, 58 (96,67%) foram isolados de fazendas que não realizavam o registro dos tratamentos de

mastite. Em relação às demais variáveis, não foram observadas diferenças ($P \geq 0,05$) (Tabela 14).

Tabela 14 - Frequência de práticas de manejo e tratamento de mastite e a susceptibilidade antimicrobiana de *S. aureus* frente à penicilina entre os grupos susceptível (n=150) e resistente (n=60)

Variáveis	Susceptibilidade Antimicrobiana – Penicilina		P^1
	Susceptível	Resistente	
	n (%)	n (%)	
Tratamento de mastite clínica			
Sim	105 (70)	34 (56,67)	0,0650
Não	45 (30)	26 (43,33)	
Tratamento de vaca seca			
Sim	70 (46,67)	39 (50)	0,0163
Não	80 (53,33)	21 (35)	
Envia amostras para cultura e antibiograma			
Sim	15 (10)	10 (16,67)	0,1778
Não	135 (90)	50 (83,33)	
Respeita o período de carência			
Sim	136 (89,47)	52 (89,66)	0,9694
Não	16 (10,53)	6 (10,34)	
Protocolo de tratamento de mastite			
Sim	87 (58)	21 (35)	0,0026
Não	63 (42)	39 (65)	
Registro de tratamento de mastite			
Sim	131 (87,33)	2 (3,33)	0,0417
Não	19 (12,67)	58 (96,67)	

¹Probabilidade calculada pelo teste qui-quadrado

Foram observadas diferenças entre os grupos susceptível e resistente à sulfatrimetropin para a seguinte variável: tratamento de mastite clínica ($P=0,0293$). Cento e vinte dois (69,32%) dos *S. aureus* do grupo susceptível foram isolados de rebanhos que não faziam uso do tratamento dos casos de mastite. Entre aqueles do grupo resistente 50% dos *S. aureus* foram isolados de rebanhos que realizavam tratamento de mastite clínica. Em relação às demais variáveis, não foram observadas diferenças ($P \geq 0,05$) (Tabela 15).

Tabela 15 - Frequência de práticas de manejo e tratamento de mastite e a susceptibilidade antimicrobiana de *S. aureus* frente à sulfatrimetropin entre os grupos susceptível (n=175) e resistente (n=35)

Variáveis	Susceptibilidade Antimicrobiana – Sulfatrimetropim		P ¹
	Susceptível	Resistente	
	n(%)	n(%)	
Tratamento de mastite clínica			
Sim	54 (39,68)	17 (50)	0,0293
Não	121 (69,32)	18 (50)	
Tratamento de vaca seca			
Sim	73 (42,05)	13 (35,29)	0,4636
Não	102 (57,95)	22 (64,71)	
Envia amostras para cultura e antibiograma			
Sim	23 (13,64)	2 (2,94)	0,0779
Não	152 (86,36)	33 (97,06)	
Respeita o período de carência			
Sim	156 (89,20)	30 (91,18)	0,7311
Não	19 (10,80)	3 (8,82)	
Protocolo de tratamento de mastite			
Sim	95 (53,98)	13 (38,24)	0,0927
Não	80 (46,02)	20 (61,76)	
Registro de tratamento de mastite			
Sim	155 (88,07)	0	0,3371
Não	20 (11,93)	35 (100)	

¹Probabilidade calculada pelo teste qui-quadrado

Foram observadas diferenças entre os grupos susceptível e resistente à sulfonamida para a seguinte variável: tratamento de mastite clínica (P= 0,0043). Cento e vinte seis (70%) dos *S. aureus* do grupo susceptível foram isolados de rebanhos que não tratavam os animais para mastite clínica. Entre aqueles isolados do grupo resistente 17 (56,67%) dos *S. aureus* eram de origem dos rebanhos que realizavam tratamento para os casos de mastite clínica (Tabela 16).

Tabela 16 - Frequência de práticas de manejo e tratamento de mastite e a susceptibilidade antimicrobiana de *S. aureus* frente à sulfonamida entre os grupos susceptível (n=180) e resistente (n=30)

Variáveis	Susceptibilidade Antimicrobiana – Sulfonamida		P ¹
	Susceptível	Resistente	
	n(%)	n(%)	
Tratamento de mastite clínica			
Sim	54 (30)	17 (56,67)	0,0043
Não	126 (70)	13 (43,33)	
Tratamento de vaca seca			
Sim	76 (42,22)	10 (33,33)	0,3593
Não	104 (57,78)	20 (66,67)	
Envia amostras para cultura e antibiograma			
Sim	23 (12,78)	2 (6,67)	0,3386
Não	157 (87,22)	28 (93,33)	
Respeita o período de carência			
Sim	161 (89,44)	27 (90)	0,9267
Não	19 (10,56)	3 (10)	
Protocolo de tratamento de mastite			
Sim	97 (53,89)	11 (36,67)	0,0806
Não	83 (46,11)	19 (63,33)	
Registro de tratamento de mastite			
Sim	27 (15)	2 (6,67)	0,2206
Não	153 (85)	28 (93,33)	

¹Probabilidade calculada pelo teste qui-quadrado

Foram observadas diferenças entre os grupos susceptível e resistente à tetraciclina para a seguinte variável: envio de amostras para cultura e antibiograma ($P < 0,0001$). Cento e setenta e quatro (91,10%) dos isolados de *S. aureus* do grupo susceptível foram isolados de fazendas que realizavam tal prática, e entre os *S. aureus* do grupo resistente, o maior percentual 11 (57,89%) foram isolados dos rebanhos que não enviavam amostras para realização de cultura e antibiograma. As demais variáveis não apresentaram diferenças ($P \geq 0,05$) (Tabela 17).

Tabela 17 - Frequência de práticas de manejo e tratamento de mastite e a susceptibilidade antimicrobiana de *S. aureus* frente à tetraciclina entre os grupos susceptível (n=191) e resistente (n=19)

Variáveis	Susceptibilidade antimicrobiana – Tetraciclina		P ¹
	Susceptível	Resistente	
	n(%)	n(%)	
Tratamento de mastite clínica			
Sim	70 (36,65)	18 (94,74)	0,2458
Não	121 (63,35)	1 (5,26)	
Tratamento de vaca seca			
Sim	75 (39,27)	11 (57,89)	0,1153
Não	116 (60,73)	8 (42,11)	
Envia amostras para cultura e antibiograma			
Sim	174 (91,10)	8 (42,11)	<0,0001
Não	17 (8,90)	11 (57,89)	
Respeita o período de carência			
Sim	173 (82,38)	15 (78,95)	0,1145
Não	18 (9,42)	4 (21,05)	
Protocolo de tratamento de mastite			
Sim	101 (52,88)	7 (36,84)	0,1822
Não	90 (47,12)	12 (63,16)	
Registro de tratamento de mastite			
Sim	20 (10,47)	1 (15,26)	0,4705
Não	171 (89,53)	18 (94,74)	

¹Probabilidade calculada pelo teste qui-quadrado

9.3 FATORES DE RISCO ASSOCIADOS À SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE *S. aureus*

As variáveis utilizadas para identificação dos fatores de risco para susceptibilidade antimicrobiana de *S. aureus* no modelo final de regressão logística estão apresentadas na Tabela 18. Foram identificados fatores de risco relacionados à susceptibilidade antimicrobiana de *S. aureus* para os seguintes antimicrobianos: ampicilina: tratamento de mastite clínica (OR=2.178) e não envio de amostras para cultura e antibiograma (OR=2.571); ceftiofur: tratamento de mastite clínica (OR= 1.956); enrofloxacino: tratamento de vaca seca (OR=2.111); eritromicina: não envio de amostras para cultura e antibiograma (OR= 3.059); gentamicina: tratamento de mastite clínica (OR=1.668) e não registro de tratamento de mastite (OR=1.652); oxacilina: tratamento de mastite clínica (OR=1.132); penicilina: tratamento de mastite clínica (1.261) e não envio de amostras para cultura e antibiograma (OR=4.687); sulfonamida: não uso de protocolo de tratamento de mastite (OR=1.644); e

tetraciclina: tratamento de vaca seca (OR= 2.075), não envio de amostras para cultura e antibiograma (OR=6.012) e respeito do período de carência (OR=1.133).

O maior risco identificado no presente estudo foi em relação à tetraciclina, para a prática de não envio de amostras para cultura e antibiograma (OR=6.012). *S. aureus* isolados de fazendas que não enviavam amostras para cultura e antibiograma apresentaram 6.012 vezes mais chances de serem resistentes à tetraciclina em relação àqueles pertencentes às fazendas que realizavam esta prática. Tal risco também foi maior para penicilina, (OR= 4.687), ampicilina (OR=2.571) e eritromicina (OR=3.059).

O segundo maior risco identificado foi em relação à enrofloxacinina para o tratamento de vaca seca. Em fazendas que realizavam o tratamento de vaca seca, a chance de *S. aureus* serem resistentes foi 2.111 vezes maior do que naquelas que não realizavam tal prática. Tal risco também foi identificado para tetraciclina (OR=2.075).

Ainda em relação à tetraciclina, outro risco identificado foi o não respeito do período de carência. *S. aureus* isolados de fazendas que não respeitavam o período de carência, apresentaram 1.133 vezes mais chances de serem resistentes à tetraciclina em relação aos *S. aureus* isolados de fazendas que respeitavam o período de carência. Em relação ao ceftiofur, o maior risco foi para o tratamento de mastite clínica (OR=1.956). *S. aureus* isolados de fazendas que realizavam tratamento de mastite clínica apresentaram 1.956 vezes mais chances de serem resistentes em relação àqueles isolados de fazendas que não tratavam os animais. Tal risco também foi maior para gentamicina (OR=1.668) e oxacilina (OR=1.132).

Outro risco identificado foi o não uso de protocolo de tratamento. No caso da sulfonamida, *S. aureus* isolados de fazendas que não faziam uso de protocolo de tratamento apresentaram 1.644 vezes mais chances de serem resistentes do que aqueles isolados de fazendas que faziam uso de tal prática. A prática de não realizar o registro de tratamento dos casos de mastite também foi identificada com um fator de risco. Em relação à gentamicina, *S. aureus* isolados de fazendas que não mantinham um registro dos casos de mastite apresentaram 1.652 vezes mais chances de serem resistentes em relação aos *S. aureus* isolados de fazendas que faziam o registro dos tratamentos de mastite.

Os fatores de risco estudados, que não resultaram em risco relativo maior que 1, não foram caracterizados como fatores de risco.

Tabela 18 – Fatores de risco associados à susceptibilidade antimicrobiana de *S. aureus* estimados por regressão logística

Antimicrobiano	Fatores de risco	OR ¹	IC 95% ²	P ³
Ampicilina	Faz tratamento de mastite clínica	2.178	1.098 - 4.321	0,005
	Não envia amostras para cultura e antibiograma	2.571	1.060 - 6.237	0,0032
Ceftiofur	Faz tratamento de mastite clínica	1.956	0.968 - 3.955	0,0481
	Não envia amostras para cultura e antibiograma	0.657	0.242 - 1.783	0,0108
Enrofloxacino	Faz tratamento de vaca seca	2.111	1.005 - 4.436	0,0490
Eritromicina	Não envia amostras para cultura e antibiograma	3.059	0.724 - 12.929	0,0702
	Não possui protocolo de tratamento de mastite	0.431	0.107 - 1.745	0,1647
Gentamicina	Faz tratamento de mastite clínica	1.668	0.724 - 3.842	0,1449
	Não registra tratamento de mastite	1.652	0.578 - 4.724	0,1887
Oxacilina	Faz tratamento de mastite clínica	1.132	0.148 - 8.661	0,1100
	Faz tratamento de vaca seca	0.694	0.115 - 4.182	0,0663
	Não respeita o período de carência	0.367	0.057 - 2.369	0,0976
	Não possui protocolo de tratamento de mastite	0.290	0.078 - 1.070	0,0125
Penicilina	Faz tratamento de mastite clínica	1.261	0.351 - 4.532	0,0650
	Faz tratamento de vaca seca	0.331	0.122 - 0.902	0,0163
	Não envia amostras para cultura e antibiograma	4.687	1.096 - 20.046	0,1778
	Não possui protocolo de tratamento de mastite	0.585	0.174 - 1.970	0,0026
	Não registra tratamento de mastite	0.304	0.045 - 2.028	0,0417
Sulfatrimetropim	Faz tratamento de mastite clínica	0.894	0.238 - 3.245	0,0293
	Não envia amostras para cultura e antibiograma	0.178	0.020 - 1.597	0,0779
	Não possui protocolo de tratamento de mastite	0.583	0.159 - 2.136	0,0927
Sulfonamida	Faz tratamento de mastite clínica	0.219	0.047 - 1.015	0,0043
	Não possui protocolo de tratamento de mastite	1.644	0.345 - 7.843	0,0806
Tetraciclina	Faz tratamento de vaca seca	2.075	0.388 - 11.101	0,1153
	Não envia amostras para cultura e antibiograma	6.012	1.285 - 28.124	<0,0001
	Não respeita o período de carência	1.133	0.028 - 0.629	0,1145
	Não possui protocolo de tratamento de mastite	0.448	0.142 - 1.407	0,1822

¹OR= odds ratio² IC= intervalo de confiança³ P= probabilidade calculada pelo teste qui-quadrado

10 DISCUSSÃO

O presente estudo incluiu perguntas que foram úteis para obter uma visão sobre a associação entre as práticas de tratamento de mastite em rebanhos leiteiros, e a susceptibilidade antimicrobiana de *S. aureus*, bem como os possíveis fatores de risco. Não foi encontrada na literatura indexada, metodologia semelhante à utilizada neste estudo.

Para a análise dos fatores de risco associados à susceptibilidade antimicrobiana de *S. aureus* foram utilizados os dados obtidos com os questionários epidemiológicos aplicados nas propriedades. Na primeira etapa das análises estatísticas, seis variáveis explicativas foram associadas à susceptibilidade antimicrobiana de *S. aureus* ($P < 0,05$), de acordo com as respostas obtidas com o questionário e com os resultados dos testes de susceptibilidade. Na segunda etapa, para a análise dos fatores de risco foram usados modelos de regressão logística, no qual foram selecionadas as variáveis que apresentaram associação significativa no teste do qui-quadrado ($P < 0,2$). O maior risco identificado no presente estudo foi em relação à tetraciclina para a prática de não envio de amostras para cultura e antibiograma ($OR = 6.012$). Tal risco também foi maior para penicilina, ($OR = 4.687$), ampicilina ($OR = 2.571$) e eritromicina ($OR = 3.059$).

O segundo maior risco identificado foi para o tratamento de vaca seca para enrofloxacina ($OR = 2.111$) e tetraciclina ($OR = 2.075$). Estudos sobre a associação entre a terapia da vaca seca e o desenvolvimento de resistência antimicrobiana em patógenos causadores de mastite são limitados. Pol e Ruegg, (2007b) avaliaram a relação entre o uso de antimicrobianos e a susceptibilidade antimicrobiana de agentes patogênicos Gram-positivos causadores de mastite em rebanhos leiteiros orgânicos e convencionais. A quantificação sobre o uso de antimicrobianos nos rebanhos foi realizado por cálculo de doses diárias. Penicilina, estreptomicina e tetraciclina foram os antimicrobianos mais frequentemente utilizados nas fazendas convencionais para o tratamento de vaca seca (90%). Além disso, *S. aureus* isolados de rebanhos convencionais apresentaram 7.7 vezes mais chances de serem resistentes à ampicilina e 6.3 vezes mais chances de serem resistentes à penicilina em relação aos isolados de fazendas orgânicas. Embora as diferenças de resistência não possam ser atribuídas especificamente para o tratamento de vaca seca, aproximadamente 66% de toda a utilização antimicrobiana em rebanhos convencionais em sua população de estudo foi atribuída aos tratamentos intramamários de mastite em geral (dos quais 44% eram tratamento de vacas secas). Outro dado importante foi que isolados de vacas multíparas apresentaram maior chance de serem resistentes do que isolados de vacas primíparas. Estas observações sugerem

que a um longo prazo de exposição a antimicrobianos (mais de um tratamento de vaca seca) há um aumento significativo nos níveis de resistência (POL; RUEGG, 2007a).

Rajala-schultz et al. (2009) determinaram a prevalência de resistência antimicrobiana de *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN) isolados antes e depois do tratamento de vaca seca e avaliaram a diversidade e persistência deste grupo de microrganismo sobre o período seco. Estes mesmos autores verificaram a associação de aumento da resistência antimicrobiana para a maioria dos beta-lactâmicos entre animais mais velhos e o tratamento de vaca seca, quando combinados com alta contagem de células somáticas e histórico de mastite clínica.

Busani et al. (2004) desenvolveram uma pesquisa na Itália, entre Junho e setembro de 2002 e entrevistaram por telefone 106 médicos veterinários, para obter informações sobre o uso de antibióticos e sua percepção do problema da resistência antimicrobiana. As respostas sobre o uso de antimicrobianos para a profilaxia foram bastante generalizadas, especialmente quanto ao uso de antimicrobianos intramamários para a prevenção de mastite no período seco. Quase dois terços dos veterinários que prestavam assistência em fazendas leiteiras, responderam realizar e recomendar o tratamento de vaca seca. Esta prática é normalmente utilizada em fazendas leiteiras convencionais para impedir a ocorrência de mastite contagiosa, causada, principalmente por *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *S. dysgalactiae*.

O tratamento de mastite é a maior causa da utilização de antimicrobianos em rebanhos leiteiros. (SAWANT et al., 2005). Diretrizes sobre o uso prudente ou de forma criteriosa de antimicrobianos têm sido desenvolvidas nos últimos anos por diversas organizações internacionais, incluindo a organização mundial de saúde (OMS), organização internacional de epizootias (OIE). Como parte integrante das boas práticas veterinárias, essas diretrizes tem o objetivo de maximizar a eficácia terapêutica e minimizar a seleção de organismos resistentes. Sawant et al. (2005) descreve que algumas dessas práticas incluem manter registro e protocolo de tratamento dos casos de mastite na fazenda. Um dos fatores de risco identificados no presente estudo foi em relação ao não registro dos tratamentos realizados, *S. aureus* isolados de fazendas que não mantinham um registro dos casos de mastite apresentaram 1.652 vezes mais chances de serem resistentes à gentamicina em relação aos *S. aureus* isolados de fazendas que faziam o registro dos tratamentos de mastite.

Um estudo realizado Sawant et al., (2005) sobre o uso de antimicrobianos em produtos lácteos em 13 municípios da Pensilvânia, EUA, mostrou que 50% das explorações leiteiras pesquisadas mantinham registros de tratamento com antimicrobianos. Trinta e dois por cento

dos produtores de leite procuravam assistência veterinária antes de realizar o tratamento e na maioria das fazendas estudadas (93%), os antimicrobianos eram administrados pelo proprietário ou por uma pessoa designada por ele. A administração de medicamentos sem orientações de um médico veterinário foi praticada em 79% das fazendas

Kaneene e Ahl (1987) fizeram um levantamento sobre os produtores de leite em Michigan que realizavam registros dos tratamentos de mastite e constataram que registros insuficientes e pouco conhecimento sobre períodos de carência de drogas entre os produtores foram importantes fatores de risco para presença de resíduos de drogas no leite.

Independentemente da forma pela qual a resistência é adquirida, o uso de agentes antimicrobianos pode favorecer a emergência e a disseminação de bactérias resistentes. Em uma pesquisa com pequenos, médios e grandes produtores de leite em Wisconsin, EUA, Hoe e Ruegg (2006) relataram que 19% dos pequenos produtores (<50 vacas), 18% dos médios produtores (50 a 100 vacas), e 15% dos grandes produtores (100 a 200 vacas) não mantinham registros de tratamentos com antimicrobianos.

Outro fator de risco encontrado no presente estudo foi em relação à sulfonamida e a não utilização de protocolo de tratamento. *S. aureus* isolados de fazendas que não faziam uso de protocolo de tratamento apresentaram 1.644 vezes mais chances de serem resistentes do que aqueles isolados de fazendas que faziam uso de tal prática. Segundo Hoe e Ruegg (2006), protocolos de tratamento escritos são recomendados para ajudar nas práticas e nas decisões de tratamento. Este pressuposto foi confirmado pelos mesmos autores, em um estudo realizado em Wisconsin, EUA. O uso de um protocolo de tratamento por escrito para mastite foi altamente associada com o tamanho do rebanho ($P<0,001$). A maioria dos produtores investigados possuíam grandes rebanhos (75%) e informaram que mantinham um protocolo escrito de tratamento para a mastite, em comparação com 29 e 21% dos produtores com médios ou pequenos rebanhos, respectivamente. Independentemente do tamanho do rebanho, 60% dos protocolos de tratamento foram escritos por um veterinário, cerca de 30% foram escritos por gerentes da própria fazenda, e menos de 1% dos protocolos de tratamento foram provenientes de empresas farmacêuticas. O uso de testes de diagnóstico para mastite clínica também foi associado com o tamanho do rebanho. Uma proporção elevada de produtores de grandes rebanhos (38,9%) realizava cultura de todos os casos clínicos de mastite, em comparação com outros produtores com rebanhos menores. Rebanhos de médio e grande porte apresentaram de 2 a 3 vezes mais chances de examinar o leite do tanque para patógenos causadores de mastite quando comparados com rebanhos menores, 49% dos rebanhos menores nunca tinham apresentado uma amostra de leite de tanque para análise

microbiológica. A facilidade de acesso a esses métodos de diagnóstico pode estar relacionada com o tamanho do rebanho, pois é possível que propriedades maiores tenham mais acesso a este tipo de serviço em comparação aos produtores de rebanhos menores (HOE, RUEGG, 2006).

As principais limitações desta pesquisa foram o pequeno número de rebanhos amostrados ($n=13$), e de variáveis testadas ($n=6$). A coleta de dados foi realizada em apenas uma entrevista. Portanto uma análise cuidadosa deve ser feita ao comparar os dados apresentados neste estudo com outros semelhantes que possam ser realizados no futuro. Os resultados do presente estudo são provenientes de regiões específicas e não devem ser interpretados como representativos da realidade brasileira. Metodologias laboratoriais, histórico da administração de antimicrobianos (droga, dose, frequência), e o tipo de bactéria presente podem variar de acordo com a localização geográfica influenciando os resultados de susceptibilidade. Sendo assim, o desenvolvimento de estudos similares pode sugerir o perfil de tendências na resistência aos antimicrobianos em rebanhos leiteiros brasileiros.

11 CONCLUSÃO

As variáveis que apresentaram associação à susceptibilidade antimicrobiana de *S. aureus* foram o tratamento de mastite clínica para ampicilina, ceftiofur, sulfatrimetropim e sulfonamida; tratamento de vaca seca para enrofloxacino e penicilina; envio de amostras para cultura e antibiograma para tetraciclina e ampicilina, respeito do período de carência para ceftiofur; protocolo de tratamento para penicilina e oxacilina e registro de tratamento para penicilina. O maior fator de risco associado à susceptibilidade de *S. aureus* foi em relação à tetraciclina, penicilina, eritromicina e ampicilina para o não envio de amostras para cultura e antibiograma. Outros dois fatores de risco importantes também identificados foram: tratamento de mastite clínica para ampicilina, ceftiofur, gentamicina, oxacilina e penicilina e tratamento de vaca seca para enrofloxacina e tetraciclina.

12 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os microrganismos mais frequentemente isolados de amostras de leite nos rebanhos estudados foram *Staphylococcus* coagulase negativa e *S. aureus*. Os testes de susceptibilidade realizados para as espécies de *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. apresentaram alto percentual de susceptibilidade para a maioria dos antimicrobianos testados. Com exceção de ampicilina e sulfatrimetropin para os isolados de *Streptococcus agalactiae* e tetraciclina, clindamicina para *S. dysgalactiae*. A maioria dos *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. pesquisados não apresentaram perfil de multirresistência, porém SCN foi o microrganismo com maior número de isolados multirresistentes. Nenhum dos isolados fenotipicamente resistentes a oxacilina/meticilina apresentaram o gene *mecA*.

As variáveis que apresentaram associação à susceptibilidade antimicrobiana de *S. aureus* foram o tratamento de mastite clínica: pra ampicilina, ceftiofur, sulfatrimetropim e sulfonamida; tratamento de vaca seca para enrofloxacino e penicilina; envio de amostras para cultura e antibiograma para tetraciclina e ampicilina, respeito do período de carência para ceftiofur; protocolo de tratamento para penicilina e oxacilina e registro de tratamento para penicilina. O maior fator de risco associado à susceptibilidade de *S. aureus* foi em relação à tetraciclina, penicilina, eritromicina e ampicilina para o não envio de amostras para cultura e antibiograma. Outros dois fatores de risco importantes também identificados foram: tratamento de mastite clínica para ampicilina, ceftiofur, gentamicina, oxacilina e penicilina e tratamento de vaca seca para enrofloxacina e tetraciclina.

REFERÊNCIAS

AARESTRUP, F. M. Monitoring of antimicrobial resistance among food animals: Principles and limitations. **Journal of Veterinary Medicine Series B-Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, v. 51, n. 8-9, p. 380-388, 2004.

AARESTRUP, F. M. Veterinary drug usage and antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 96, n. 4, p. 271-281, 2005.

AARESTRUP, F. M.; JENSER, L. B. Use of antimicrobials in food animal production foodborne diseases. In: **SIMJEE, S. (Ed.)**. Humana Press, 2007. p.405-417.

AARESTRUP, F. M., WEGENER, H. C., ROSDAHL, V. T. Evaluation of phenotypic and genotypic methods for epidemiological typing of *Staphylococcus aureus* in Denmark. **Veterinary Microbiology**, v.45, p. 139-50, 1995.

AARTS, H. J. M.; BOUMEDINE, K. S.; NESME, X.; CLOECKAERT, A. Molecular tools for the characterisation of antibiotic-resistant bacteria. **Veterinary Research**, v. 32, n. 3-4, p. 363-380, 2001.

ACAR, M. Antimicrobial resistance at farm level. **Revue Scientifique Et Technique -Office International Des Epizooties**, v. 25, n. 2, p. 775-792, 2006.

ACAR, R. Antimicrobial resistance: an overview. **Revue Scientifique Et Technique -Office International Des Epizooties**, v. 20, n. 3, p. 797-810, 2001.

ANDRADE, U.V.C.; HARTMANN W.;MASSON M.L..Isolamento microbiológico, contagem de células somáticas e contagem bacteriana total em amostras de leite. **Ars Veterinária**,v. 25, n. 3, p.129-135, 2009.

ANDRÉ, M. C. D. P. B.; SANTOS, P. P.; CAMPOS, M. R. H.; BORGES, L. J.; SERAFINI, Á. B. Utilização do antibiograma como ferramenta de tipagem fenotípica de *Staphylococcus aureus* isolados de manipuladores , leite cru e queijo minas frescal em laticínio de Goiás, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, n., p. 102-108, 2006.

ANDREWS, A. H.; BLOWEY, R. W.; BOYD, H.; EDDY, R. G. **Medicina bovina: doenças e criação de bovinos**. 2.ed. São Paulo: Roca, 2008, p.1080.

BAGER, F. DANMAP: monitoring antimicrobial resistance in Denmark. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 14, n. 4, p. 271-274, 2000.

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, D. D.; PAAPE, M. J.; LEE, J. W.; ZHAO, X.; HOPE, J. C.; RAINARD, P. Escherichia coli and Staphylococcus aureus elicit differential innate immune responses following intramammary infection. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 11, n. 3, p. 463-472, 2004.

BARBALHO, T. C. F.; MOTA, R. A. Isolamento de agentes bacterianos envolvidos em mastite subclínica bovina no estado de Pernambuco. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 2, p. 31-36, 2001.

BARKEMA, H. W.; GREEN, M. J.; BRADLEY, A. J.; ZADOKS, R. N. Invited review: the role of contagious disease in udder health. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 10, p. 4717-4729, 2009.

BARKEMA, H. W.; SCHUKKEN, Y. H.; ZADOKS, R. N. Invited review: the role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine Staphylococcus aureus mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 6, p. 1877-1895, 2006.

BARLOW, J. Mastitis therapy and antimicrobial susceptibility: a multispecies review with a focus on antibiotic treatment of mastitis in dairy cattle. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 16, n. 4, p. 383-407, 2011.

BENGTTSSON; UNNERSTAD, H. E.; EKMAN, T.; ARTURSSON, K.; NILSSON-OST, M.; WALLER, K. P. Antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of acute clinical mastitis in dairy cows. **Veterinary Microbiology**, v. 136, n. 1-2, p. 142-149, 2009.

BEXIGA, R.; CAVACO, L. M.; VILELA, C. L. Mastites subclínicas bovinas na zona do Ribatejo-Oeste. **Revista da Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 100, p. 9-44, 2005.

BHATT, V. D.; PATEL, M. S.; JOSHI, C. G.; KUNJADIA, A. Identification and antibiogram of microbes associated with bovine mastitis. **Animal Biotechnology**, v. 22, n. 3, p. 163-169, 2011.

BOCHNIARZ, M.; WAWRON, W. Antibiotic susceptibility of methicillin-resistant and methicillin-susceptible coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 14, n. 3, p. 405-410, 2011.

BOTREL, M. A.; HAENNI, M.; MORIGNAT, E.; SULPICE, P.; MADEC, J. Y.; CALAVAS, D. Distribution and antimicrobial resistance of clinical and subclinical mastitis pathogens in dairy cows in Rhone-Alpes, France. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 7, n. 5, p. 479-487, 2010.

BRADFORD, P. A. Extended-Spectrum β -Lactamases in the 21st Century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 4, p. 933-951, 2001.

BRADLEY, A. J. Bovine mastitis: an evolving disease. **The Veterinary Journal**, v. 164, n. 2, p. 116-128, 2002.

BRITO, M. A.V. P.; BRITO, J. R. F. Produção científica brasileira sobre mastite bovina. In: BRITO, J. R. F., BRESSAN, M. (Ed.). **Controle integrado da mastite bovina**. Juiz de Fora: EMBRAPA/CNPGL, 1996. p. 68-96.

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. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.51, p.129-135, 1999.

BRITO, M. A.V. P.; BRITO, J. R. F.; SILVA, M. A. S.; CARMO, R.A. Concentração mínima inibitória de dez antimicrobianos para amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de infecção intramamária bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 5, p. 531-537, 2001.

BUSANI, L.; GRAZIANI, C.; FRANCO, A.; DI EGIDIO, A.; BINKIN, N.; BATTISTI, A. Survey of the knowledge, attitudes and practice of Italian beef and dairy cattle veterinarians concerning the use of antibiotics. **Veterinary Record**, v. 155, n. 23, p. 733-738, 2004.

CALVINHO, L. F.; ALMEIDA, R. A.; OLIVER, S. P. Potential virulence factors of *Streptococcus dysgalactiae* associated with bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v. 61, n.1-2, p. 93-110, 1998.

CALVINHO, L. F.; TOSELLI, F. G.; WEIMANN, W. R.; CANAVESIO, V. R.; NEDER, V. F.; IGUZQUIZA, I. A. Susceptibilidad a antimicrobianos de cepas de estafilococos coagulase positivas aisladas de mastites bovina en la cuenca lechera central de la Argentina. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 34, p. 171-5, 2002.

CAPRIOLI, A.; BUSANI, L.; MARTEL, J. L.; HELMUTH, R. Monitoring of antibiotic resistance in bacteria of animal origin: epidemiological and microbiological methodologies. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 14, n. 4, p. 295-301, 2000.

CARDOSO, H. F. T.; COSTA, G. M.; SILVA, N. Susceptibilidade a antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* isolados de leite bovino no Estado de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 22, p. 199-203, 2000.

CHAMBERS, H. F. Methicillin resistance in staphylococci: Molecular and biochemical basis and clinical implications. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, n. 4, p. 781-791, 1997.

CIFTCI, A.; FINDIK, A.; ONUK, E. E.; SAVASAN, S. Detection of methicillin resistance and slime factor production of *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis. **Febs Journal**, v. 276, n., p. 102-102, 2009.

CLARKE, C. R. Antimicrobial resistance. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 36, n. 5, p. 987-1001, 2006.

CLOETE, T. E. Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 51, n. 4, p. 277-282, 2003.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**: eighteenth informational Wayne, PA, USA: CLSI; 2008. Supplement M100-S18.

CONTRERAS, G.; RODRÍGUEZ, J. Mastitis: comparative etiology and epidemiology. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 16, n. 4, p. 339-356, 2011.

COOKSEY, R. C. Chapter 13 mechanisms of resistance to antibacterial agents. In: BITTAR, E. E.; NEVILLE, B. (Ed.). **Principles of medical biology**. Elsevier, 1998. v. 9, p.199-214.

CORREA, I.; CORREA, M. G. P.; MARIN, J. M. Antimicrobial susceptibility of strains of coagulase-positive *Staphylococcus* isolated from mastitic bovine milk. **ArsVeterinária**, v. 21, p. 69-76, 2005.

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, 2000. **Series B**.

CRAIG, W. A. Antibacterial therapy. In: GOLDMAN, L; AUDIELL, D. **Cecil textbook medicine**. 22. ed. Saunders, 2004. p.926-1853.

DE OLIVEIRA, A. P.; WATTS, J. L.; SALMON, S. A.; AARESTRUP, F. M. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Europe and the United States. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 4, p. 855-862, 2000.

DEHAUMONT P. OIE International standards on antimicrobial resistance. **Journal Veterinary Medicine**, v. 51, p. 411–414, 2004.

DENAMIEL, G.; LLORENTE, P.; CARABELLA, M.; REBUELTO, M.; GENTILINI, E. Anti-microbial susceptibility of *Streptococcus* spp. isolated from bovine mastitis in Argentina. **Journal of Veterinary Medicine Series B-Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, v. 52, n. 3, p. 125-128, 2005.

DINIZ, C. M.; MELO, R. T. D.; MENDONÇA, E. P.; COELHO, L. R.; FONSECA, B. B.; ROSSI, D. A. Resistência a oxacilina em *Staphylococcus* spp isolado de leite mastítico. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, p. 482-488, 2010.

DUARTE, R. S.; MIRANDA, O. P.; BELLEI, B. C.; BRITO, M. A. V. P.; TEIXEIRA, L. M. Phenotypic and molecular characteristics of *Streptococcus agalactiae* isolates recovered from milk of dairy cows in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 9, p. 4214-4222, 2004.

EL BEHIRY, A.; SCHLENKER, G.; SZABO, I.; ROESLER, U. In vitro susceptibility of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with subclinical mastitis to different antimicrobial agents. **Journal of Veterinary Science**, v. 13, n. 2, p. 153-161, 2012.

ERSKINE, R. J.; WALKER, R. D.; BOLIN, C. A.; BARTLETT, P. C.; WHITE, D. G. Trends in antibacterial susceptibility of mastitis pathogens during a seven-year period. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 5, p. 1111-1118, 2002.

ERSKINE, R. J.; WAGNER, S.; DEGRAVES, F. J. Mastitis therapy and pharmacology. **Veterinary Clinics of North America-Food Animal Practice**, v. 19, n. 1, p. 109, 2003.

FERREIRA, J. L.; LINS, J. L. H. A.; CAVALCANTE, T. V.; MACEDO, N. A.; BORJAS, A. Prevalência e etiologia da mastite bovina no município de Teresina, Piauí. **Ciência Animal Brasileira**, v. 8, n. 2, p. 261-266, abr./jun. 2007.

FINRES-VET. 2007. Finnish veterinary antimicrobial resistance monitoring and consumption of antimicrobial agents, 2005–2006. **Finnish Food Safety Authority Evira, Helsinki, Finland**. Disponível em: <<http://www.evira.fi/portal/en/evira/publications/?a=view&productId=178>>. Acesso em: 22 ago. 2012.

FISHER, J. F.; MEROUEH, S. O.; MOBASHERY, S. Bacterial resistance to β -Lactam antibiotics: compelling opportunism, compelling opportunity. **Chemical Reviews**, v. 105, n. 2, p. 395-424, 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.; REBUELTO, M.; FERMEPIN, M. R.; DE TORRES, R. A. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis in Argentina. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 8, p. 1913-1917, 2002.

GENTILINI, E.; DENAMIEL, G.; LLORENTE, P.; GODALY, S.; REBUELTO, M.; DEGREGORIO, O. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Argentina. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 6, p. 1224-1227, 2000.

GIANNEECHINI, R.; CONCHA, C.; RIVERO, R.; DELUCCI, I.; LOPEZ, J. M. Occurrence of clinical and sub-clinical mastitis in dairy herds in the West Littoral Region in Uruguay. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 43, n. 4, p. 221-230, 2002.

GILLESPIE, B. E.; HEADRICK, S. I.; BOONYAYATRA, S.; OLIVER, S. P. Prevalence and persistence of coagulase-negative *Staphylococcus* species in three dairy research herds. **Veterinary Microbiology**, v. 134, n. 1-2, p. 65-72, 2009.

GRAAT, E. A. M.; FRANKENA, K.; BOS, H. Principles and methods of sampling in animal diseases surveys. In: NOORDHUIZEN, J. P. T. M.; FRANKENA, K.; VAN DER HOOFT, C. M. **Application of quantitative methods in veterinary epidemiology**. Wageningen: WageningenPers, 1997. p.31-62.

GUERIN-FAUBLEE, V.; TARDY, F.; BOUVERON, C.; CARRET, G. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus* species isolated from clinical mastitis in dairy cows. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 19, n. 3, p. 219-226, 2002.

GÜLER, L.; OK, Ü.; GÜNDÜZ, K.; GÜLCÜ, Y.; HADIMLI, H. H. Antimicrobial susceptibility and coagulase gene typing of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis cases in Turkey. **Journal Dairy Science**, v. 88, n. 9, p. 3149-3154, 2005.

HALASA, T.; HUIJPS, K.; OSTERAS, O.; HOGVEEN, H. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: a review. **Veterinary Quarterly**, v. 29, n. 1, p. 18-31, 2007.

HAMMERUM, A. M.; HEUER, O. E.; EMBORG, H.-D.; BAGGER-SKJOT, L.; JENSEN, V. F.; ROGUES, A. M.; SKOV, R. L.; AGERSO, Y.; BRANDT, C. T.; SEYFARTH, A. M.; MULLER, A.; HOVGGAARD, K.; AJUFO, J.; BAGER, F.; AARESTRUP, F. M.; FRIMODT-MOLLER, N.; WEGENER, H. C.; MONNET, D. L. Danish integrated antimicrobial in

resistance monitoring and research program. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 11, p. 1632-1639, 2007.

HARAN, K. P.; GODDEN, S. M.; BOXRUD, D.; JAWAHIR, S.; BENDER, J. B.; SREEVATSAN, S. Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus*, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, isolated from bulk tank milk from Minnesota dairy farms. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 3, p. 688-695, 2012.

HAWKEY, P. M. Mechanisms of quinolone action and microbial response. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, p. 29-35, 2003. Suplemento 1.

HENDRIKSEN, R. S.; MEVIUS, D. J.; SCHROETER, A.; TEALE, C.; MEUNIER, D.; BUTAYE, P.; FRANCO, A.; UTINANE, A.; AMADO, A.; MORENO, M.; GREKO, C.; STAERK, K.; BERGHOLD, C.; MYLLYNIEMI, A. L.; WASYL, D.; SUNDE, M.; AARESTRUP, F. M. Prevalence of antimicrobial resistance among bacterial pathogens isolated from cattle in different European countries: 2002-2004. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 50, n. 28, p.(?), 2008.

HOE, F. G. H.; RUEGG, P. L. Opinions and practices of Wisconsin dairy producers about biosecurity and animal well-being. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 6, p. 2297-2308, 2006.

HOGAN, J. S.; GONZALEZ, R. N.; HARMON, R. J.; NICKERSON, S. C.; OLIVER, S. P.; PANKEY, J. W.; SMITH, K. L. **Laboratory handbook on bovine mastitis**. Madison, WI: National Mastitis Council, 1999.

HOGVEEN, H.; HUIJPS, K.; LAM, T. J. G. M. Economic aspects of mastitis: new developments. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 59, n. 1, p. 16-23, 2011.

HOLMES, M. A.; ZADOKS, R. N. Methicillin resistant *S. aureus* in human and bovine mastitis. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 16, n. 4, p. 373-382, 2011.

HORTET, P.; SEEGER, H. Loss in milk yield and related composition changes resulting from clinical mastitis in dairy cows. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 37, n. 1-4, p. 1-20, 1998.

HUBER, H.; GIEZENDANNER, N.; STEPHAN, R.; ZWEIFEL, C. Genotypes, Antibiotic resistance profiles and microarray-based characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from Livestock and veterinarians in Switzerland. **Zoonoses and Public Health**, v. 58, n. 5, p. 343-349, 2011.

KALMUS, P.; AASMAE, B.; KARSSIN, A.; ORRO, T.; KASK, K. Udder pathogens and their resistance to antimicrobial agents in dairy cows in Estonia. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 53, n.4, p.2-7, 2011.

KANEENE, J. B.; AHL, A. S. Drug residues in dairy cattle industry: epidemiological evaluation of factors influencing their occurrence. **Journal of Dairy Science**, v. 70, n. 10, p. 2176-2180, 1987.

KHAN, S. A.; NAWAZ, M. S.; KHAN, A. A.; STEELE, R. S.; CERNIGLIA, C. E. Characterization of erythromycin-resistant methylase genes from multiple antibiotic resistant *Staphylococcus* spp isolated from milk samples of lactating cows. **American Journal of Veterinary Research**, v. 61, n. 9, p. 1128-1132, 2000.

KUMAR, R.; YADAV, B. R.; SINGH, R. S. Genetic determinants of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from milk of mastitic crossbred cattle. **Current Microbiology**, v. 60, n. 5, p. 379-386, 2010.

LANGE, C., CARDOSO, M., SENCZEK, D., SCHWARZ, S. Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* isolates from cases of bovine mastitis in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 67, p. 127-41, 1999.

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.

LEE, J. H. Methicillin (oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 11, p. 6489-6494, 2003.

LLEWELYN, M.; COHEN, J. Superantigens: microbial agents that corrupt immunity. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 2, n. 3, p. 156-162, 2002.

LUETHJE, P.; SCHWARZ, S. Molecular analysis of constitutively expressed *erm(C)* genes selected in vitro in the presence of the non-inducers pirlimycin, spiramycin and tylosin. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, n. 1, p. 97-101, 2007.

LUTHJE, P.; SCHWARZ, S. Molecular basis of resistance to macrolides and lincosamides among staphylococci and streptococci from various animal sources collected in the resistance monitoring program BfT-GermVet. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 29, n. 5, p. 528-535, 2007.

MACHADO, T. R. O.; CORREA, M. G.; MARIN, J. M. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative *Staphylococci* isolated from mastitic cattle in Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, p. 278-282, 2008.

MAKOVEC, J. A.; RUEGG, P. L. Antimicrobial resistance of bacteria isolated from dairy cow milk samples submitted for bacterial culture: 8,905 samples (1994-2001). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 222, n. 11, p. 1582-1589, 2003.

MALINOWSKI, E.; KLOSSOWSKA, A.; KACZMAROWSKI, M.; LASSA, H.; KUZMA, K. Antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from affected with mastitis cows. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v. 46, n. 2, p. 289-294, 2002.

MARTINEAU, F.; PICARD, F. J.; LANSAC, N.; MENARD, C.; ROY, P. H.; OUELLETTE, M.; BERGERON, M. G. Correlation between the resistance genotype determined by multiplex PCR assays and the antibiotic susceptibility patterns of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 2, p. 231-238, 2000.

MARTINS, R. P.; MARQUES, M. R. H.; NETO, A. C. Etiologia da mastite subclínica em vacas do rebanho de uma queijaria em Nossa Senhora do Livramento, MT. **Revista Higiene Alimentar**, v. 20, n. 13, p. 104-110, 2006.

MATHEW, A. G.; CISELL, R.; LIAMTHONG, S. Antibiotic resistance in bacteria associated with food animals: a United States perspective of livestock production. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 4, n. 2, p. 115-133, 2007.

MEDEIROS, E. S.; MOTA, R. A.; SANTOS, M. V.; FREITAS, M. F. L.; PINHEIRO JÚNIOR, J. W.; TELES, J. A. A. Perfil de sensibilidade microbiana in vitro de linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de vacas com mastite subclínica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n.(?), p. 569-574, 2009.

MEDEIROS, M. I. M.; SOUZA, L. C. Associação de agentes patogênicos isolados em análise microbiológica da água, com a presença de mastite clínica ou subclínica, em vacas de propriedades leiteiras da Região de Cerqueira César – SP. **Ciência Agrotécnica**, v. 33, n. 2, p. 580-585, 2009.

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

MIDDLETON, J. R.; FALES, W. H.; LUBY, C. D.; OAKS, J. L.; SANCHEZ, S.; KINYON, J. M.; WU, C. C.; MADDOX, C. W.; WELSH, R. D.; HARTMANN, F. Surveillance of *Staphylococcus aureus* in veterinary teaching hospitals. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 2916-2919, 2005.

MOON, J. S.; LEE, A. R.; KANG, H. M.; LEE, E. S.; KIM, M. N.; PAIK, Y. H.; PARK, Y. H.; JOO, Y. S.; KOO, H. C. Phenotypic and Genetic Antibigram of Methicillin-Resistant

Staphylococci Isolated from bovine mastitis in Korea. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 3, p. 1176-1185, 2007.

MORONI, P.; PISONI, G.; ANTONINI, M.; VILLA, R.; BOETTCHER, P.; CARLI, S. Short communication: antimicrobial drug susceptibility of *Staphylococcus aureus* from subclinical bovine mastitis in Italy. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 8, p. 2973-2976, 2006.

MYLLYS, V.; ASPLUND, K.; BROFELDT, E.; HIRVELA-KOSKI, V.; HONKANEN-BUZALSKI, T.; JUNTILA, J.; KULKAS, L.; MYLLYKANGAS, O.; NISKANEN, M.; SALONIEMI, H.; SANDHOLM, M.; SARANPAA, T. Bovine mastitis in Finland in 1988 and 1995 - changes in prevalence and antimicrobial resistance. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 39, n. 1, p. 119-126, 1998.

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

NADER FILHO, A.; FERREIRA, L. M.; ROSSI, J. R. O.; OLIVEIRA, R. P. Sensibilidade antimicrobiana dos *Staphylococcus aureus* isolados no leite de vacas com mastite. In: **Anais...** Porto Alegre, p.311-315, 2006.

NAM, H. M.; LEE, A. L.; JUNG, S. C.; KIM, M. N.; JANG, G. C.; WEE, S. H.; LIM, S. K. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Korea. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 8, n. 2, p. 231-238, 2011.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL. **Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection and determination of milk quality**. 4. ed. Verona: NMC, 2004. p. 47.

ODIERNO, L.; CALVINHO, L.; TRAVERSSA, P.; LASAGNO, M.; BOGNI, C.; REINOSO, E. Conventional identification of *Streptococcus uberis* isolated from bovine mastitis in Argentinean dairy herds. **Journal Dairy Science**, v. 89, n. 10, p. 3886-3890, 2006.

OIE. World Organization for Animal Health. Laboratory methodologies for bacterial antimicrobial susceptibility testing. In: OIE. **Manual of diagnostic tests and vaccine for terrestrial animals**. Paris: OIE, 2008a. (Capítulo 1.1.6, p. 56-65). Disponível em <http://www.oie.int/Eng/Normes/Mmanual/A_summry.htm>. Acesso em: 20 nov. 2011.

OIE. World Organization for Animal Health. Harmonisation of national antimicrobial resistance surveillance and monitoring programs. In: OIE. **Terrestrial animal healthcode**. Paris: OIE, 2008b. (Capítulo 6.5. p. 1-7). Disponível em <http://www.oie.int/eng/normes/Mcode/en_sommaire.htm>. Acesso em : 20 nov. 2011.

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

OLIVEIRA, A. A. F.; MOTA, R. A.; SOUZA, M. I. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* frente a amostras de *Staphylococcus* spp. Isoladas de mastite subclínica bovina no agreste meridional de Pernambuco. **A Hora Veterinária**, v. 127, p. 8-10, 2002.

OLIVEIRA, C. M. C.; SOUSA, M. G. S.; SILVA, N. S.; MENDONÇA, C. L.; SILVEIRA, J. A. S.; OAIGEN, R. P.; ANDRADE, S. J. T.; BARBOSA, J. D. Prevalência e etiologia da mastite bovina na bacia leiteira de Rondon do Pará, Estado do Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 2, p. 104-110, 2011.

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

OLIVER, S. P.; MURINDA, S. E. Antimicrobial resistance of mastitis pathogens. **Veterinary Clinics of North America-Food Animal Practice**, v. 28, n. 2, p. 165-+, 2012.

OWENS, W. E.; RAY, C. H.; WATTS, J. L.; YANCEY, R. J. Comparison of success of antibiotic therapy during lactation and results of antimicrobial susceptibility tests for bovine mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 2, p. 313-317, 1997.

PARK, Y. K.; FOX, L. K.; HANCOCK, D. D.; MCMAHAN, W.; PARK, Y. H. Prevalence and antibiotic resistance of mastitis pathogens isolated from dairy herds transitioning to organic management. **Journal of Veterinary Science**, v. 13, n. 1, p. 103-105, 2012.

PEREIRA, V.; LOPES, C.; CASTRO, A.; SILVA, J.; GIBBS, R.; TEIXEIRA, P. Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. **Food Microbiology**, v. 26, n. 3, p. 278-282, 2009.

PETROVSKI, K. R.; LAVEN, R. A.; LOPEZ-VILLALOBOS, N. A descriptive analysis of the antimicrobial susceptibility of mastitis-causing bacteria isolated from samples submitted to commercial diagnostic laboratories in New Zealand (2003-2006). **New Zealand Veterinary Journal**, v. 59, n. 2, p. 59-66, 2011.

PHUEKTES, P.; BROWNING, C. F.; ANDERSON, G.; MANSELL, P. D. Multiplex polymerase chain reaction as a mastitis screening test for *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* and *Streptococcus uberis* in bulk milk samples. **Journal of Dairy Research**, v. 70, n. 2, p. 149-155, 2003.

PIDDOCK, L. J. V.; HART, C. A.; JOHNSTON, A. M.; TAYLOR, D. Review of the literature on antibiotic resistance in foodborne pathogens. **Asm News**, v. 64, n. 6, p. 311-312, 1998.

PIEPERS, S.; DE MEULEMEESTER, L.; DE KRUIF, A.; OPSOMER, G.; BARKEMA, H. W.; DE VliegHER, S. Prevalence and distribution of mastitis pathogens in subclinically infected dairy cows in Flanders, Belgium. **Journal of Dairy Research**, v. 74, n. 4, p. 478-483, 2007.

PITKALA, A.; HAVERI, M.; PYORALA, S.; MYLLYS, V.; HONKANEN-BUZALSKI, T. Bovine mastitis in Finland 2001 - prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 8, p. 2433-2441, 2004.

POL, M.; RUEGG, P. L. Mastitis treatment practices on organic dairy herds. **Journal of Animal Science**, v. 84, n.1, p. 10-10, 2006.

POL, M.; RUEGG, P. L. Relationship between antimicrobial drug usage and antimicrobial susceptibility of gram-positive mastitis pathogens. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 1, p. 262-273, 2007a.

POL, M.; RUEGG, P. L. Treatment practices and quantification of antimicrobial drug usage in conventional and organic dairy farms in Wisconsin. **Journal Dairy Science**, v. 90, n. 1, p. 249-261, 2007b.

PRABHU, N. K.; WILFRED, S. R.; HEGDE, R.; KUMAR, N. G. S. Methicillin resistance pattern of *Staphylococcus aureus* from mastitis milk in correlation to its possession of methicillin resistance gene. **Milchwissenschaft-Milk Science International**, v. 67, n. 2, p. 151-154, 2012.

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

RAJALA-SCHULTZ, P. J.; SMITH, K. L.; HOGAN, J. S.; LOVE, B. C. Antimicrobial susceptibility of mastitis pathogens from first lactation and older cows. **Veterinary Microbiology**, v. 102, n. 1-2, p. 33-42, 2004.

RAJALA-SCHULTZ, P. J.; TORRES, A. H.; DEGRAVES, F. J.; GEBREYES, W. A.; PATCHANEE, P. Antimicrobial resistance and genotypic characterization of coagulase-negative *staphylococci* over the dry period. **Veterinary Microbiology**, v. 134, n. 1-2, p. 55-64, 2009.

RATO, M.; ROLO, D.; BEXIGA, R.; NUNES, S. F.; CAVACO, L. M.; VILELA, C. L.; SANTOS-SANCHES, I. Antimicrobial resistance patterns and genotypes of *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus dysgalactiae ssp dysgalactiae* from bovine mastitis in Portuguese dairy farms. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 29, p. 265-266, 2007.

REINOSO, E. B.; LASAGNO, M. C.; DIESER, S. A.; ODIERNO, L. M. Distribution of virulence-associated genes in *Streptococcus uberis* isolated from bovine mastitis. **Fems Microbiology Letters**, v. 318, n. 2, p. 183-188, 2011.

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

RIEKERINK, R. G. M. O.; BARKEMA, H. W.; KELTON, D. F.; SCHOLL, D. T. Incidence rate of clinical mastitis on Canadian dairy farms. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 4, p. 1366-1377, 2008.

ROSEC, J. P.; GIGAUD, O. Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. **International Journal of Food Microbiology**, v. 77, n.1-2, p. 61-70, 2002.

ROSSITTO, P. V.; RUIZ, L.; KIKUCHI, Y.; GLENN, K.; LUIZ, K.; WATTS, J. L.; CULLOR, J. S. Antibiotic susceptibility patterns for environmental streptococci isolated from bovine mastitis in central California dairies. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 1, p. 132-138, 2002.

RUSSI, N. B.; BANTAR, C.; CALVINHO, L. F. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* causing bovine mastitis in Argentine dairy herds. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 40, n. 2, p. 116-119, 2008.

SABOUR, P. M.; GILL, J. J.; LEPP, D.; PACAN, J. C.; AHMED, R.; DINGWELL, R.; LESLIE, K. Molecular typing and distribution of *Staphylococcus aureus* isolates in Eastern Canadian dairy herds. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 8, p. 3449-3455, 2004.

SAINI, V.; MCCLURE, J. T.; LÉGER, D.; DUFOUR, S.; SHELDON, A. G.; SCHOLL, D. T.; BARKEMA, H. W. Antimicrobial use on Canadian dairy farms. **Journal Dairy Science**, v. 95, n. 3, p. 1209-1221, 2012.

SAKWINSKA, O.; MORISSET, D.; MADEC, J. Y.; WALDVOGEL, A.; MOREILLON, P.; HAENNI, M. Link between genotype and antimicrobial resistance in bovine mastitis-related *Staphylococcus aureus* strains, determined by comparing Swiss and French isolates from the Rhone Valley. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 10, p. 3428-3432, 2011.

SALISBURY, J. G.; NICHOLLS, T. J.; LAMMERDING, A. M.; TURNIDGE, J.; NUNN, M. J. A risk analysis framework for the long-term management of antibiotic resistance in food-producing animals. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 20, n. 3, p. 153-164, 2002.

SALYERS, A. A. An overview of the genetic basis of antibiotic resistance in bacteria and its implications for agriculture. **Animal Biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 1-5, 2002.

SANTOS, C. D. M.; LEAL, G. S.; ROSSI, D. A. Frequência e suscetibilidade a antimicrobianos de *Staphylococcus spp* isolados de leite de vacas com mastites recorrentes de rebanhos da região de Uberlândia – MG. **Veterinária Notícias**, v. 12, n. 2, p. 83-88, 2006.

SANTOS, E. M. P.; BRITO, M. A. V. P.; LANGE, C.; BRITO, J. R. F.; CERQUEIRA, M. M. O. P. *Streptococcus* e gêneros relacionados como agentes etiológicos de mastite bovina. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, p. 17-27, 2007

SAMPIMON, O.; BARKEMA, H. W.; BERENDS, I.; SOL, J.; LAM, T. Prevalence of intramammary infection in Dutch dairy herds. **Journal of Dairy Research**, v. 76, n. 2, p. 129-136, 2009.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. **SAS user's guide: statistics**. Institute Inc. Versão 9.22. Cary: SAS, 2010.

SAWANT, A. A.; SORDILLO, L. M.; JAYARAO, B. M. A survey on antibiotic usage in dairy herds in Pennsylvania. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 8, p. 2991-2999, 2005.

SCHLEGLOVA, J.; RYSANEK, D.; SEDIVA, I.; BABAK, V. Comparison of methods for the determination of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 48, n. 1, p. 21-29, 2001. **Series B-Infectious Diseases and Veterinary Public Health**.

SCHUKKEN, Y. H.; GONZALEZ, R. N.; TIKOFSKY, L. L.; SCHULTE, H. F.; SANTISTEBAN, C. G.; WELCOME, F. L.; BENNETT, G. J.; ZURAKOWSKI, M. J.; ZADOKS, R. N. CNS mastitis: nothing to worry about? **Veterinary Microbiology**, v. 134, n. 1-2, p. 9-14, 2009.

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.

SCHWARZ, S.; SILLEY, P.; SIMJEE, S.; WOODFORD, N.; VAN DUIJKEREN, E.; JOHNSON, A. P.; GAASTRA, W. Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. **Veterinary Microbiology**, v. 141, n. 1-2, p. 1-4, 2010.

SEKKIN, S.; KUM, C.; KIRKAN, S.; GULES, O.; AKAR, F. The Efficacy of a Cefoperazone - Danofloxacin combination in the treatment of subclinical mastitis in dairy cows caused by *Staphylococcus aureus*. **Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi**, v. 16, n. 1, p. 97-104, 2010.

SHI, D.; HAO, Y.; ZHANG, A.; WULAN, B.; FAN, X. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in China. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 57, n. 4, p. 221-224, 2010.

SHPIGEL, N. Y.; KASS, P. H.; SARAN, A. A comparative randomized field trial on intramammary and intramuscular dry cow antibiotic treatment of subclinical *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy cows. **Journal of Veterinary Medicine** v. 53, n. 8, p. 418-422, 2006. **Series a-Physiology Pathology Clinical Medicine**.

SOARES, L. D. C.; PEREIRA, I. A.; COELHO, S. D. M. D. O.; CUNHA, C. M. M. D.; OLIVEIRA, D. F. B. D.; MIRANDA, A. N.; SOUZA, M. M. S. D. Caracterização fenotípica da resistência a antimicrobianos e detecção do gene *mecA* em *Staphylococcus spp.* coagulase-negativos isolados de amostras animais e humanas. **Ciência Rural**, v. 38. 1346-1350, 2008.

SORDILLO, L. M. New concepts in the causes and control of mastitis. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 16, n. 4, p. 271-273, 2011.

SOUZA, G. N.; BRITO, J. R. F.; MOREIRA, E. C.; BRITO, M. A. V. P. SILVA, M. V. G. B. Variação da contagem de células somáticas em vacas leiteiras de acordo

com patógenos da mastite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 5, p. 1015-1020, 2009.

SOUZA, G. N.; BRITO, J. R. F.; MOREIRA, E. C.; BRITO, M. A. V. P.; SILVA, M. V. G. B. Fatores de risco para mastite subclínica causada por *Streptococcus agalactiae* em vacas leiteiras de rebanhos da região Sudeste do Brasil. In: 9 Congresso Panamericano do Leite, 2006, Porto Alegre. **Anais...** Rio Grande do Sul, p. 255-259, 2006.(ver modelo de Congresso)

SPOHR, M.; RAU, J.; FRIEDRICH, A.; KLITTICH, G.; FETSCH, A.; GUERRA, B.; HAMMERL, J. A.; TENHAGEN, B. A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in three dairy herds in southwest Germany. **Zoonoses and Public Health**, v. 58, n. 4, p. 252-261, 2011.

TAPONEN, S.; KOORT, J.; BJORKROTH, J.; SALONIEMI, H.; PYORALA, S. Bovine intramammary infections caused by coagulase-negative staphylococci may persist throughout lactation according to amplified fragment length polymorphism-based analysis. **Journal Dairy Science**, v. 90, n. 7, p. 3301-3307, 2007.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos**. São

Paulo: Atheneu, 2002. 1216 p.

TENHAGEN, B. A.; KOSTER, 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.

TENOVER, F. C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **The American Journal of Medicine**, v. 119, n. 6, p. S3-S10, 2006. Supplement 1,

TENSON, T.; MANKIN, A. Antibiotics and the ribosome. **Molecular Microbiology**, v. 59, n. 6, p. 1664-1677, 2006.

THORBERG, B. M.; DANIELSSON-THAM, M. L.; EMANUELSON, U.; WALLER, K. P. Bovine subclinical mastitis caused by different types of coagulase-negative staphylococci. **Journal Dairy Science**, v. 92, n. 10, p. 4962-4970, 2009.

TIKOFISKY, L. L.; BARLOW, J. W.; SANTISTEBAN, C.; SCHUKKEN, Y. H. A comparison of antimicrobial susceptibility patterns for *Staphylococcus aureus* in organic and conventional dairy herds. **Microbial Drug Resistance-Mechanisms Epidemiology and Disease**, v. 9, n. 1, p. 39-45, 2003.

TURUTOGLU, H.; HASOKSUZ, M.; OZTURK, D.; YILDIRIM, M.; SAGNAK, S. Methicillin and aminoglycoside resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis and sequence analysis of their *mecA* genes. **Veterinary Research Communications**, v. 33, n. 8, p. 945-956, 2009a.

VAN HOEK, A. H. A. M.; MEVIUS, D.; GUERRA, B.; MULLANY, P.; ROBERTS, A. P.; AARTS, H. J. M. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, 2011.

WAAGE, S. Comparison of two regimens for the treatment of clinical bovine mastitis caused by bacteria sensitive to penicillin. **Veterinary Record**, v. 141, n. 24, p. 616-620, 1997.

WANG, Y.; C.M. WU; L.M. LU; G.W; N. REN; X.Y. CAO; J.Z. SHEN. Macrolide-lincosamide-resistant phenotypes and genotypes of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis. **Veterinary Microbiology**, 130:118-12, 2008.

WANNMACHER, L. Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: uma guerra perdida?. **Uso Racional de Medicamentos**, v. 1, n. 4, p. 1-6, 2004.

WATTS, J. L.; S. A. SALMON. Activity of selected antimicrobial agents against strains of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infections that produce β -lactamase. **Journal Dairy Science**, v. 80, p. 788–791, 1997.

WYDER, A. B.; BOSS, R.; NASKOVA, J.; KAUFMANN, T.; STEINER, A.; GRABER, H. U. Streptococcus spp. and related bacteria: their identification and their pathogenic potential for chronic mastitis - a molecular approach. **Research in Veterinary Science**, v. 91, n. 3, p. 349-357, 2011.

ZADOKS, R. N.; FITZPATRICK, J. L. Changing trends in mastitis. **Irish Veterinary Journal**, v. 62, n.2, p. 59-70, 2009.

ZADOKS, R. N.; MIDDLETON, J. R.; MCDOUGALL, S.; KATHOLM, J.; SCHUKKEN, Y. H. Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and comparative relevance to humans. **Journal Mammary Gland Biology Neoplasia**, v. 16, n. 4, p. 357-372, 2011.

ZAFALON, L. F.; NADER FILHO, A.; OLIVEIRA, J. V.; RESENDE, F. D. Mastite subclínica causada por *Staphylococcus aureus*: custo-benefício da antibioticoterapia de vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n., p. 577-585, 2007.

ZAFALON, L. F.; ARCARO, J. R. P.; NADER FILHO, A.; FERREIRA, L. M.; CASTELANI, L.; BENVENUTTO, F. Investigação de perfis de resistência aos antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados na ordenha de vacas em lactação. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 67, n.1, p. 118-125, 2008.

ZWALD, A. G.; RUEGG, P. L.; KANEENE, J. B.; WARNICK, L. D.; WELLS, S. J.; FOSSLER, C.; HALBERT, L. W. Management practices and reported antimicrobial usage on conventional and organic dairy farms. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 1, p. 191-201, 2004.

ANEXOS

ANEXO A: QUESTIONÁRIO APLICADO AOS PRODUTORES DE LEITE PARA PESQUISAR A ASSOCIAÇÃO ENTRE AS PRÁTICAS DE MANEJO E TRATAMENTO DE MASTITE E A SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE *S. aureus*.

Código do rebanho: _____

Proprietário: _____

Telefone:

(____) _____

e-mail: _____

1. LOCALIZAÇÃO DO REBANHO

1.1. Coordenadas geográficas: Latitude: _____

Longitude: _____

1.2. Endereço: _____

1.3. Cidade: _____

1.4. Micro-região: _____

1.5. Meso-região: _____

1.6. Estado: _____

2. CARACTERÍSTICAS GERAIS DO REBANHO

2.1. Número de vacas em lactação: _____

2.2. Número de vacas de primeira cria: _____

2.3. Número de vacas de segunda cria: _____

2.4. Número de vacas de terceira cria: _____

2.5. Número de vacas com mais de 3 crias: _____

2.6. Número de vacas secas: _____

2.7. Produção total de leite por dia: _____ litros.

2.8. Sistema de produção: () Semi-estabulado () Intensivo () A pasto

2.9. Raça do rebanho:

() Gir () Jersey () Pardo Suíço

() Holandês () Mestiço () Girolanda

() Outra _____

2.10. Tipo de ordenha: () Manual () Mecânica

2.11. Presença do bezerro no momento da ordenha: () Sim () Não

3. INFRA-ESTRUTURA DA PROPRIEDADE

- 3.1. Local de ordenha: () Sala de ordenha () Curral
() Outro: _____
- 3.2. Ordenha mecânica: () Sistema canalizado () Balde ao pé
- 3.3. Número de ordenhas por dia: () Uma () Duas () Três
- 3.4. Armazenamento do leite
() Tanque de expansão direta () Tanque coletivo
() Tanque de imersão () Entrega em latão na indústria

4. PROGRAMA DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE MASTITE

- 4.1. Há acompanhamento do rebanho por um técnico?
() Veterinário () Agrônomo () Zootecnista
() Técnico agrícola () Não há
- 4.2. Examina os primeiros jatos de leite (teste da caneca de fundo escuro)?
() Sim () Não
- 4.3. Lava os tetos com água antes da ordenha? () Sim () Não
() Quando necessário
- 4.4. Desinfeta os tetos antes da ordenha? () Sim () Não
- 4.5. O que usa para secar os tetos?
() Não seca () Papel toalha () Pano comum () Outra forma: _____
- 4.6. Desinfeta os tetos depois da ordenha? () Sim () Não
- 4.7. Realiza o tratamento imediato de todos os casos clínicos de mastite:
() Sim () Não
- 4.8. Realiza o tratamento da vaca seca (tratamento a secagem)?
() Todas as vacas () Parte das vacas (seleciona animal para tratamento a secagem)
() Não realiza
- 4.9. Qual o critério para descarte de animais?
() Mastite crônica ? () Outras doenças
() Baixa produção () Outro _____
- 4.10. Envia amostras de leite de animais para exames microbiológicos?
() Sim () Não
- 4.11. Se envia, qual é a finalidade dos exames microbiológicos?
() Identificação de patógenos da mastite () Antibiógrama
- 4.12. Faz contagem de células somáticas: () Animais () Rebanho
() Não faz
- 4.13. Anotar as três últimas contagens de células somáticas obtidas no rebanho:

- 4.14. Observa e respeita o período de carência quando trata as vacas em lactação com antimicrobianos?
() Sim () Não

4.15. Qual é o destino do leite com resíduos de antimicrobianos?

- () Fornecido apenas os bezerros machos () Fornecido a todos os bezerros
() Outro destino: _____

5. APLICAÇÃO DE ANTIBIÓTICOS

5.1. Quais os casos em que usa tratamento com antimicrobianos das vacas?

- Doença de casco () Mastite () Pneumonia
() Diarréia () Metrite () Outros _____

5.2. Há um protocolo de uso de antimicrobianos para tratamento de mastite?

- () Sim () Não

5.3. Se a resposta do item 5.2 for afirmativa, anotar o protocolo usado: _____

5.4. Quem recomenda os medicamentos para tratamento da mastite?

5.5. Há registro (anotação) dos tratamentos para mastite? () Sim () Não

5.6. Há registro (anotação) dos tratamentos para outras doenças?

- () Sim () Não

5.7. Utiliza alguma maneira visual para marcar os animais tratados com antimicrobianos?

- () Sim () Não

5.8. Utiliza algum antimicrobiano da linha não-veterinária para tratamento da mastite?

- () Sim () Não

5.9. Quantos tratamentos de mastite clínica foram realizados no último mês? _____

5.10. Anote o nome comercial e as bases dos antimicrobianos utilizados na propriedade. – Verificar na farmácia da propriedade quais medicamentos consta no estoque: (Em caso de produção orgânica, enumere os produtos utilizados).

6. QUESTÕES PARA VERIFICAR A DISSEMINAÇÃO DA RESISTÊNCIA

6.1. Existe o hábito de consumir leite (leite cru) na propriedade? () Sim () Não

6.2. O leite produzido é usado para preparação de derivados lácteos na própria fazenda?

- () Sim () Não

6.3. Se a resposta do item 6.2 for afirmativa, o leite é pasteurizado?

- () Sim () Não

6.4. Vende animais para outras propriedades? () Sim () Não

6.5. Se a resposta do item 6.4 for afirmativa, qual a categoria dos animais vendidos?

Observações (caso haja alguma observação relacionada a alguma questão do questionário, usar o número da questão para identificação da observação):

Data da entrevista ____/____/____ Entrevistador: _____

ANEXO B – PADRÕES INTERPRETATIVOS PARA O DIÂMETRO DA ZONA DE INIBIÇÃO PARA PATÓGENOS DE MEDICINA VETERINÁRIA

(continua)

Antimicrobiano	Concentração do disco	Diâmetro da zona de inibição (mm)			Observação
		S	I	R	
Aminoglicosídeos	10µg	≥ 15	13 – 14	≤ 12	Não usar essa interpretação para <i>H. somni</i> e <i>A. Pleuropneumoniae</i>
Gentamicina					
Beta-lactâmicos / Penicilina					
Ampicilina					
Enterobactérias	10µg	≥ 17	14 – 16	≤ 13	
Estafilococos	10µg	≥ 29	-	≤ 28	
Estreptococos	10µg	≥ 26	19-25	≤ 18	
Enterococos	10µg	≥ 17	-	≤ 16	
Oxacilina					
<i>Staphylococcus aureus</i>	1µg	≥ 13	11 – 12	≤ 10	Oxacilina é usada para testar a susceptibilidade para meticilina, nafcilina e cloxacilina. Os critérios interpretativos para <i>S. aureus</i> deveriam ser usados para outros estafilococos coagulase-positiva, como <i>S. intermedius</i> , mas não para espécies coagulase variáveis, como <i>S. hyicus</i> . Os isolados de <i>Staphylococcus</i> devem ser considerados resistentes aos outros β-lactâmicos quando forem resistentes a oxacilina.
<i>Staphylococcus</i> spp.	1µg	≥ 18	-	≤ 17	
Penicilina					
Estafilococos	10 U	≥ 29	-	≤ 28	
Estreptococos (grupo β-hemolítico)	10 U	≥ 24	-	-	
Enterococos	10 U	≥ 15	-	≤ 14	
Tetraciclinas					
Tetraciclina					
Outros agentes com exceção de estreptococos (inclui <i>Staphylococcus</i> spp e <i>E. coli</i>)	30µg	≥ 19	15 - 18	≤ 14	
<i>Streptococcus</i> spp.	30µg	≥ 23	19 - 22	≤ 18	

(conclusão)

Antimicrobiano	Concentração do disco	Diâmetro da zona de inibição (mm)			Observação
		S	I	R	
Cefalosporinas					
Cefalotina	30µg	≥ 18	15 – 17	≤ 14	Cefalotina é usada para predizer resultados a todas as cefalosporinas de primeira geração, com exceção de Cefazolin. Cefazolin deve ser testado separadamente para Enterobactérias
Ceftiofur (mastite bovina)	30µg	≥ 21	18 – 20	≤ 17	
Staphylococcus aureus					
Streptococcus agalactiae					
Streptococcus dysgalactiae					
Streptococcus uberis					
Escherichia coli					
Fluoroquinolona					
Enrofloxacina ¹	5µg	≥ 21	17 - 20	≤ 16	Halos de inibição recomendados para Mannheimiahaemolytica, Pasteurellamultocida, Histophilussomni, para doença respiratória de bovinos (BRD)
Inibidores da via do ácido fólico					
Sulfisaxazole	300µg	≥ 17	13-16	≤ 12	Representante da classe das sulfonamidas
Trimetoprim-sulfametoxazol					
Staphylococcus spp.	1,23/23,75µg	≥ 16	nov/15	≤ 10	
Enterobactérias	1,23/23,75µg	≥ 16	nov/15	≤ 10	
Clindamicina ¹	2µg	≥ 21	15 - 20	≤ 14	Halos de inibição recomendados para Staphylococcus spp. , para infecções de cães (pele e de tecidos macios). Clindamicina é também usada para testar a susceptibilidade a lincomicina.
Macrolídeo					
Eritromicina					
Enterococcus spp.	15µg	≥ 23	14 - 22	≤ 13	
Staphylococcus spp.	15µg	≥ 23	14 - 22	≤ 13	
Estreptococos	15µg	≥ 21	16 - 20	≤ 15	

Fonte: CLSI, 2008

ANEXO C – ASSOCIAÇÃO ENTRE AS PRÁTICAS DE MANEJO E A SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE *S. aureus*.

Tabela 1 - Frequência das variáveis relacionadas às práticas de manejo e a susceptibilidade antimicrobiana de *S. aureus* frente à ampicilina entre os grupos susceptível (n=138) e resistente (n=71)

Variáveis	Susceptibilidade antimicrobiana – Ampicilina		
	<i>Staphylococcus aureus</i>		P ¹
	Susceptível	Resistente	
	n (%)	n (%)	
Consumo de leite cru			
Sim	35 (29,41)	18 (25,35)	0,5461
Não	84 (70,59)	53 (74,65)	
Utiliza leite não past. para fabricação de derivados ²			
Sim	8 (5,76)	2 (2,82)	0,3442
Não	131 (94,24)	69 (97,18)	
Venda de animais para outras propriedades			
Sim	14 (10,07)	47 (66,20)	<0,0001
Não	125 (89,93)	24 (33,80)	
Uso de antimicrobianos de linha não-veterinária			
Sim	0	0	*
Não	139 (100)	71 (100)	

¹Probabilidade calculada pelo teste qui-quadrado para respostas binominais;

²Past. = pasteurizado

Tabela 2- Frequência das variáveis relacionadas às práticas de manejo e a susceptibilidade antimicrobiana de *S. aureus* frente à cefalotina entre os grupos susceptível (n=196) e resistente (n=14)

Variáveis	Susceptibilidade Antimicrobiana – Cefalotina		
	Staphylococcus aureus		P ¹
	Susceptível	Resistente	
	n (%)	n (%)	
Consumo de leite cru			
Sim	62 (31,67)	7 (50)	0,1575
Não	134 (68,37)	7 (50)	
Utiliza leite past. para fabricação de derivados ²			
Sim	88 (44,90)	4 (28,57)	0,2342
Não	108 (55,10)	10 (71,43)	
Venda de animais para outras propriedades			
Sim	21 (10,71)	9 (64,29)	0,0061
Não	175 (89,29)	5 (35,71)	
Uso de antimicrobianos de linha não-veterinária			
Sim	0	0	*
Não	196 (100)	14 (100)	

¹Probabilidade calculada pelo teste qui-quadrado para respostas binomiais;

Tabela 3 - Frequência das variáveis relacionadas às práticas de manejo e a susceptibilidade antimicrobiana de *S. aureus* frente à clindamicina entre os grupos susceptível (n=195) e resistente (n=15)

Variáveis	Susceptibilidade Antimicrobiana - Clindamicina		
	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>P</i> ¹
	Susceptível n(%)	Resistente n(%)	
Consumo de leite cru			
Sim	53 (27,18)	4 (26,67)	0,9657
Não	142 (72,92)	11 (73,33)	
Utiliza leite past. para fabricação de derivados ²			
Sim	77 (39,49)	6 (40)	0,9688
Não	118 (60,51)	9 (60)	
Venda de animais para outras propriedades			
Sim	161 (82,56)	11 (73,33)	0,3709
Não	34 (17,44)	4 (26,67)	
Uso de antimicrobianos de linha não-veterinária			
Sim	0	0	*
Não	195 (100)	15 (100)	

¹Probabilidade calculada pelo teste qui-quadrado para respostas binomiais;

²Past. = pasteurizado.

Tabela 4 - Frequência das variáveis relacionadas às práticas de manejo e a susceptibilidade antimicrobiana de *S. aureus* frente à ceftiofur entre os grupos susceptível (n=153) e resistente (n=57)

Variáveis	Susceptibilidade Antimicrobiana – Ceftiofur		
	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>P</i> ¹
	Susceptível n(%)	Resistente n(%)	
Consumo de leite cru			
Sim	37 (24,18)	20 (35,09)	0,1141
Não	153 (75,82)	37 (64,91)	
Utiliza leite past. para fabricação de derivados ²			
Sim	69 (45,10)	43 (75,44)	0,0068
Não	84 (54,90)	14 (24,56)	
Venda de animais para outras propriedades			
Sim	126 (82,35)	43 (75,44)	0,2610
Não	27 (17,65)	14 (24,56)	
Uso de antimicrobianos de linha não-veterinária			
Sim	0	0	*
Não	153 (100)	57 (100)	

¹Probabilidade calculada pelo teste qui-quadrado para respostas binomiais;

²Past. = pasteurizado

Tabela 5 - Frequência das variáveis relacionadas às práticas de manejo e a susceptibilidade antimicrobiana de *S. aureus* frente à enrofloxacina entre os grupos susceptível (n=176) e resistente (n=34)

Variáveis	Susceptibilidade Antimicrobiana – Enrofloxacino		
	<i>Staphylococcus aureus</i>		P ¹
	Susceptível	Resistente	
	n(%)	n(%)	
Consumo de leite cru			
Sim	52 (29,55)	5 (14,71)	0,0749
Não	129 (70,45)	29 (85,29)	
Utiliza leite past. para fabricação de derivados ²			
Sim	69 (39,20)	11 (32,35)	0,4514
Não	107 (60,80)	23 (67,65)	
Venda de animais para outras propriedades			
Sim	145 (82,39)	27 (49,41)	0,6800
Não	31 (17,61)	7 (20,59)	
Uso de antimicrobianos de linha não-veterinária			
Sim	0	0	*
Não	178 (100)	34 (100)	

¹Probabilidade calculada pelo teste qui-quadrado para respostas binomiais;

²Past.= pasteurizado.

Tabela 6 - Frequência das variáveis relacionadas às práticas de manejo e a susceptibilidade antimicrobiana de *S. aureus* frente a eritromicina entre os grupos susceptível (n=200) e resistente (n=10)

Variáveis	Susceptibilidade Antimicrobiana – Eritromicina		
	<i>Staphylococcus aureus</i>		P ¹
	Susceptível	Resistente	
	n(%)	n(%)	
Consumo de leite cru			
Sim	53 (26,50)	4 (40)	0,3488
Não	147 (73,50)	6 (60)	
Utiliza leite past. para fabricação de derivados ²			
Sim	74 (37)	6 (60)	0,1438
Não	126 (63)	4 (40)	
Venda de animais para outras propriedades			
Sim	166 (83)	6 (60)	0,0652
Não	34 (17)	4 (40)	
Uso de antimicrobianos de linha não-veterinária			
Sim	0	0	*
Não	200 (100)	10 (100)	

¹Probabilidade calculada pelo teste qui-quadrado para respostas binomiais;

²Past.= pasteurizado.

Tabela 7 - Frequência das variáveis relacionadas às práticas de manejo e a susceptibilidade antimicrobiana de *S. aureus* frente à gentamicina entre os grupos susceptível (n=172) e resistente (n=38)

Variáveis	Susceptibilidade Antimicrobiana – Gentamicina		
	Staphylococcus aureus		P ¹
	Susceptível	Resistente	
	n (%)	n (%)	
Consumo de leite cru			
Sim	47 (27,33)	10 (26,32)	0,8992
Não	125 (72,67)	28 (73,68)	
Utiliza leite past. para fabricação de derivados ²			
Sim	101 (58,72)	9 (23,68)	0,0432
Não	71 (41,28)	29 (76,32)	
Venda de animais para outras propriedades			
Sim	26 (15,12)	26 (68,42)	0,0170
Não	146 (84,88)	12 (31,58)	
Uso de antimicrobianos de linha não-veterinária			
Sim	0	0	*
Não	172 (100)	38 (100)	

¹Probabilidade calculada pelo teste qui-quadrado para respostas binomiais;

²Past.= pasteurizado.

Tabela 8 - Frequência das variáveis relacionadas às práticas de manejo e a susceptibilidade antimicrobiana de *S. aureus* frente à oxacilina entre os grupos susceptível (n=185) e resistente (n=25)

Variáveis	Susceptibilidade Antimicrobiana – Oxacilina		
	Staphylococcus aureus		
	Susceptível	Resistente	P ¹
	n (%)	n (%)	
Consumo de leite cru			
Sim	49 (26,49)	8 (32)	0,5607
Não	136 (73,51)	17 (68)	
Utiliza leite past. para fabricação de derivados ²			
Sim	71 (38,38)	12 (48)	0,3557
Não	114 (61,62)	13 (52)	
Venda de animais para outras propriedades			
Sim	151 (81,62)	18 (72)	0,2546
Não	34 (18,38)	7(28)	
Uso de antimicrobianos de linhã~o-veterinária			
Sim	0	0	*
Não	185 (100)	25 (100)	

¹Probabilidade calculada pelo teste qui-quadrado para respostas binomiais;

²Past.= pasteurizado.

Tabela 9 - Frequência das variáveis relacionadas às práticas de manejo e a susceptibilidade antimicrobiana de *S. aureus* frente à penicilina entre os grupos susceptível (n=150) e resistente (n=60)

Variáveis	Susceptibilidade Antimicrobiana – Penicilina		
	Staphylococcus aureus		P ¹
	Susceptível	Resistente	
	n(%)	n(%)	
Consumo de leite cru			
Sim	41 (27,33)	16 (26,67)	0,9218
Não	109 (72,67)	44 (73,33)	
Utiliza leite past. para fabricação de derivados ²			
Sim	55 (36,67)	28 (46,67)	0,1806
Não	95 (63,33)	32 (53,33)	
Venda de animais para outras propriedades			
Sim	123 (82)	49 (81,67)	0,9548
Não	27 (18)	11 (18,33)	
Uso de antimicrobianos de linha não-veterinária			
Sim	0	0	*
Não	150 (100)	60(100)	

¹Probabilidade calculada pelo teste qui-quadrado para respostas binomiais;

²Past.= pasteurizado.

Tabela 10 - Frequência das variáveis relacionadas às práticas de manejo e a susceptibilidade antimicrobiana de *S. aureus* frente à sulfatrimetropim entre os grupos susceptível (n=176) e resistente (n=34)

Variáveis	Susceptibilidade Antimicrobiana – Sulfatrimetropim		P ¹
	<i>Staphylococcus aureus</i>		
	Susceptível	Resistente	
Consumo de leite cru			
Sim	52 (29,55)	5 (14,71)	0,0749
Não	124 (70,45)	29 (85,29)	
Utiliza leite past. para fabricação de derivados ²			
Sim	65 (36,93)	18 (52,94)	0,0805
Não	111 (63,07)	16 (47,06)	
Venda de animais para outras propriedades			
Sim	139 (78,98)	30 (88,24)	0,2125
Não	37 (21,02)	4 (11,76)	
Uso de antimicrobianos de linha não-veterinária			
Sim	0	0	*
Não	176 (100)	34 (100)	

¹Probabilidade calculada pelo teste qui-quadrado para respostas binomiais;

²Past.= pasteurizado.

Tabela 11 - Frequência das variáveis relacionadas às práticas de manejo e a susceptibilidade antimicrobiana de *S. aureus* frente à sulfonamida entre os grupos susceptível (n=180) e resistente (n=30)

Variáveis	Susceptibilidade Antimicrobiana – Sulfonamida		P ¹
	Staphylococcus aureus		
	Susceptível	Resistente	
	n(%)	n(%)	
Consumo de leite cru			
Sim	62 (34,44)	3 (10)	0,0073
Não	118 (65,56)	27 (90)	
Utiliza leite past. para fabricação de derivados ²			
Sim	110 (61,11)	12 (40)	0,0300
Não	70 (38,89)	18 (60)	
Venda de animais para outras propriedades			
Sim	145 (80,56)	27 (90)	0,2135
Não	35 (19,44)	3 (10)	
Uso de antimicrobianos de linha não-veterinária			
Sim	0	0	*
Não	180 (100)	30 (100)	

¹Probabilidade calculada pelo teste qui-quadrado para respostas binomiais;²Past.= pasteurizado.Tabela 12 - Frequência das variáveis relacionadas às práticas de manejo e a susceptibilidade antimicrobiana de *S. aureus* frente à tetraciclina entre os grupos susceptível (n=191) e resistente (n=19)

Variáveis	Susceptibilidade antimicrobiana – Tetraciclina		P ¹
	<i>Staphylococcus aureus</i>		
	Susceptível	Resistente	
	n(%)	n(%)	
Consumo de leite cru			
Sim	50 (26,18)	7 (36,84)	0,3188
Não	141 (73,82)	12 (63,16)	
Utiliza o leite past. para fabricação de derivados ²			
Sim	112 (58,64)	1 (5,26)	0,0020
Não	79 (41,36)	18 (94,74)	
Venda de animais para outras propriedades			
Sim	27(14,14)	11 (57,89)	<0,0001
Não	164 (85,86)	8 (42,11)	
Uso de antimicrobianos de linha não-veterinária			
Sim	0	0	*
Não	191 (100)	19 (100)	

¹Probabilidade calculada pelo teste qui-quadrado para respostas binomiais;²Past.= pasteurizado.