

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA  
FILHO” FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS POR CEPAS  
DE *STAPHYLOCOCCUS* COAGULASE-NEGATIVA  
ISOLADAS DE LEITE MASTÍTICO BOVINO PROVENIENTE  
DE PROPRIEDADES LEITEIRAS DE 9 ESTADOS  
BRASILEIROS**

**Tatiane Ribas de Oliveira Machado**

Bióloga

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Junho de 2006

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA  
FILHO” FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS POR CEPAS  
DE *STAPHYLOCOCCUS* COAGULASE-NEGATIVA  
ISOLADAS DE LEITE MASTÍTICO BOVINO PROVENIENTE  
DE PROPRIEDADES LEITEIRAS DE 9 ESTADOS  
BRASILEIROS**

**Tatiane Ribas de Oliveira Machado**

**Orientador: Prof. Dr. José Moacir Marin**

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp,  
“Campus” de Jaboticabal, como parte das  
exigências para obtenção do título de Mestre em  
Microbiologia Agropecuária.

Área de Concentração em Microbiologia  
Agropecuária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Junho de 2006

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

Tatiane Ribas de Oliveira Machado, nascida em 15 de abril de 1979, na cidade de Ribeirão Preto – SP, é Bióloga formada pelo Centro Universitário Barão de Mauá, em dezembro de 2000. Atualmente trabalha na função de Tutora na disciplina de Probabilidade e Estatística da Pontifícia Universidade Católica – Campus Poços de Caldas – MG, iniciativa privada.

## AGRADECIMENTOS

Meu primeiro agradecimento vai para DEUS, o Pai todo poderoso e Mestre superior de todo este Universo, que ilumina e guia meus caminhos, trazendo-me oportunidades tão especiais, como a conquista desta nova etapa.

Sou profundamente grata ao meu esposo, Will, uma pessoa admirável, que serviu de exemplo para mim e que com seu carinho, paciência, compreensão e amor, foi o responsável a me incentivar a fazer a escolha deste caminho acadêmico. Segue a ti, meu amor, o meu muitíssimo obrigado.

Aos meus pais, Luis Roberto e Maria José, pois graças a eles que você está lendo isto agora. A vocês o mais profundo agradecimento por suas sábias lições de amor, crença, compreensão e esperança. Ensinaamentos estes que infundiram-me a confiança necessária para realizar todos os meus sonhos.

Ao meu irmão, Juninho, por ser meu maior amigo e por estar sempre perto, no meu coração, bem aqui dentro.

Agradeço também ao meu orientador e amigo, Prof. Marin, por ter contribuído significativamente com meu aprendizado, me ensinando muitas coisas, tanto com relação à atividade de pesquisa desenvolvida neste trabalho quanto outras da vida, permitindo-me participar de um mundo novo de diferentes descobertas. Paciência, inteligência e dedicação são alguns entre os inúmeros adjetivos que o qualificam positivamente. Da  
aluna para o mestre, muito obrigado!

Aos meus amigos, Graça e Inivaldo Correa, que colaboraram significativamente ao longo deste trabalho, agradeço-os pelo auxílio e todo ensinamento que me proporcionaram. Saibam que jamais me esquecerei de vocês. A vocês minha eterna gratidão.

Agradeço especialmente as minhas técnicas, amigas e colaboradoras Antônia dos Anjos e Tânia Marques.

Ao Laboratório Vitafort, pelo fornecimento das amostras de leite utilizadas no desenvolvimento deste estudo.

Também não poderia esquecer de agradecer a todos que torceram pela minha vitória, muito obrigado.

## ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Mastites.....	3
2.2. Imunidade da glândula mamária.....	6
2.3. Gênero <i>Staphylococcus</i> .....	7
2.4. <i>Staphylococcus</i> coagulase-positiva.....	8
2.5. <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativa.....	9
2.6. <i>Staphylococcus</i> e a mastite.....	12
2.7. <i>Staphylococcus</i> e o homem.....	13
2.8. Prevenção e tratamentos disponíveis para o controle da mastite.....	15
2.9. Resistência antimicrobiana em <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativa.....	16
2.10. Métodos de análise para classificação de <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativa.....	17
3. OBJETIVO.....	19
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4.1. Animais.....	20
4.2. Colheita do material.....	20
4.2.1. Colheita do leite através de testes utilizados no campo.....	20
4.2.1.1. Teste de CMT – Califórnia Mastite Teste.....	21
4.2.2. Colheita das amostras de leite.....	22
4.2.3. Recepção das amostras e caracterização das cepas.....	22
4.2.4. Provas de Virulência.....	23
4.2.4.1. Produção de Hemólise.....	24
4.2.4.2. Plasma Coagulase.....	24
4.2.4.3. DNase (desoxirribunuclease).....	25
4.2.4.4. Lecitinase.....	25
4.2.5. Susceptibilidade antimicrobiana “ <i>in vitro</i> ” – Antibiograma.....	26
4.2.6. Série Bioquímica.....	26

5. RESULTADOS.....	28
6. DISCUSSÃO.....	35
7. CONCLUSÃO.....	40
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41
9. SUMMARY.....	56

## LISTA DE TABELAS E FIGURA

<b>Tabela 1.</b> Distribuição dos 997 patógenos isolados das amostras de leite mastítico analisadas.....	28
<b>Tabela 2.</b> Distribuição por estado de todos os patógenos isolados das amostras de leite mastítico.....	29
<b>Tabela 3.</b> Distribuição por estado das 355 cepas de <i>Staphylococcus sp.</i> .....	30
<b>Tabela 4.</b> Susceptibilidade a 18 antimicrobianos, apresentada pelas 109 cepas de <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativa provenientes de 752 amostras de leite bovino de 9 estados do Brasil.....	31
<b>Tabela 5.</b> Resultados apresentados pelas 109 amostras de SCN submetidas às provas de virulência.....	33
<b>Tabela 6.</b> Caracterização das 109 cepas de SNC, provenientes de 752 amostras de leite bovino de 9 estados do Brasil, através de testes bioquímicos propostos por CUNHA, <i>et. al.</i> , 2004. ....	34
<b>Tabela 7.</b> Distribuição por espécie das 109 cepas de SCN isoladas de amostras de leite mastítico bovino no Brasil em 2005.....	34
<b>Figura 1.</b> Distribuição de multi-resistência a 18 antimicrobianos em 109 cepas de <i>Staphylococci</i> coagulase-negativa isolados de amostras de leite obtidas de vacas com mastite no Brasil (2005). ....	32



## RESUMO

### **SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS POR CEPAS DE STAPHYLOCOCCUS COAGULASE-NEGATIVA ISOLADAS DE LEITE MASTÍTICO BOVINO PROVENIENTE DE PROPRIEDADES LEITEIRAS DE 9 ESTADOS BRASILEIROS**

Um total de 109 cepas de *Staphylococcus* coagulase-negativa foi isolado de mastite bovina clínica e subclínica em 35 fazendas de leite situadas em 9 estados brasileiros no período de fevereiro a maio de 2005, elas foram investigadas em relação a sua susceptibilidade *in vitro* a diversos agentes antimicrobianos. Entre as cepas obtidas, a resistência a penicilina foi a mais frequente (93,5%), seguida pela resistência a sulfonamida (88,9%), novobiocina (88,6%) e ampicilina (85,3%). Todas as cepas examinadas mostraram resistência a pelo menos 1 das drogas antimicrobianas testadas. Cepas apresentando resistência múltipla foram extremamente comuns, com 10,0% dos isolados apresentando resistência a todas as drogas antimicrobianas. Os resultados obtidos indicaram que as cepas de *Staphylococcus* coagulase-negativas isoladas no Brasil apresentaram um alto grau de resistência a antimicrobianos. Estes resultados são provavelmente uma consequência da pressão devido ao uso intensivo de drogas antimicrobianas e eles são um motivo de preocupação em relação a saúde pública.

*Palavras chave:* *Staphylococcus* coagulase-negativa, resistência antimicrobiana, mastite bovina.

## 1. INTRODUÇÃO

Mastite é uma reação inflamatória da glândula mamária, normalmente causada por uma infecção bacteriana e é, economicamente, a mais importante doença em propriedades produtoras de leite do Brasil e do mundo. É uma doença multifatorial, sendo portanto de difícil controle.

Esta enfermidade apresenta outras nomenclaturas, como infecção da glândula mamária ou mamite. A mastite de origem infecciosa ocorre em cerca de 90 a 95% dos casos, podendo ser causada por um ou mais microrganismos, já a de origem traumática ocorre em cerca de 5 a 10% dos casos.

A mastite infecciosa inicia-se a partir da invasão do agente infeccioso pelo canal do teto, podendo tomar todo o úbere, e em casos mais graves pode levar a uma infecção sistêmica, causando septicemia. Além das bactérias, que são os principais microrganismos responsáveis pela mastite, fungos e algas, também, podem estar envolvidos simultaneamente ou não nesta enfermidade.

A mastite pode ser classificada como mastite clínica (severa) ou subclínica (moderada). Mastite Clínica apresenta alterações, dos úberes e do leite, visíveis a olho nu. É caracterizada por sinais no úbere como dor, edema, palpitação, aumento de temperatura, enquanto, no leite podem ocorrer mudanças como a presença de grumos e dependendo do grau da infecção pode levar a uma secreção aquosa. Mastite Subclínica é a mais comum em propriedades leiteiras e de maior preocupação, pois, pode acometer grande parte do rebanho sem que seja percebida, porque não apresenta sinais sistêmicos aparentes, como a mastite clínica, mas podem ocorrer alterações físicas, químicas e microbiológicas no leite, que são detectadas por testes específicos, a nível de campo o teste da caneca telada com fundo preto e o CMT (*California Mastitis Test*); em laboratórios: CCS (Contagem de Células Somáticas), *White Side Test* e exame microbiológico. Esta forma de mastite é a maior responsável por grandes perdas na produção leiteira e na qualidade do leite.

Os *Staphylococcus spp*, são as bactérias encontradas com maior frequência em mastites bovinas e são responsáveis por inúmeros tipos de doenças nos seres humanos e em outros animais, portanto, o estudo dessa espécie bacteriana é de grande importância para os órgãos responsáveis pela saúde humana e animal. A

mastite causada por *Staphylococcus* é de difícil controle em uma propriedade, pois é considerada contagiosa, de natureza crônica e a infecção intramamária causada é normalmente subclínica.

O *Staphylococcus* coagulase-negativa, pode ser encontrado em diferentes locais, como nos alimentos, pele e mucosas de várias espécies animais, geralmente é de grande importância, pois estas bactérias apresentam facilidade para transportar plasmídeos de resistência.

A antibióticoterapia é a primeira opção de tratamento utilizada para combater os casos de mastite, o seu sucesso vai depender da capacidade do medicamento de atingir todos os locais da infecção e manter uma concentração mínima por um período suficiente para eliminar os microrganismos. O antibiótico pode ser administrado via sistêmica ou intramamária. Há outras opções de tratamentos que vêm sendo utilizadas, como uso de uma vacina específica (curativa) e homeopatia. Em alguns casos graves de mastite crônica e reincidência da doença, pode ser necessário o descarte do animal.

Os casos de mastites são usualmente tratados sem a prévia identificação laboratorial dos agentes patogênicos e testes de sensibilidade antimicrobiana. No Brasil, existem diversos tipos de drogas que são utilizadas pelos produtores, sem um maior controle por parte do Ministério da Agricultura, e isto proporciona uma seleção de cepas de microrganismos altamente resistentes a estes antimicrobianos.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Mastites

A mastite é um processo inflamatório da glândula mamária de evolução agudo ou crônico, apresenta-se sob a forma clínica ou subclínica na dependência dos sinais de inflamação; acomete mais freqüentemente os ruminantes, sendo causada predominantemente por agentes bacterianos (BLOOD & RADOSTITS, 1991).

Esta é a principal doença do gado leiteiro em todo mundo devido aos prejuízos econômicos que acarreta ao produtor e a perda na qualidade do leite (CIFRIAN *et. al.*, 1996).

A mastite pode ser classificada como clínica e subclínica.

A **mastite clínica** é caracterizada por sinais sistêmicos, tais como: anorexia, depressão, toxemia, febre e sinais locais como dureza (endurecimento) do úbere com palpitação, edema, aumento na temperatura, hiperemia e dor. Alterações na secreção mamária podem também ser observadas; normalmente o leite pode ter coágulos e pus e com o progresso da infecção pode conduzir a uma secreção aquosa (SARAN, 1986). Estes sintomas podem ser visíveis a olho nu.

Os sintomas observados nos casos de mastite clínica, não são observados na mastite subclínica, mas alterações no úbere podem ser detectadas no campo por testes qualitativos (SCHALM & NOORLANDER, 1957).

A **mastite subclínica** não apresenta sintomas aparentes, entretanto, ocasiona alterações no leite, tais como, aumento da contagem de células somáticas (CCS); aumento nos teores de íons cloro, sódio e proteína sérica; diminuição nos teores de caseína, lactose e gordura do leite, o que limita a exploração econômica da raça leiteira (BRAMLEY *et. al.*, 1996).

A forma subclínica apresenta uma maior importância epidemiológica, pois pode propagar silenciosamente pelo rebanho sem que sejam percebidas alterações macroscópicas a inspeção do úbere ou da sua secreção (BLOOD & RADOSTITS, 1991). É a mais importante devido a maior prevalência nos rebanhos, ocorrendo de

15 a 40 vezes mais que a forma clínica. A mastite é de difícil detecção e longa duração (PHILPOT & NICKERSON, 1991).

A mastite reflete negativamente na produção leiteira, e KIRK *et. al.*, (1994) ponderam que as mastites subclínicas são responsáveis por 10% a 11% de perda na capacidade produtiva/vaca/ano.

A mastite de origem infecciosa é a mais freqüente, e entre os agentes mais importantes estão as bactérias. Porém, os fungos e algas também estão envolvidos em sua gênese (LANGONI *et. al.*, 1998). WATTS (1988) relatou a participação de 137 espécies de microrganismos, o que reforça a complexidade etiológica desta afecção, dificultando em algumas situações o seu tratamento e controle.

A mastite não tratada é uma das causas de perdas contínuas na economia da indústria leiteira. (FOX *et. al.*, 1991; SORDILLO *et. al.*, 1997).

Avanços tecnológicos atuais caminham para métodos rápidos e sensíveis para diagnosticar e diferenciar micróbios resultando em um aumento no número de testes bioquímicos e enzimáticos, a maioria dos quais são baseados em análises genotípicas. Estes testes podem ser usados para discriminar diferenças entre bactérias indistinguíveis, comumente encontradas em leite contaminado e seus derivados (JAYARAO *et. al.*, 1996).

Mastite em vacas e outros ruminantes domésticos leiteiros representa um prejuízo econômico no mundo inteiro (BLOOD & RADOSTITS, 1989). Os maiores custos estão associados com redução na produção de leite, descarte do leite, substituição precoce do animal, redução no valor de venda do animal, drogas e serviço de veterinários.

Até 1945, em grande parte dos países, o *Streptococcus agalactiae* era o patógeno isolado com maior freqüência nos casos de mastite. Com a implantação dos programas de controle visando à erradicação da mastite causada por este organismo, ocorreu um decréscimo das infecções causadas por este agente, entretanto, isto foi seguido por um relativo aumento na importância das infecções causadas pelo gênero *Staphylococcus* (AARESTRUP *et. al.*, 1997).

Os modernos sistemas de manejo de ordenha das vacas leiteiras, quando não adequadamente mantidos, tem favorecido a disseminação de *Staphylococcus* que são considerados um patógeno flexível, e o aumento de sua resistência a antibióticoterapia uma vez estabelecido no úbere, constitui-se uma vantagem a mais para estes microrganismos (ANDERSON, 1976).

EBERHART *et. al.* (1990), constataram que nos casos de infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus*, ocorre uma transferência dessas bactérias de uma glândula infectada para uma glândula não infectada, durante o processo de ordenha, pelas mãos do retireiro ou através de toalhas utilizadas para limpeza do úbere. Sendo assim, as infecções podem ser controladas, ou pelo menos diminuídas por medidas simples como anti-sepsia dos tetos, imediatamente após a ordenha, pela não reutilização de toalhas, ou uso de toalhas descartáveis e pela higiene das mãos do retireiro.

Segundo SEARS *et. al.* (1993), os principais microrganismos causadores da mastite bovina podem ser divididos em cinco grupos: cocos Gram-positivos, bactérias Gram-negativas, corinebactérias e *Actinomyces*, *Mycoplasma* e outros como *Nocardia* ssp, *Prototheca* e leveduras; entretanto os cocos Gram-positivos constituem o principal grupo, responsável por mais de 90% das ocorrências (BIER, 1990; SILVA, 1993), sendo os *S. aureus* e os *S. agalactiae* as espécies mais freqüentes (LANGENEGGER *et. al.*, 1986; RIEDNER *et. al.*, 1987; CARTER, 1988; SISCHO *et. al.*, 1993) in BARBALHO & MOTTA, 2001. Segundo FERREIRO *et. al.*, (1981) e RIEDNER *et. al.*, (1987), o *S. aureus* ocupa o primeiro lugar na freqüência de isolamento, ficando o *Streptococcus* sp em posição secundária, certamente devido a suscetibilidade que apresenta aos antimicrobianos.

BALDASSI *et. al.* (1991); COSTA *et. al.* (1995) e LANGONI *et. al.* (1998), também consideram os *Staphylococcus* spp, *Streptococcus* spp e *Corynebacterium* spp os microrganismos mais freqüentes na mastite, sendo estes considerados como contagiosos. Relevantes ainda são aqueles de origem ambiental como *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter aerogenes*, entre outros (SMITH *et. al.*, 1985).

Segundo ROITMAM *et. al.* (1988), a presença, no alimento de microrganismos diferentes daqueles contidos na microbiota natural pode aumentar a perecibilidade do produto e os riscos deste para a saúde pública devido à contaminação por agentes potencialmente patogênicos, enfatizando também que a manipulação, o contato com superfícies e equipamentos, o transporte e o armazenamento inadequados contribuem para elevar os níveis de contaminação do alimento.

## 2.2. Imunidade da Glândula Mamária

A glândula mamária é protegida por uma variedade de mecanismos de defesa, os quais podem ser separados em duas categorias distintas: imunidade inata e imunidade específica. A imunidade inata, também conhecida como capacidade de resposta não-específica, é a defesa predominante durante o estágio inicial da infecção. As respostas não-específicas estão presentes ou são ativadas rapidamente no local da infecção por numerosos estímulos, mas elas não são ampliadas pela exposição repetida pelo mesmo agente. Essas respostas são mediadas por barreiras físicas como a porção final do teto, células de defesa como macrófagos, neutrófilos, *natural-killer* (NK) células *like* e certamente por fatores solúveis. O reconhecimento dos fatores patogênicos é mediado por moléculas de anticorpos, macrófagos e várias populações de linfóides. Devido às células de “memória” como os linfócitos, a imunidade específica, ou resposta imune específica, pode ser ampliada por exposição repetida ao patógeno (SORDILLO *et. al.*, 1997).

A prevenção e o tratamento da mastite são as principais preocupações da indústria leiteira. Práticas comuns de controle da mastite são baseadas em parâmetros de higiene na ordenha, reduzida exposição de vacas secas a patógenos ambientais e antibióticoterapia, em conjunto estas práticas têm reduzido a ocorrência da doença.

Um meio de diminuir o impacto da mastite sobre a indústria leiteira é aumentar a capacidade natural da vaca à resistência infecciosa. A defesa da glândula mamária contra mastite causada por patógenos é mediada por vários

fatores de proteção solúvel, anatômico e celular. É no período de lactação quando as defesas da glândula mamária deixam de operar corretamente que as vacas ficam mais susceptíveis à mastite. (SORDILLO *et. al.*, 1997).

O tratamento da mastite é uma das medidas preconizadas para o seu controle, além de prevenir a morte de animais especialmente nos casos agudos, septicemia e toxemia. Visa ainda o retorno, a composição e produção normal do leite, além de eliminar fontes de infecções para as demais vacas sadias (CULLOR, 1993).

### **2.3 Gênero *Staphylococcus***

Os estafilococos são células esféricas, com 0,5-1,5 µm de diâmetro, ocorrem sozinhas, em pares e tétrades e caracteristicamente dividindo em mais que um plano para formar clusters irregulares (cacho de uva). Gram-positivos, não-móveis, anaeróbios facultativos, usualmente catalase-positiva. Inicialmente, fermentação anaeróbica da glicose e sensibilidade a lisostafin foram usados para diferenciar o gênero *Staphylococcus* do *Micrococcus* (BAIRD-PARKER, 1965). O gênero *Staphylococcus* pertence à família *Micrococcaceae*, são os microrganismos mais freqüentemente isolados de glândulas mamárias bovina (DEVRIESE, 1979; WATTS, 1988).

Com o envolvimento do *Staphylococcus* coagulase-negativa em doenças tornou-se mais importante, tentar compreender não somente os dois gêneros, mas também nomear espécies para o gênero *Staphylococcus* usando oxidase, lisostafin e teste de lisozima, junto com sensibilidade a novobiocina, furazolidona e bacitracina e vários outros testes bioquímicos, os quais tornaram-se um aspecto importante para a classificação (KLOOS & SCHLEIFER 1975; DEVRIESE *et. al.*, 1985; BAKER 1986). O tipo de alimento nutricional é variável, muitas espécies identificadas, requerem uma fonte orgânica de nitrogênio, como certos aminoácidos, e vitaminas do grupo B. Algumas outras, podem crescer com (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como uma fonte única de nitrogênio. Uracil e/ou fonte de carbono fermentada, pode ser requerida por certas espécies em crescimento anaeróbio (WILLIAMS & WILKINS, 1994).



Alguns desses organismos podem ser isolados de uma variedade de produtos animais (carne, leite, queijo) e fontes ambientais (solo, areia, ar ou água). Algumas espécies são patógenos oportunistas de humanos e/ou animais (KLOOS & SCHLEIFER, 1975).

Atualmente o gênero *Staphylococcus* é composto por 28 espécies, das quais 25 são coagulase-negativa, e são reconhecidas pelo International Journal of Systematic Bacteriology (FRENEY *et. al.*, 1988; IGIMI *et. al.*, 1989).

Os estafilococos coagulase-positiva incluem *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus* (WATTS & YANCEY, 1988, in WILLIAMS & WILKINS, 1994).

#### **2.4 *Staphylococcus* Coagulase-positiva**

*S. aureus* é um patógeno de muitos animais, e é o maior causador de intoxicação alimentar em seres humanos (NEAVE, 1975; VALLE *et. al.*, 1990). Mastite causada por *S. aureus* tem prevalência no mundo todo (ESA-MATTI & PENSONEN, 1990). Tem sido estimado que 19,0 a 40,7% das vacas são infectadas com *S. aureus*; vacas infectadas com mastite podem produzir 773 Kg a menos de leite por lactação do que vacas não infectadas (NICKERSON, 1993). Esta enfermidade é particularmente difícil de ser controlada em rebanho, porque, o *S. aureus* é um microrganismo contagioso e a infecção é normalmente subclínica, e freqüentemente resistente ao tratamento antimicrobiano durante a lactação, o que resulta em um animal portador crônico da doença.

A média de insucessos nas terapias varia de 3 a 92% durante a lactação (OWENS *et. al.*, 1997). Embora a medida de controle da mastite geralmente não resulta na erradicação do *S. aureus* de uma fazenda, sanidade do teto e tratamento antimicrobiano das vacas secas (não-lactantes), junto a identificação e separação ou segregação dos transmissores, podem marcadamente reduzir esta prevalência.

O *S. aureus* é considerado o patógeno mais freqüentemente associado com mastite bovina e caprina (SMITH & ROGUINSKY, 1977; WATTS, 1988) e pode causar infecção piogênica em aves domésticas (HARRY, 1967). O microrganismo

pode também ser isolado de doenças de animais domésticos e macacos (KLOOS & SCHLEIFER, 1981).

A presença de *S. aureus* nos alimentos, em geral, é indicativa de contaminação a partir da pele, da boca e das fossas nasais dos manipuladores de alimentos, além de limpeza e sanidade inadequadas dos utensílios e equipamentos (SNYDER, 1992).

Um pré-requisito para melhorar o controle da mastite por *S. aureus* é a sua rápida descoberta e um teste de diagnóstico fácil, sensível e específico. O aumento da contagem de célula somática no leite é freqüentemente associada com mastite de *S. aureus*, mas não é específico para este agente. Cultura bacteriana é o teste padrão para o diagnóstico da mastite, mas é limitado por uma liberação intermitente do organismo e uso profilático de antimicrobianos que pode inibir o crescimento da bactéria *in vitro*. A identificação bioquímica padrão para culturas de *S. aureus* pode necessitar mais que 24 horas para se completar (WILSON *et. al.*, 1991).

## **2.5 *Staphylococcus* Coagulase-negativa**

Os *Staphylococcus* coagulase-negativa (SCN) estão amplamente disseminados no ambiente, sendo o homem e os animais seus principais reservatórios, nos quais colonizam pele e mucosas. Este microrganismo causa uma série de infecções que variam desde lesões purulentas e localizadas na pele até infecções generalizadas (ROITMAM *et. al.*, 1988). Os SCN fazem parte da microbiota da pele de animais (DEVRIESE & KEYSER, 1980; DEVRIESE *et. al.*, 1985; WOODWARD *et. al.*, 1987 in WILLIAMS & WILKINS 1994), por mais que a composição qualitativa e quantitativa da microbiota da pele varie conforme as diferentes condições ambientais (RENDOS *et. al.*, 1975; MANSEL *et. al.*, 1977).

Desde 1975, alguns autores têm organizado sistematicamente SCN dentro de espécies separadas por características fenotípicas definidas (KLOOS & SCHLEIFER, 1975; SCHLEIFER & KLOOS, 1975). DEVRIESE *et. al.*, 1978 e HÁJEK (1976), definiram novas espécies de SCP e SCN que são muito freqüentemente associadas à infecção animal. Todas as espécies nomeadas são totalmente distintas

no estudo do DNA homólogo realizado sob condição de reassociação restritiva; a significância clínica das espécies separadas, porém, ainda está sendo definida.

Há vários anos tem ocorrido um aumento no número de relatos da incidência de SCN em infecções clínicas, seu papel patogênico agora está bem estabelecido (ALDRIDGE, 1982; DOERN, 1984). SCN estão freqüentemente envolvidos em infecções do trato urinário, válvulas do coração, ferimentos de olhos e ouvidos, desvios do fluido cerebrospinal e vascular, juntas que contém próteses; eles estão também envolvidos nas causas de infecção bacteriana subcutânea, endocardites, peritonites em pacientes com continuas diálises peritoneais e bacteremia em pacientes que recebem terapias imunossupressoras. (ALDRIDGE, 1982; DOERN, 1984; KLOOS, 1982).

Na medicina veterinária, SCN tem sido extensivamente estudado em relação à mastite bovina (HOLMBERG, 1973). SCN são considerados como patógenos primários do úbere, mas tem também sido demonstrado um papel protetor contra infecções por outros patógenos do úbere (POUTREL & LERONDELLE, 1980; LINDE, 1982). WOODWARD (1987) in WILLIAMS & WILKINS (1994), demonstrou que várias bactérias isoladas da microbiota dos tetos de bovinos podem inibir o crescimento de patógenos do úbere, *in vitro*.

O SCN tem sido considerado um patógeno menos agressivo da mastite bovina; apesar do fato que, muitos estudos recentes têm mostrado sua importância na infecção da glândula mamária bovina. Vários estudos indicam que SCN é mais freqüentemente isolado de amostras de leite com mastite, especialmente na primeira lactação (JARP, 1991; HAMMON & LANGLOIS, 1995; MYLLIS 1995; OLIVER & JAYARO, 1995).

A mastite causada por SCN normalmente não é severa (HONKANEM-BUZALSHI, 1991), e sua virulência é geralmente considerada menos agressiva que a promovida pelos principais patógenos (BIRGERSSON *et. al.*, 1992).

Os SCN também causam problemas de mastite em outras espécies, como em cabras leiteiras (DEINHOFER, 1985), também nesta espécie as infecções por SCN, normalmente, são menos agressivas do que as causadas por *S. aureus*, que é o

maior e mais contagioso patógeno da mastite bovina (JARP, 1991; OLIVER & JAYARO, 1995).

As mastites por *Staphylococcus* coagulase-negativa são causadas principalmente por *S. epidermidis*, *S. chromogenes* e *S. simulans* encontrados com alta frequência em amostras de leite. A prevalência de *S. epidermidis* é de 11,3 a 23,19% (NADER FILHO *et. al.*, 1985; LANGONI *et. al.*, 1991).

A contagem de células somáticas da vaca infectada por SCN é do dobro ou o triplo do que a de uma vaca não infectada (JARP, 1991; OLIVER & JAYARO, 1995). Tecido mamário infectado por SCN exibe uma maior infiltração de leucócitos (TRINIDAD *et. al.*, 1990). Um estudo mostrou que infecção causada por SCN diminuiu em 8,7% o rendimento da produção de leite em 305 dias (TIMMS & SCHULTZ, 1987).

Alguns estudos (NICKERSON *et. al.*, 1995; TRINIDAD *et. al.*, 1990) mostram um aumento na proporção de SCN em amostras de quartos de novilhas com mastite clínica. Outros relatam que SCN é normalmente a espécie de bactéria que mais prevalece na secreção mamária em fazendas de vacas lactantes (HARMON *et. al.*, 1986; HOGAN *et. al.*, 1987).

Quarenta espécies do gênero *Staphylococcus* foram identificadas ainda de forma inicial (TRÜLZSCH *et. al.*, 2002; BANNERMAN, 2003; KWOK & CHOW, 2003; SPERGSER *et. al.*, 2003). *S. aureus*, uma espécie coagulase-positiva produz uma série de outras enzimas e toxinas, é o mais conhecido e tem sido frequentemente implicado na etiologia de uma série de intoxicações em animais e humanos, enquanto SCN, representando a maioria das espécies tem sido considerado saprofítico ou raramente patogênico (KLOOS & SCHLEIFER, 1975).

O principal patógeno isolado de mastite em novilhas tem sido em muitos estudos os SCN, estes estão presentes na microbiota da pele e são abundantes em ambiente animal (WHITE *et. al.*, 1989). Conseqüentemente, o controle da mastite pela redução à exposição das novilhas a SCN é impraticável.

## 2.6 *Staphylococcus* e a mastite

O controle da mastite nos rebanhos leiteiros constitui um importante passo para elaboração de produtos de boa qualidade e diminuição dos riscos a população (BARBALHO & MOTTA, 2001).

Através do estudo etiológico da mastite clínica em bovinos, COSTA *et. al.*, (1995), examinaram 3574 vacas em diferentes estágios de lactação, e verificaram que do total de amostras analisadas, 22,23% foram negativas no exame microbiológico, e nas amostras positivas (77,77%) observaram que os principais agentes isolados foram *Staphylococcus sp* (34,09%).

A mastite em novilhas, não foi encarada como sendo mais significante até os resultados publicados por MUCH-PETERSEN (1970), em estudo realizado na Austrália, onde menos de 22% dos quartos dos úberes de novilhas produziam bactérias durante o primeiro dia de lactação. Na década de 80, a mastite em novilhas primíparas tornou-se um sério problema nos EUA. Após o parto, quase 30% de todas as novilhas pode ter infecção intramamária devido a SCN e aproximadamente 20% uma infecção causada por mais patógenos (FOX & ROBERSON, 1993). Na Europa a situação varia entre os países, resultados de um estudo francês indicam que 4,5% das novilhas tinham mastite clínica após o parto e SCN foi o grupo mais prevalente de patógenos (LERONDELLE, 1985). Um estudo na Alemanha (SORBIRAJ *et. al.*, 1988), demonstrou que 35% das novilhas e 13,5% dos quartos apresentaram alterações clínicas. Além disso, 24% de novilhas aparentemente saudáveis e 20,5% de quartos foram infectados com bactérias correspondentes as espécies conhecidas capazes de causar mastite bovina.

CHAFFER (1998) examinou 15 vacas primíparas em Israel e encontrou 25 quartos infectados por *Staphylococcus sp*, sendo que em 20% deles foram identificados como *Staphylococcus coagulase-positiva* e 80% *Staphylococcus coagulase-negativa*.

## 2.7 *Staphylococcus* e o homem

Historicamente, *Staphylococcus* coagulase-positiva, *S. aureus*, tem sido considerado como um patógeno oportunista, enquanto *Staphylococcus* coagulase-negativa tem sido geralmente considerado como não-patogênico. Esta distinção tem sido muito útil para diagnóstico em clínicas laboratoriais, mas o acúmulo das evidências, indica que SCN pode causar uma variedade de infecções piogênicas (BRANDT & SWAHN, 1960; PULVERER & PILLICH, 1971), infecções do trato urinário (MORTENSEN, 1969; PEREIRA, 1962; PULVERER & PILLICH, 1971) e pode colonizar próteses artificiais internas em associação com uma bacteremia (HOLT, 1971).

Devido o crescimento da importância médica dos SCN, numerosos estudos foram iniciados numa tentativa de classificar estes organismos (BAIRD-PARKER, 1965; MORTENSEN, 1969).

KLOOS & SCHLEIFER (1975) e SCHLEIFER & KLOOS (1975) caracterizaram nove diferentes espécies de *Staphylococcus*, que foram isoladas de pele humana. Nestes estudos, espécies foram diferenciadas por um conjunto de características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas, além de susceptibilidade a antimicrobianos e composição da parede celular.

Cerca da metade das espécies de SCN colonizam naturalmente os humanos, e eles são considerados essencialmente agentes etiológicos oportunistas, que prevalecem em numerosas situações orgânicas para produzir infecções severas (BANNERMAN, 2003).

Em toda década passada, os SCN ficaram conhecido como agente etiológico de uma série de processos infecciosos representando os microrganismos mais comumente isolados de culturas sanguíneas (HUEBNER & GOLDMANN, 1999).

O aparecimento do SCN como patógeno responsável por diferentes infecções pode ser resultado do aumento no uso de procedimentos invasivos, tais como, catéter e próteses em pacientes passando por tratamento intensivo, pacientes imunossuprimidos, crianças prematuras, pacientes com neoplasia e pacientes transplantados (KLOOS & BANNERMAN, 1994).

*S. epidermidis* é reconhecido como agente etiológico da bacteremia, endocardite valvular natural, osteomielite, infecção do trato urinário, peritonite causada por diálises ambulatoriais, com uma freqüente associação a colonização de catéteres intravascular e dispositivos ortopédicos (BRUMFITT & HAMILTON-MILLER, 1989; SHEAGREN, 1984).

*S. saprophyticus* é o segundo organismo mais freqüentemente encontrado depois do bacilo coliforme, *E. coli*, em infecção aguda do trato urinário (BERGERON *et. al.*, 2000; McTAGGART *et. al.*, 1990). *S. saprophyticus* também é isolado de fêmeas jovens sexualmente ativa, que apresentam sintomas de infecção do trato urinário (SVANBORG & GODALY, 1997).

Os estafilococos também podem causar intoxicação através do consumo de alimentos contaminados por este agente. A intoxicação alimentar provocada por *Staphylococcus* é devido à ingestão de enterotoxinas produzidas e liberadas pela bactéria durante sua multiplicação no alimento, representando um risco para saúde pública. A enterotoxina estafilocócica é termoestável e está presente no alimento mesmo após o cozimento, possibilitando desta forma, a instalação de um quadro de intoxicação de origem alimentar. Sendo o agente responsável por, aproximadamente, 45% das toxinfecções no mundo, vários trabalhos referem os manipuladores de alimentos como os maiores responsáveis pela sua transmissão (ALCARÃZ *et. al.*, 1997; MIMS *et. al.*, 1995; MIN. AGRICULTURA 1992; PASSOS & KUAYE, 1996a).

A intoxicação alimentar estafilocócica é caracterizada por náuseas, vômito, dores abdominais e diarreia, e por um curto período de incubação, de 1 a 6 horas após a ingestão do alimento responsável (MEEHAN *et. al.*, 1992; PASSOS & KUAYE, 1996b). O período de incubação e a severidade dos sintomas, dependem da quantidade de enterotoxina ingerida e da susceptibilidade do indivíduo. Níveis dessas toxinas variando de 0,01 a 0,4µg por grama do alimento são suficientes, para provocar a intoxicação, afetando indivíduos mais sensíveis (ORDEN, *et. al.*, 1992).

## 2.8 Prevenção e tratamentos disponíveis para controle da mastite

A prevenção e o tratamento da mastite são as principais preocupações da indústria leiteira. Práticas comuns de controle da mastite são baseadas em parâmetros de higiene na ordenha, reduzida exposição de vacas secas a patógenos ambientais e antibióticoterapia, estas práticas tem reduzido a ocorrência da doença.

Meios imediatos para diminuir o impacto da mastite nas indústrias leiteira é aumentar a habilidade natural de resistência infecciosa das vacas. A defesa da glândula mamária contra mastite causada por patógenos é mediada por vários fatores de proteção solúvel, anatômico e celular. (SORDILLO, *et. al.*, 1997).

Nos EUA a mastite em fazendas leiteiras custa \$181/vaca/ano (EBERHART, 1987). Enquanto, o custo da prevenção da mastite tem sido estimado em \$ 37,91/vaca/ano (MILLER, *et. al.*, 1993).

O êxito no tratamento das mastites clínicas está diretamente relacionado ao seu período de evolução, sendo necessário o diagnóstico precoce, o que é possível com a realização do exame da caneca de fundo preto previamente a cada ordenha. Fator ainda importante é a sensibilidade do microrganismo envolvido frente ao princípio medicamentoso utilizado (LANGONI *et. al.*, 1999).

O tratamento da mastite é uma das medidas preconizadas para o seu controle, além de prevenir a morte de animais, especialmente nos casos agudos, septicêmicos e toxêmicos. Visa ainda, o retorno da composição e produção normal do leite além de eliminar fontes de infecções para as demais vacas sadias (CULLOR, 1993).

O tratamento adequado das mastites é uma das formas mais práticas e eficientes de controle por eliminar um elo importante da cadeia epidemiológica desta enfermidade. Embora haja preocupação com o custo/benefício, sabe-se que os custos com tratamento sempre redundam em lucros por aumentar a produção leiteira (BLOWEY, 1986). Neste sentido DOMINGUES (1993) demonstrou que o diagnóstico precoce e o tratamento adequado da mastite bovina subclínica podem estabelecer a produção de leite do quarto mamário na mesma lactação, com um aumento significativo da produção dos úberes tratados. Ele obteve 15,18%, 20,71%,



20,23% e 21,40% de aumento na produção leiteira após o término do tratamento, quando tratava-se de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. agalactiae* e *Corynebacterium bovis*, respectivamente.

A antibióticoterapia é o tratamento mais amplamente utilizado em novilhas com mastite. Infusões intramamárias de antibióticos tem reduzido o número de quartos infectados no parto em novilhas (OLIVER *et. al.*, 1992). O tratamento da mastite com antimicrobianos durante a lactação é mais eficaz em vacas na sua primeira lactação do que em vacas mais velhas (PYORALA & PYORALA, 1994). A rotina de utilização de antimicrobianos pode causar problemas de resíduos e promove o desenvolvimento de linhagens resistentes. Para estabelecer mais estratégias de controle eficientes para a mastite em novilhas, mais informações sobre a espécie bacteriana envolvida no processo infeccioso são fundamentais.

## **2.9 Resistência antimicrobiana em *Staphylococcus coagulase-negativa***

A partir de 1950, quando os antimicrobianos passaram a ser amplamente utilizados, iniciou-se o fenômeno da resistência bacteriana. Desde então, o problema da resistência antimicrobiana passou a representar importância considerável em saúde pública (NAWAZ, 2002 in RAPINI *et. al.*, 2004).

A evolução e disseminação de microrganismos resistentes a antimicrobianos é o resultado da pressão seletiva imposta pelo homem, seja pela prescrição desnecessária dessas drogas ou pelo uso incorreto em tratamentos sem diagnóstico estabelecido, auto-medicação, desperdício de restos de antimicrobianos no meio ambiente e emprego desses fármacos como fatores de crescimento em produção animal (TAVARES, 2000). De acordo com SMITH (1974), é possível que os resíduos de antimicrobianos possam ser veiculados a pessoas que os consumam, produzindo efeitos de toxicidade ou reações alérgicas em indivíduos previamente sensibilizados, além de favorecer o crescimento de bactérias resistentes.

Segundo dados da Food and Drug Association – 2002 (RAPINI *et. al.*, 2004), aproximadamente 70% das bactérias que causam infecção hospitalar são resistentes à pelo menos uma das drogas comumente utilizadas para o tratamento

das infecções. Muitas opções de drogas utilizadas para o tratamento de infecções comuns estão se tornando limitadas, caras e, na maioria dos casos, inexistentes, sendo necessário, nesses casos, o uso de drogas potencialmente tóxicas ao homem que, na maioria das vezes, se encontram em fase experimental (National Center of Disease Control and Prevention, 2002 in RAPINI *et. al.*, 2004).

A resistência antimicrobiana pode ser carregada pelo cromossomo bacteriano ou pelo cromossomo extra bacteriano, denominado plasmídeo (RAPINI *et. al.*, 2004). Bactérias resistentes a antimicrobianos preocupam, uma vez que podem ser transmitidas ao homem pela ingestão de alimentos contaminados. No trato gastrointestinal elas podem transferir genes que conferem a resistência antimicrobiana a outras bactérias (WITTE, 2000) da própria espécie ou de espécies não relacionadas (RAPINI *et. al.*, 2004) patogênicas ou não.

### **2.10 Métodos de análise para classificação de *Staphylococcus* coagulase-negativa**

Anos atrás, a taxonomia do gênero *Staphylococcus* foi extensivamente submetida a alterações e 26 espécies de *Staphylococcus* foram delineadas pela hibridação DNA-DNA (KLOOS & SCHLEIFER, 1986; FRENEY *et. al.*, 1988). Embora, vários esquemas (KLOOS & SCHLEIFER, 1986; DEVRIESE *et. al.*, 1985; FRENEY *et. al.*, 1988) tem sido recomendados para identificação de espécies de estafilococos, muitas linhagens não puderam ser identificadas por métodos convencionais. Melhores métodos são necessários para identificar espécies, subespécies, e biótipos do gênero *Staphylococcus*.

Desde 1986, padrões de restrição de fragmentos hibridizando com RNAr marcado de *E. coli*, tem sido usado para análise de linhagens bacterianas (GRIMONT & GRIMONT, 1986; IRINO *et. al.*, 1988). Sondas podem ser usadas para visualizar padrões de restrição do gene RNAr que são genes RNAr clonados (YOGEV *et. al.*, 1988), porção final -5' RNAr marcado (GRIMONT & GRIMONT, 1986) ou cDNA (PITCHER *et. al.*, 1987). A sequência RNAr tem sido notavelmente conservada durante a evolução, uma simples sonda pode ser usada para visualizar

padrões em bactérias taxonomicamente distantes. Este padrão de gene de restrição RNAr pode ser de espécie, subespécie ou tipo específico dependendo do grau de heterogeneidade genômica intra-espécie. (GRIMONT & GRIMONT, 1986; IRINO *et. al.*, 1988).

Vários autores, utilizaram os seguintes testes para identificação de espécies de *Staphylococcus* (KLOOS & SCHLEIFER, 1986; DEVRIESE *et. al.*, 1985; FRENEY *et. al.*, 1988): diâmetro e pigmentação da colônia, sensibilidade a novobiocina (5µg por disco), nitrato redução, atividade proteolítica da caseína, produção de uréase, hemolisinas, DNase, DNase estável ao calor, fator *clumping*, coagulase (plasma de coelho), fosfatase alcalina, acetoina, diidrolase arginina, descarboxilase ornitina, produção de ácidos sob condições aeróbias de maltose, sucrose, D-trealose, D-manitol, D-celobiose, lactose, D-frutose, D-melezitose, D-xilose, D-arabinose, D-rafinose, D-melibiose, D-manose, D-turanose, D-ribose; produção de ácido de D-manitol em condições anaeróbias.

O Staph-Zym (Neo-Sensitabs de Rosco), consiste em um método de 10 testes (De PAULIS *et. al.*, 2003).

O API Staph System (Bio Merieux), é um método de identificação para *Staphylococcus* rápido, simples e confiável (CUNHA *et. al.*, 2004). Ele consiste de uma fita contendo um substrato desidratado em microtubos individuais, totalizando 19 testes. (DE PAULIS *et. al.*, 2003).

### 3. OBJETIVO

Os objetivos deste trabalho foram:

- avaliar a frequência de SCN (*Staphylococcus* coagulase-negativa) em 35 propriedades leiteiras;
- identificar as diferentes espécies de SCN, através da fermentação de carboidratos;
- determinar o nível de resistência a 18 antimicrobianos das amostras de SCN isolados;
- verificar presença de resistência múltipla às drogas antimicrobianas.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Animais

As amostras de leite foram fornecidas pelo Laboratório VITAFORT Indústria e Comércio de Produtos Veterinários sediado na cidade de Ribeirão Preto - SP, as mesmas foram coletadas por técnicos do mesmo laboratório, após ser efetuado o teste de CMT nos animais caracterizando mastite clínica ou subclínica.

Um total de 752 amostras de leite foram coletadas de vacas de diversas raças, em diferentes estágios de lactação, com mastite clínica ou subclínica, das quais, 109 amostras foram identificadas como *Staphylococcus coagulase-negativa*. Os animais eram criados em propriedades que utilizavam diferentes tipos de manejo, a higienização e o controle sanitário eram realizados conforme orientações do médico veterinário de cada propriedade. As amostras foram coletadas em 35 propriedades leiteiras, distribuídas em 9 estados do Brasil: São Paulo, Minas Gerais, Espírito Santo, Goiás, Bahia, Para, Rio Grande do Sul, Paraná e Santa Catarina, durante os meses de fevereiro a maio do ano de 2005.

### 4.2 Colheita do Material

#### 4.2.1 Colheita do leite através de testes utilizados no campo

Inicialmente foram identificados os animais portadores de mastite utilizando testes como CMT e teste da caneca de fundo preto.

Nos casos de **Mastite Clínica** deu-se a confirmação mediante a observação da presença de sinais locais como edema, endurecimento, palpitação e aumento de temperatura do úbere; além da presença de grumos no leite submetido ao teste da caneca de fundo preto.

Os demais animais foram submetidos ao teste de CMT (Califórnia Mastite Teste), para detecção da **Mastite Subclínica**, conforme descrito em SCHALM *et. al.*, 1971.

A detecção e o controle das mastites subclínicas tem sido o principal desafio para aqueles que trabalham com esta forma da doença. A identificação dos casos de mastite subclínica é realizada principalmente através de dois procedimentos (CORREA, 2003):

- ✓ Detecção quantitativa da hiperleucose no leite (através da Contagem de Células Somáticas – CCS) ou qualitativamente (através do teste de CMT, ou WMT – *White Mastitis Test*).
- ✓ Teste microbiológico, para identificar o (s) patógeno (s) causador (es) da mastite. Este teste exige análises em laboratório, podendo ser efetuado individualmente para cada animal ou no tanque de leite.

#### **4.2.1.1 Teste CMT – Califórnia Mastite Teste**

O teste de CMT (SCHALM *et. al.*, 1971) foi utilizado para confirmação de casos de mastite subclínica. O kit para o teste CMT (FATEC S/A) é composto por uma bandeja padrão, com quatro cavidades, e um frasco de 500 mL de reagente, o qual consiste em um detergente aniônico associado ao corante Azul de Bromotimol.

Antes de iniciar o teste CMT, era feita uma anti-sepsia do úbere, descartava-se os dois ou três primeiros jatos de leite (teste da caneca de fundo preto) e em seguida, eram ordenhados aproximadamente 2 mL de cada quarto na cavidade da bandeja. Delicadamente, inclinava-se a bandeja, retirando o excesso de leite, em seguida adicionava-se 2 mL do reagente em cada cavidade e agitava-se vagarosamente em movimentos circulares durante aproximadamente 2 minutos. Logo após observar o grau de coagulação era realizada a comparação com o padrão para o diagnóstico.

Vários níveis de mastite foram observados com o teste de CMT nos rebanhos analisados, e a interpretação do mesmo segue descrita abaixo:

**Interpretação do CMT:**

- ✓ Quando ocorreu a formação de pequenos coágulos (grumos) ou aumento na viscosidade, considerava-se uma mastite subclínica de baixo grau (+), ou seja, presumindo-se que havia entre 400.000 a 800.000 células/mL de leite.
- ✓ Quando ocorreu a formação de grumos mais consistentes, considerava-se uma mastite subclínica de médio grau (++), ou seja, presumindo-se que havia entre 800.000 a 5000.000 células/mL de leite.
- ✓ Quando ocorreu a formação de um gel, considerava-se uma mastite subclínica de alto grau (+++), ou seja, presumindo-se que havia mais de 5000.000 células/mL de leite (MILLER & KEARNS, 1967).

**4.2.2 Colheita das amostras de leite**

Inicialmente foi efetuada a higienização das mãos do retireiro e dos tetos das vacas, com uma solução de água e sabão, em seguida os tetos foram secados com papel toalha descartável.

Após a higiene do local foi feita uma anti-sepsia com uma solução de álcool 70%, em seguida, descartou-se os três primeiros jatos de leite, e as amostras eram coletadas diretamente em uma seringa descartável. Um volume de 0,5 mL deste leite, foi transferido para um frasco (10 mL) devidamente lacrado e identificado, contendo 5 mL de meio de cultura para transporte estéril (*Stuart*), o qual era acondicionado em caixas isotérmicas e encaminhadas ao laboratório, para processamento.

**4.2.3 Recepção das amostras e caracterização das cepas**

No laboratório as amostras de leite mastítico foram submetidas aos seguintes procedimentos:

- a. Semeou-se 0,1 mL de cada amostra em placas contendo ágar sangue (ágar-ágar acrescido de 5% de sangue de carneiro), e foram incubadas a 37 C por 24 a 48 horas; após este período observou-se o crescimento das colônias características de cor branca ou amarelas, e o aparecimento ou não de halo de hemólise;
- b. Cinco ou seis colônias foram coletadas e suspensas em tubos de ensaio contendo 3 mL de salina fisiológica;
- c. Semeou-se por esgotamento o material suspenso em salina em placas contendo ágar sal de manitol e foram incubadas a 37 C por 24 a 48 horas;
- d. Observando-se o crescimento em Manitol, colônias de cor amarelo-dourada, foi confeccionado o esfregaço em lamínas e posteriormente a coloração de Gram;
- e. O resultado foi considerado positivo quando o exame microscópico revelou a presença de cocos Gram-positivo agrupados com formato de cachos de uva (*Staphylococcus sp*);
- f. Após a confirmação das características específicas as amostras de *Staphylococcus sp* foram submetidas aos seguintes testes: catalase e coagulase permitindo a diferenciação de cepas em *Staphylococcus coagulase-positiva* ou *Staphylococcus coagulase-negativa*;
- g. Os próximos testes descritos foram utilizados para verificar a patogenicidade dos SCN e identificação de suas espécies.

#### 4.2.4 Provas de Virulência

Alguns autores relacionam testes bioquímicos como produção de coagulase, termonuclease, hemólise e fermentação de manitol com a capacidade das cepas de *Staphylococcus spp* e *S. aureus* em produzirem enterotoxinas. Estes são testes indiretos, úteis para detecção de cepas potencialmente enterotoxigênicas, embora autores tenham verificado que características fisiológicas podem ou não diferenciar cepas enterotoxigênicas das não enterotoxigênicas (GILMOUR & HARVEY, 1990;



WILSON *et. al.*, 1991). Neste estudo foram utilizados os teste de produção de coagulase, hemólise, DNase e Lecitinase, conforme descritos nos próximos itens.

#### **4.2.4.1 Produção de Hemólise**

O teste de hemólise permite verificar a atividade hemolítica das espécies.

A produção de hemólise foi determinada em placas contendo ágar sangue (ágar bacteriológico acrescido de 5% de sangue de carneiro); as zonas claramente visíveis, após incubação a 37°C por 24 a 48 horas em condições aeróbicas, foram classificadas como hemólise positiva (DEVRIESE & SCHLEIFER, 1985).

#### **4.2.4.2 Plasma Coagulase**

A capacidade dos *Staphylococcus* de produzirem uma substância que coagula o plasma sanguíneo foi primeiramente observada por LOEB (1903-4) in ANDERSON (1976). MUCH (1908) in ANDERSON (1976), notou esta característica somente em linhagens patogênicas, capacidade esta de coagular plasma de coelho e humano sendo considerado o melhor e único indicador de patogenicidade.

Há dois pontos importantes com relação ao mecanismo de virulência dos estafilococos em gado:

a) as vacas são relativamente deficientes de CRF (reagente ao fator coagulase), quando comparadas ao coelho, quando o CRF não e ausente (DUTHIE & LORENZ, 1952; ORTH *et. al.*, 1971 in ANDERSON, 1976);

b) algumas linhagens de estafilococos apresentam uma reação de coagulase positiva quando plasma de coelho é usado, entretanto, podem não apresentar reação positiva quando plasma de bovino é usado (BLOBEL & BERMAN, 1961).

A atividade da enzima coagulase foi testada utilizando o plasma de coelho liofilizado da (Laborclin). As cepas de *Staphylococcus sp* previamente identificadas foram incubadas em 3 mL de caldo BHI (Biobras), por 6 a 8 horas a 37°C. Após a obtenção do inoculo, com uma pipeta acrescentou-se de 2 a 3 gotas do inoculo a um novo tubo de ensaio estéril, contendo 0,5 mL de plasma de coelho recém hidratado, conforme orientações do fabricante. Depois os tubos de ensaio foram suavemente girados, e incubados a 37°C em banho-maria. Nas primeiras 4 horas os tubos foram suavemente inclinados para os lados, a cada 30 minutos, possibilitando verificar a formação de coágulos ou uma simples rede de fibrina, que caracteriza a positividade da prova (SPERBER & TATINI, 1975).

A hidratação do plasma de coelho liofilizado (Laborclin), foi realizada adicionando-se 3 mL de solução fisiológica (NaCl 0,85%) esterelizada.

#### **4.2.4.3 DNase (desoxirribonuclease)**

Inicialmente as amostras de SCN foram incubadas em caldo BHI (Biobras) a 37°C por 24 horas. Após este periodo estas foram repicadas em placas contendo o meio ágar DNase (Biobras) acrescido de 0,8 mL de solução de cloreto de calcio 10% (p/v) para estimular a produção da enzima DNase (DiSALVO, 1958), e incubadas a 37°C por 24 a 48 horas. Após o período de incubação, as placas foram inundadas com solução de ácido clorídrico 1N possibilitando a precipitação do DNA integro e a leitura foi realizada após 10 minutos verificando a formação de um halo claro (hidrólise do DNA pela ação enzimática da DNase) ao redor do local da semeadura, resultado este caracterizado positivo.

#### **4.2.4.4 Lecitinase**

As amostras de SCN foram incubadas em caldo BHI (Biobras) a 37°C por 24 horas. Após este período, as amostras foram semeadas por

esgotamento em três direções da placa contendo o meio ágar NI (Biobras), e incubadas por 24 a 48 horas. A formação de um halo opalescente ao redor da colônia, caracteriza a amostra lecitinase positiva (SILVA *et. al.*, 2001).

#### **4.2.5 Susceptibilidade antimicrobiana “*in vitro*” – Antibiograma**

As culturas identificadas como SCN foram repicadas em caldo BHI (infusão cérebro e coração) e incubadas a 37°C por 6 horas. Após a incubação as amostras passaram por padronização da diluição, através da escala de MacFarland, a turbidez de 0,5 (BIER, 1990). Após a padronização, as amostras foram semeadas em placas de Petri contendo ágar Muller Hinton (Biobras) com o auxílio de um swab estéril, e empregou-se o método de difusão de antibióticos em discos segundo BAUER *et. al.*, (1966). Os discos de antimicrobianos utilizados foram: amoxicilina+ácido clavulânico; ampicilina; bacitracina; canamicina; cefalexina; eritromicina; estreptomicina; gentamicina; lincomicina; neomicina; nitrofurantoina; novobiocina; oxacilina, penicilina; sulfonamidas; sulfametoxazol+trimetoprim; tetraciclina; cefotaxima. Após 24 horas de incubação a 37°C verificou-se a formação de zonas de inibição, e estas foram medidas em milímetros, com paquímetro e, o biótipo foi classificado como sensível, intermediário (sensibilidade parcial) ou resistente ao antimicrobiano testado, conforme tabela disponibilizada pelo laboratório fabricante (Sensibiodisc – CECON) dos discos, baseado nas recomendações do NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1999).

#### **4.2.6 Série Bioquímica**

O método proposto por KLOOS & SCHLEIFER (1975) e BANNERMAN (2003), consiste em um conjunto de testes bioquímicos que determina a utilização de açúcares xylose, arabinose, sucrose, trealose, maltose, manitol, lactose, xylitol, ribose, frutose e manose, produção de hemolisina, nitrato redução, presença de urease e ornitina descarboxilase e resistência a novobiocina caracterizada por um

halo de inibição acima de 16 mm. O resultado destes testes foram obtidos após 24, 48 e 72 horas de incubação a 37°C em condições aeróbicas.

No presente estudo foi utilizado um método simplificado para identificação das cepas de SCN proposto por CUNHA *et. al.*, 2004. Após a identificação das cepas de SCN, foram utilizados os seguintes teste bioquímicos: fermentação de 5 açúcares (xilose, sucrose, maltose, manose e trealose), produção de hemólise e resistência a novobiocina 5µg/mL através do método de discos para antibiograma.

Para o teste de fermentação de carboidratos, foram suspensas 5 ou 6 colônias de SCN em tubos de ensaio contendo 4mL de meio Base Hiss acrescido com vermelho de metila e de 1% do carboidrato a ser testado.

O resultado foi observado após incubação a 37°C em condições aeróbicas por um período máximo de 72 horas, a leitura efetuava-se a cada 24 horas. Sendo caracterizado o crescimento positivo das amostras, observou a mudança na coloração do meio de cultura, de vermelho/alaranjado para amarelo/esbranquiçado, caracterizava-se a reação positiva, ou seja, ocorreu a fermentação do carboidrato.

## 5. RESULTADOS

No presente estudo, foram realizadas assepticamente 752 coletas de leite, em vacas acometidas de mastite clínica ou subclínica, as amostras foram obtidas de 35 propriedades de nove estados brasileiros, durante os meses de fevereiro a maio de 2005, para a realização do exame microbiológico. As amostras foram obtidas segundo o protocolo estabelecido no item 4 (material e métodos).

Após a realização do exame microbiológico 50 amostras não apresentaram o crescimento esperado para os meios selecionados durante o período de incubação, correspondendo a 6,6% das amostras analisadas.

É importante destacar, que em uma amostra de leite positiva ao exame microbiológico chegamos a isolar um ou mais agentes microbianos. Das amostras analisadas e positivas ao exame microbiológico, encontramos 997 agentes microbianos entre bactérias e fungos de diferentes gêneros e espécies.

Do total de agentes microbianos isolados (997), verificou-se a presença de 355 cepas de bactérias pertencentes ao gênero *Staphylococcus sp*, 405 cepas de bacilos Gram-negativo (bgn), conhecidos como bactérias ambientais, 21 cepas de *Streptococcus sp* e 216 cepas de fungos e leveduras, conforme descrito na tabela abaixo.

**Tabela 1.** Distribuição dos 997 patógenos isolados das amostras de leite mastítico analisadas.

Agentes	Número de cepas isoladas, ( %)
<i>Staphylococcus sp</i>	355 (35,61)
<i>Streptococcus sp</i>	21 (2,11)
Bgn	405 (40,62)
Fungos/leveduras	216 (21,66)

Das 355 cepas de *Staphylococcus sp* isoladas, 246 (69,3%) foram classificados *Staphylococcus* coagulase-positiva e 109 (30,7%) como *Staphylococcus* coagulase-negativa.

Na Tabela 2, podemos observar a distribuição por estado de todos os patógenos isolados das amostras de leite mastítico, destacando a grande participação do gênero *Staphylococcus sp* e dos bgn (Bacilo Gram-negativo).

**Tabela 2.** Distribuição por estado de todos os patógenos isolados das amostras de leite mastítico.

* Estados	Total de amostras coletadas	<i>Staphylococcus sp</i>	<i>Streptococcus sp</i>	bgn	Fungos/ Leveduras	Amostras Negativas
SP	17	2	0	9	1	6
MG	118	88	2	68	43	7
ES	286	130	14	91	94	21
GO	22	13	0	12	4	0
BA	22	13	0	18	1	0
PA	4	2	0	1	0	2
PR	222	78	2	179	52	8
SC	34	15	3	13	15	1
RS	27	14	0	14	6	5
Total	752	355	21	405	216	50

\* Referem-se aos 9 estados brasileiros, onde foram coletadas as amostras: SP – São Paulo; MG – Minas Gerais; ES – Espírito Santo; GO – Goiás; BA – Bahia; PA – Pará; PR – Paraná; SC – Santa Catarina; RS – Rio Grande do Sul.

Na Tabela 3, apresentamos a distribuição por estado das 355 cepas de *Staphylococcus sp* isoladas das 752 culturas de leite mastítico e seus respectivos percentuais .

**Tabela 3.** Distribuição por estado das 355 cepas de *Staphylococcus sp.*

* Estados	<i>Staph. coag. (-), (%)**</i>	<i>Staph. coag. (+), (%)***</i>
SP	1 (0,28)	1 (0,28)
MG	19 (5,33)	69 (19,44)
ES	37 (10,42)	93 (26,20)
GO	4 (1,13)	9 (2,54)
BA	9 (2,54)	4 (1,13)
PA	1 (0,28)	1 (0,28)
PR	24 (6,76)	54 (15,21)
SC	7 (1,97)	8 (2,25)
RS	7 (1,97)	7 (1,97)
Total	109 (30,7)	246 (69,30)

\* Refere-se aos 9 estados brasileiros, onde foram coletadas as amostras: SP – São Paulo; MG – Minas Gerais; ES – Espírito Santo; GO – Goiás; BA – Bahia; PA – Para, PR – Paraná; SC – Santa Catarina; RS – Rio Grande do Sul; \*\* Referem-se a percentagem das amostras de *Staphylococcus* coagulase-negativa e \*\*\**Staphylococcus* coagulase-positiva com relação ao total de amostras de *Staphylococcus sp* (355).

O antibiograma foi realizado em 109 amostras caracterizadas como *Staphylococcus* coagulase-negativa, utilizando-se 18 diferentes princípios ativos, conforme descrito na seção 4.2.5.

Todos os SCN isolados e testados foram resistentes a pelo menos um dos 18 antimicrobianos testados. Podemos destacar que houve altos índices de resistência a alguns antimicrobianos que serão discutidos no próximo item. Dentre os antimicrobianos com elevado índice de resistência estão penicilina (93,6%), seguida pela resistência a sulfonamidas (89%), novobiocina (88%) e ampicilina (85,3). Os demais resultados obtidos no antibiograma podem ser apreciados na Tabela 4, que exhibe os índices de sensibilidade e resistência aos antimicrobianos, e suas respectivas percentagens.

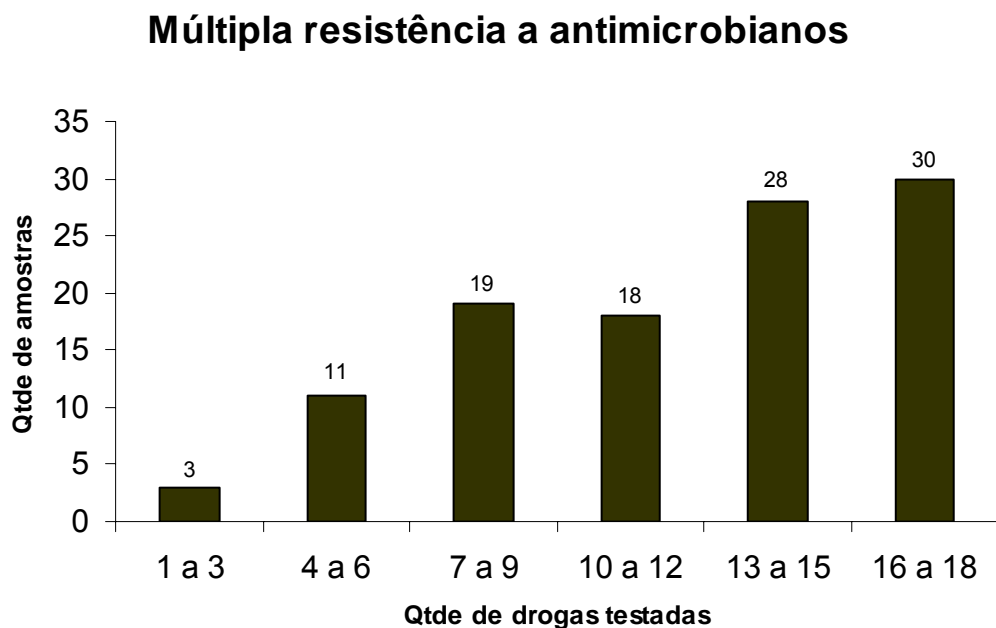
**Tabela 4.** Susceptibilidade a 18 antimicrobianos, apresentada pelas 109 cepas de *Staphylococcus coagulase-negativa* provenientes de 752 amostras de leite bovino de 9 estados do Brasil.

	*Princípio ativo	Sensibilidade, (%)	Intermediário, (%)	Resistente, (%)
AMO	58 (53,2)	0	51 (46,8)	
AMP	16 (14,7)	0	93 (85,3)	
BAC	20 (18,3)	25 (22,9)	64 (58,7)	
CAN	14 (12,8)	9 (8,2)	86 (78,9)	
CEF	25 (23)	0	84 (77)	
CLO	49 (44,9)	15 (13,8)	45 (41,3)	
ERI	30 (27,5)	12 (11)	67 (61,5)	
EST	24 (22)	16 (14,7)	69 (63,3)	
GEN	43 (39,5)	18 (16,5)	48 (44)	
LIN	23 (21,1)	3 (2,7)	83 (76,2)	
NEO	22 (20,2)	23 (21,1)	64 (58,7)	
NIT	36 (33)	23 (21,1)	50 (45,9)	
NOV	12 (11)	1 (1)	96 (88)	
OXA	18 (16,5)	3 (2,8)	88 (80,7)	
PEN	7 (6,4)	0	102 (93,6)	
SUL	8 (7,3)	4 (3,7)	97 (89)	
SUT	45 (41,3)	7 (6,4)	57 (52,2)	
TET	24 (22)	10 (9,2)	75 (68,9)	
CTX	24 (22)	30 (27,5)	55 (50,4)	

AMO: amoxicilina+ácido clavulânico 30µg; AMP: ampicilina 10µg; BAC: bacitracina 10UI; CAN: canamicina; CEF: cefalexina 30µg; CLO: cloranfenicol 30µg; ERI: eritromicina 15µg; EST: estreptomicina 10µg; GEN: gentamicina 10µg; LIN: lincomicina; NEO: neomicina 30µg; NIT: nitrofurantóina 300µg; NOV: novobiocina 5µg; OXA: oxacilina, PEN: penicilina 10UI; SUL: sulfonamidas 300µg; SUT: sulfametoxazol+trimetoprim; TET: tetraciclina 30µg; CTX: cefotaxima 30µg.



A resistência a múltiplas drogas, observada neste estudo, se mostrou um evento comum e quase todas as cepas isoladas mostraram-se resistentes a duas ou mais drogas (Figura 1). Um nível alarmante de resistência à múltiplas drogas foi encontrado, das 109 cepas de SCN, 14% (15) das amostras analisadas, foram resistentes a todos os antimicrobianos testados (18), outro dado relevante, também descrito nesta figura, é a quantidade de amostras resistentes (76) a mais de 10 diferentes drogas testadas, correspondendo a 70% do total das amostras analisadas.



**Figura 1.** Distribuição de multi-resistência a 18 antimicrobianos em 109 cepas de *Staphylococci* coagulase-negativa isolados de amostras de leite obtidas de vacas com mastite no Brasil (2005).

Nas provas de virulência, verificamos que a enzima DNase esteve ativa em 40,4% (44) das cepas de SCN analisadas, enquanto, a Lecitinase encontrou-se ativa em apenas 3,7% (4) das amostras. Entre as 109 cepas de SCN analisadas, duas (1,8%) apresentaram as duas enzimas de virulência ativas simultaneamente (DNase+Lecitinase), e 57,8% (63) dessas amostras foram negativas às duas provas de virulência. Conforme descrito na tabela 5.

**Tabela 5.** Resultados apresentados pelas 109 amostras de SCN submetidas às provas de virulência

Provas de Virulência	Número de cepas, ( %)
DNase	355 (35,61)
Lecitinase	21 (2,11)
DNase + Lecitinase	405 (40,62)
Amostras negativas p/ as 2 provas	216 (21,66)

Para a caracterização das espécies de SCN foram utilizados testes bioquímicos como fermentação de carboidratos, produção de hemólise e resistência a novobiocina 5µg/mL, conforme descrito no item 4.2.4.1. Na Tabela 6, verificamos os resultados desses testes utilizados para caracterização das 109 cepas de *Staphylococcus* coagulase-negativa como: *S. simulans*, *S. haemolyticus*, *S. warneri* e *S. cohnii*.

**Tabela 6.** Caracterização das 109 cepas de SNC, provenientes de 752 amostras de leite bovino de 9 estados do Brasil, através de testes bioquímicos propostos por CUNHA, *et. al.*, 2004.

Produção de ácido em aerobiose							
Espécies	Hemólise	D-Xilose	Sucrose	D-Treose	Maltose	Manose	Resistência Novobiocina 5µg/mL
<i>S. simulans</i>	+, -	-	+	d	-w	d	V
<i>S. haemolyticus</i>	+	-	+	+	+	-	+
<i>S. warneri</i>	+, -	-	+	+	+	-	-
<i>S. cohnii</i>	-	-	-	+	+	+, -	+

Os sinais utilizados na tabela referem-se: +: reação positiva; -: reação negativa; d: de 11 a 89% das linhagens foram positivas; -w: algumas reações fracamente negativas (2 amostras); V: variável

Na Tabela 7 podemos observar o número e o percentual de cada espécie de SCN identificadas a partir das 109 cepas previamente isoladas de leite mastítico de 752 amostras provenientes de 9 estados do Brasil, destacando que o SCN encontrado com maior frequência foi o *S. simulans* (94,5).

**Tabela 7.** Distribuição por espécie das 109 cepas de SCN isoladas de amostras de leite mastítico bovino no Brasil em 2005.

Espécies	N. de amostras, (%)
<i>S. simulans</i>	103 (94,5)
<i>S. haemolyticus</i>	2 (1,8)
<i>S. warneri</i>	2 (1,8)
<i>S. cohnii</i>	2 (1,8)
Total	109 (100)

## 6. DISCUSSÃO

O exame microbiológico de amostras de leite coletadas assepticamente é considerado o método padrão para determinação da saúde do úbere e para o diagnóstico da mastite bovina (RADOSTITS *et. al.*, 1994). Os resultados obtidos são fundamentais para a compreensão dos problemas específicos dos rebanhos, para orientar medidas racionais de controle da mastite e sugerir alterações a respeito do manejo adotado (RADOSTITS *et. al.*, 1994; BRAMLEY *et. al.*, 1999).

Os resultados dos exames microbiológicos realizados nas 752 amostras de leite, provenientes de nove estados brasileiros, são apresentados na tabela 1. Considerando o total de agentes isolados (997), a porcentagem encontrada para *Staphylococcus* sp (35,61%) está de acordo com alguns relatos brasileiros como, BARBALHO & MOTA (2001), que após analisarem 104 quartos mamários no estado de Pernambuco, demonstraram que as bactérias do gênero *Staphylococcus* sp foram isoladas de 50 amostras, correspondendo a 38,76% do total dos agentes isolados. COSTA *et. al.* (1995), observaram que um isolamento de 34,09% de cepas *Staphylococcus* sp sendo neste caso os agentes etiológicos mais freqüentemente isolados.

Em relação a distribuição das 997 cepas, obtidas a partir das 752 amostras de leite, por estados brasileiros (Tabela 2) nenhuma conclusão definitiva pode se apresentada, pois os estados que apresentaram um maior número de espécies isoladas, foi também o estado que forneceu um maior numero de amostras para análise. Como é o caso dos seguintes estados, Espírito Santo, forneceu 286, das quais 130 cepas pertenciam ao gênero *Staphylococcus* sp, Minas Gerais das 118 amostras fornecidas, 88 foram positivas para o gênero de interesse e Paraná, de 222, 78 foram classificadas como *Staphylococcus* sp. Alguns estados como Pará e São Paulo, apresentaram um baixo número de amostras de *Staphylococcus* sp, pois foram os estados que forneceram o menor número de amostras para análise, 4 (sendo 2 *Staphylococcus* sp) e 17 (2), respectivamente.

A mastite é a principal causa para o uso de antimicrobianos em fazendas leiteiras e, portanto a resistência antimicrobiana dos patógenos causadores da mastite tem despertado grande interesse com o passar dos últimos anos. As atividades *in vitro* de cada agente antimicrobiano testado contra as cepas SCN estão resumidas na Tabela 4. As 109 cepas de SCN isoladas e testadas foram resistentes a pelo menos um antimicrobiano. A maior resistência foi observada contra penicilina 93.5% (102), seguida pela resistência à sulfonamida 88.9% (97), novobiocina 88.6% (96) e ampicilina 85.3% (93). Foi observada também uma importante resistência contra oxacilina 80.7% (88) e lincomicina 76.1% (83).

A sensibilidade de cepas SCN isoladas a partir IMI bovina em relação aos agentes antimicrobianos já foi relatada por vários autores (McDONALD & ANDERSON, 1981; AARESTRUP *et. al.*, 1995; MYLLYS *et. al.*, 1998; SALMON *et. al.*, 1998; GENTILINI *et. al.*, 2002; AMARAL *et. al.*, 2003; RAJALA-SCHULTZ *et. al.*, 2004; CORRÊA *et. al.*, 2005). Cepas que apresentam sensibilidade a penicilina geralmente apresentam sensibilidade a outros antibióticos beta-lactamase sensível, como por exemplo, a ampicilina.

A resistência à penicilina encontrada neste estudo é mais alta do que relatado em outros estudos conduzidos na Argentina (21.1% - GENTILINI *et. al.*, 2002), Finlândia (37.2% - MYLLYS *et. al.*, 1998), Dinamarca (36.1% - AARESTRUP *et. al.*, 1995), Estados Unidos (42.7% - McDONALD & ANDERSON, 1981), mas de acordo com os resultados relatados no Brasil (80.4% - PEREIRA & SIQUEIRA, 1995; 77.8% - CORREA *et. al.*, 2005). O aumento no número de estafilococos isolados mostrando resistência à penicilina, ampicilina e lincomicina, está de acordo com outros estudos brasileiros (NADER FILHO *et. al.*, 1985; AMARAL *et. al.*, 2003; CORRÊA *et. al.*, 2005) e também à resistência a sulfonamida (CORRÊA *et. al.*, 2005), o aumento no número de isolados mostrando resistência a metilicina (oxacilina) 88 (80,7%) é preocupante.

A baixa resposta a antibioticoterapia no tratamento das mastites causadas por *Staphylococcus* tem sido amplamente estudada em um esforço com o propósito de determinar os fatores responsáveis pela falha na terapia (WILSON *et. al.*, 1999). Uma série de interações entre os patógenos e o hospedeiro tem sido apontada

como fatores que influenciam negativamente no sucesso da terapia, tais como, a baixa penetração da droga no tecido infectado, a localização intracelular da bactéria, inclusive em leucócitos, inatividade metabólica da bactéria, atividades reduzida do antimicrobiano no leite e a própria resistência bacteriana frente aos antimicrobianos (CARDOSO *et.al.*, 2000), isto levou os pesquisadores a desenvolverem vacinas contra *S. aureus* na tentativa de imunização.

A resistência a múltiplas drogas se mostrou um evento comum e quase todas as cepas isoladas mostraram resistência a 2 ou mais drogas (Figura 1). A ocorrência de linhagens multi-resistentes pode ser uma resposta á pressão seletiva causada pelo uso abusivo de antimicrobianos na pratica animal (FRANKLIN, 1999). No presente estudo, um nível alarmante de resistência a multidrogas foi detectado quando comparado com resultados de outros autores. TOLLERSRUD *et. al.* (2000), através de 86 isolados de *S. aureus* encontraram somente 2 cepas resistentes a 3 antimicrobianos. OLIVEIRA *et. al.* (2002) e CARDOSO *et. al.* (2000) não relataram qualquer cepa com resistência à multidrogas, enquanto que, CORRÊA *et. al.* (2005) relataram um alto nível de multi-resistência para *S. aureus* isolados de leite bovino mastítico.

O aparecimento e disseminação da resistência antimicrobiana é o resultado de numerosas interações complexas entre antimicrobianos, microrganismos e o meio ambiente (McDERMOTT *et. al.*, 2002). A resistência a antimicrobianos pode ser adquirida espontaneamente por mutações gênicas, e passada verticalmente por seleção as células filhas. A resistência pode ser adquirida pela transferência horizontal de elementos móveis de DNA de uma célula doadora para outra espécie bacteriana (SEFTON, 2002). Existem evidências crescentes que genes de resistência podem ser espalhados e trocados entre diferentes populações bacterianas (McDERMOTT *et. al.* 2002; O'BRIEN, 2002), assim as cepas SCN podem se comportar como um possível reservatório de genes de resistência entre estafilococos (ARCHER & CLIMO, 1994).

O método de disco de difusão para a determinação da sensibilidade a drogas antimicrobianas, embora amplamente utilizado e economicamente atrativo,

apresenta algumas limitações. O critério interpretativo utilizado para classificar as cepas como sensível ou resistente são baseados em resultados obtidos para cepas bacterianas provenientes de humanos (WATTS & YANCEY, 1994). Assim, as diretrizes do NCCLS podem não ser apropriadas para determinar a sensibilidade antimicrobiana dos patógenos de mastite bovina e certamente elas não podem ser utilizados para prever a eficácia clínica da droga no tratamento da mastite bovina (RAJALA-SCHULTZ *et. al.*, 2004).

Os SCN são freqüentemente considerados como pouco patogênicos para mastite e alguns pesquisadores tem relatado que eles podem proteger o úbere de infecções causadas pelos agentes mais patogênicos (SCHUKKEN *et. al.*, 1989), enquanto, outros autores não têm observado qualquer proteção (HOGAN *et. al.*, 1988). A identificação das cepas CNS é importante, pois permite uma idéia da patogenicidade e da sensibilidade antimicrobiana de cada cepa, de acordo com a espécie a que ela pertence. Quatro espécies de SCN foram identificadas entre as 109 cepas testadas (Tabela 7). Entre elas *S. simulans* foi a espécie mais freqüentemente isolada (94.5%), o que está de acordo com os resultados descritos por BIGERSSON *et. al.* (1992) e JARP (1991). Outros autores também relataram que *S. simulans* é a espécie mais freqüentemente isolada entre os SCN em quartos infectados subclínicamente em vacas e leite bovino (WATTS *et. al.*, 1988; RATHER *et. al.*, 1986; JARP, 1991) e em casos de mastites clínicas e subclínicas, HOLMBERG (1985) na Suécia e GENTILINI (2) na Argentina.

Outros trabalhos (BES *et. al.*, 2000; BARBALHO & MOTTA, 2001) indicaram *S. chromogenes*, *S. epidermidis*, *S. hyicus* e *S. simulans* como as espécies de SCN mais comumente encontradas na mastite. No Japão, BABA *et. al.* (1980) encontraram o *S. epidermidis* como a espécie de SCN mais freqüentemente isolada em quartos com mastite clínica bovina. Na Nova Zelândia, HODGES, *et. al.* (1984) isolaram *S. chromogenes* de mastite subclínica em vacas, enquanto WATTS & OWENS (1989) encontraram uma elevada prevalência de *S. hyicus* em infecções subclínicas em vacas leiteiras nos EUA.

De acordo com HOLMBERG (1973), a mastite clínica bovina pode ser induzida experimentalmente pela inoculação do *S. epidermidis* dentro do teto.

Entretanto, um grande número de células de *S. epidermidis* foi necessário para a indução de uma mastite severa, e a mesma foi de curta duração. PYÖRÄLA & SYVÄJÄRVI (1987), relataram que a reação inflamatória nos tetos afetados quando os SCN foram as espécies isoladas foi mais branda do que quando outros patógenos da mastite estavam presentes.

Os estudos envolvendo a predominância de uma determinada espécie causando mastite em um determinado rebanho, ainda não são conclusivos e necessitam ser aprofundados analisando inclusive o histórico de antibioterapia a que aquele rebanho foi anteriormente submetido.



## 7. CONCLUSÃO

- A freqüência de cepas de SCN encontrada foi de 30,7% nos rebanhos analisados;
- *S. simulans* se mostrou a espécie predominante nestes rebanhos;
- Foi encontrado um elevado grau de resistência para todas as 18 drogas antimicrobianas testadas;
- A resistência a múltipla drogas se mostrou elevada, com 70,0% das cepas analisadas, apresentando resistência a 10 ou mais drogas;
- Não foi possível estabelecer uma relação direta entre os níveis de virulência e os níveis de resistência aos antimicrobianos utilizados nas cepas analisadas.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARESTRUP, F.M; WEGENER, H.C; ROSDAHL, V.T et al. *Staphylococcal* and other bacterial species associated with intramammary infections in Danish herds. **Acta Vet. Scand.** 36: 475-487, 1995.

AARESTRUP, F.M., JENSEN, N.E. Prevalence and duration of intramammary infection in Danish heifer during the prepartum period. **J. Dairy Sci.** 80, p. 307-312, 1997.

AARESTRUP, F.M., WEGENER, H.C., JENSEN, N.E., JONSSON, O., MYLLIS, V., THOBERG, B.M., WAAGE, S., ROSDAHL, V.T. A study of phage and ribotype patterns of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in the Nordic Countries. **Acta Vet. Scand.** 38(3): 143-152, 1997.

ALDRIDGE, K.E. Coagulase-negative staphylococci. **Infection Control.** 3: 161-165, 1982.

ALCARÃZ, L.E.; SATORRES, S.E.; SEPÚLVEDA, L.; CENTORBI, O.N.P. Detección de *Staphylococcus aureus* spp. en manipuladores de alimentos. **La Alimentación Latino Americana**, 219: 44-47, 1997.

AMARAL, L.A; ROSSI JUNIOR, O.D; NADER FILHO, A. Ocorrência de *Staphylococcus* sp em água utilizada em propriedades leiteiras do Estado de São Paulo. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 55: 1-9, 2003.

ANDERSON, J.C. Mechanisms of staphylococcal virulence in relation to bovine mastitis. **British Vet. Journal**, 132(3): 229-245, 1976.

ARCHER, G.L; CLIMO, M.W. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 38, p. 2231-2237, 1994.

BABA, E.; FUKATA, T. & MATSUMOTO, H. Ecological studies on coagulase negative staphylococci in and around bovine udder. **Bull. Univ. Osaka Pref.**, Ser. B., 32: 69-75, 1980.

BAIRD-PARKER, A.C. Classification de Staphylococci and Micrococci from world-wide sources. **J. Gen. Microbiol.**, 38, 363-387, 1965.

BALDASSI, L.; FILHO, M.F.; HIPÓLITO, M.; MOLIN, A.A.P.; CALIL, E.M.B.; PIRES, D.C. Etiologia da mastite subclínica na Bacia Leiteira de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo. **Arq. Inst. Biol. São Paulo**, 58: 29-36, 1991.

BAKER, J.S. Differentiation of micrococci from coagulase-negative staphylococci. P.A. Mardh and Schleifer (Editors). Coagulase-negative Staphylococci. **Almqvist & Wiksell International**, Stockholm, Sweden, 27-33, 1986.

BANNERMAN, T.L. *Staphylococcus, Micrococcus* and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In P.R. Murray, E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.A. Pfaller, R.H. Tenover (eds), **Manual of clinical microbiology**. American Society Microbiology, Washington, 384-404, 2003.

BARBALHO, T.C.F.; MOTA, R. A. Isolamento de agentes bacterianos envolvidos em mastite subclínica bovina no Estado de Pernambuco. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.** 2(2): 31-36, 2001

BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am. J. Clin. Pathol.**, 45: 493-496, 1966.

BERGERON, M., KE, D., MÉNARD, C., PICARD, F., GAGNON, M., BERNIER, M., OUELLETTE, M., ROY, P., MARCOUX, S., FRASER, W. Rapid detection of group B streptococci in pregnant woman at delivery. **N. Engl. J. Med.** 343: 175-179, 2000.

BIER, O. **Microbiologia e Imunologia**. 24<sup>a</sup> Ed. São Paulo: Melhoramentos, p. 1342, 1990.

BES, M; GUERIN-FAUBLEE, V; MEUGNIER, H. Improvement of the identification of staphylococci isolated from bovine mammary infections using molecular methods. **Vet. Microb.** 71: 287-294, 2000.

BIGERSON A., JONSSON P., HOLMBERG O. Species identification and some characteristics of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine udders. **Vet. Microbiol.** 31: 181-189, 1992.

BLOBEL, H. & BERMAN, D.T. **J. Infect. Dis.** 108: 63, 1961.

BLOOD, D.C., RADOSTITS, O.M. Veterinary medicine. **A text book of the disease of cattle, sheep, pigs and horses**. Seventh edition. English Language Book Society/Baillière Tindall, p.1502, 1989.

BLOOD, D.C., RADOSTITS, O.M. **Clínica Veterinária**, 7<sup>a</sup> Ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, cap. 15: 424-463, 1991.

BLOWEY, R. W. An assessment of the economic benefits of a mastitis control scheme. **Veterinary Record**, 119, 551-553, 1986.

BRAMLEY, A.J., COLLOR, J.S., ERSKINE, R.J. Current concepts of bovine mastitis. Madison: **National Mastitis Council**, 4<sup>a</sup> Ed., p. 64, 1996.

- BRANDT, L., and SWAHN, B. Subacute bacterial endocarditis due to coagulase negative *Staphylococcus albus*. **Acta Med. Scand.** 166, 125-132, 1960.
- BRUMFITT, W. and HAMILTON-MILLER, J. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **N. Engl. J. Med.**, 320, p. 1188-1196, 1989.
- CARDOSO, H.F.T.; COSTA, G.M.; SILVA, N. Susceptibilidade a antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* isolados de leite bovino no estado de Minas Gerais. **R. Bras. Méd. Vet.** 22(5): 199-203, 2000.
- CARTER, G.R. **Fundamentos de bacteriologia e micologia veterinária**. São Paulo, Roca, 1988.
- CHAFFER, A.M.I. Coagulase-negative *Staphylococcus intermedius* isolated from milk from dairy cows in israel. **Veterinary Record.** 143, 592-593, 1998.
- CIFRIAN, E., GUIDRY, A.J. BRIEN, C.N.O., MARQUARDT, W.W. Effect of antibodies to staphylococcal on the cytotoxicity for and adherence of the organism to bovine mammary epithelial cells. **AVJR.** 57(9): 1308-1311, 1996.
- CORREA, I. Resistência a drogas antimicrobianas de cepas de *Staphylococci* coagulase-positiva isoladas de leite mastítico bovino. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Jaboticabal – SP, 2003.
- CORREA, I; CORREA, M.GP; MARIN, J.M. Antimicrobial susceptibility of strains of coagulase-positive *Staphylococcus* isolated from mastitic bovine milk. **ARS Vet.**, v. 21, p. 69-76, 2005.
- COSTA E.O.; BENITES, N.R.; MELVILLE, P.A.; PARDO, R.B.; RIBEIRO, A.R.; WATANABE, E.T. Estudo etiológico da mastite clínica bovina. **Rev. Bras. Med. Vet.**, v. 17, p. 156-158, 1995.
- CUNHA, M.L.R.S.; SINZATO, Y., SILVEIRA, L.V.A. Comparison of methods for the identification of coagulase-negative Staphylococci. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 99(8): 855-860, 2004.
- CULLOR, J.S. The control, treatment and prevention of the various types bovine mastitis. **Vet. Med.**, p. 571-579, June, 1993.
- DEINHOFER, M., PERNTHANER, A. *Staphylococcus spp.* as mastitis-related pathogens in goat milk. **Vet. Microbiol.**, 43(2-3): 161-166, 1985.

- De PAULIS, A.N., PREDARI S., CHAZARRETA C.D., SANTOIANNI J.E. Five-test simple scheme for species-level identification of clinically significant coagulase-negative staphylococci. **J. Clin. Microbiol.**, 41: 1219-1224, 2003.
- DEVRIESE, L.A. Identification of clumping-factor-negative staphylococci isolated from cows udders. **Res. Vet. Sci.**, 27: 313-320, 1979.
- DEVRIESE, L.A., KEYSER, H. Prevalence of different species of coagulase-negative staphylococci on teats and in milk samples from dairy cows. **J. Dairy Res.**, 47: 155-158, 1980.
- DEVRIESE, L.A., HÁJEK, V., OEDING, P., MEYER, S.A., SCHLEIFER, K.H. *Staphylococcus hyicus* (Sompolinsky, 1953) comb. nov. and *Staphylococcus hyicus* subsp. *chromogenes* subsp. nov. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, 28, p. 482-490, 1978.
- DEVRIESE, L.A., SCHLEIFER, K.H., ADEGOKE. G.O. Identification of coagulase-negative staphylococci from farm animals. **J. Appl. Bacteriol.**, 58: 45-55, 1985.
- DEVRIESE, L.A., SCHLEIFER, K.H., ADEGOKE. G.O. Identification of coagulase-negative staphylococci from farm animals. **J. Appl. Bacteriol.**, 58: 45-55, 1985.
- DiSALVO, J.W. Desoxyribonuclease and coagulase activit of micrococci. **Med. Tech. Bull.** V. 9, 1991-1996, 1958.
- DOERN, G.V. Coagulase-negative staphylococci – clinical significance and laboratory identification. **Lab. Med.**, 15, p. 25-32, 1984.
- DOMINGUES, P.F. Controle da produção leiteira na mastite bovina subclínica. **Dissertação** (Mestrado em Medicina Veterinária). Faculdade de Méd. Vet. E Zootecnia, Botucatu – SP, 1993.
- EBERHART, R.J., HAMON, R.J., JASPER, D.E., NATZKE, R.P., NICKERSON, S.C., RENEAU, J.H., SMIT, K.L. Conceptos actuales de mastitis bovina. **Consejo Nacional de Mastitis**, 1840 Wilson Blvd. Arlington, V.A., 3ª Ed., p. 222-301, 1990.
- EBERHART, R.J., HAMON, R.J., JASPER, D.E., Current concepts in bovine mastitis. 3ª Ed. Arlington, **National Mastitis Council** p. 6-47, 1987.
- ESA-MATTI & PENSONEN, L., PENSONEN, U. Use of inflammatory cell activities in bovine milk to diagnose mastitis. **Am. J. Vet. Res.**, 51: 1527-1533, 1990.
- FERREIRO, L. Ocorrência e etiologia da mastite bovina na “Zona da Mata” do estado de Minas Gerais. **Arq. Esc. Vet. UFMG**, Belo Horizonte, 33(1): 31-37, 1981.

FOOD and Drug Association. Antimicrobial resistance: a growing threat. Disponivel em < [www.fda.gov](http://www.fda.gov) >.

FOX, L.K.; GERSHMAN, M.; HANCOCK, D.D.; HUTTON, C.T. Fomites e reservoirs of *Staphylococcus aureus* causing intramammary infections as determined by phages typing: the effect of milking time hygiene practices. **Cornell Vet.**, 81:183-193, 1991.

FOX, L.K. & ROBERSON, J.R. Heifer mastitis: is it a problem? Proceeding, **Annual Meeting, National Mastitis Council**, 32, p. 187-196, 1993.

FOX, L.K.; GAY, J.M. Contagious Mastitis. In: ANDERSON, K.L. (Ed): The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice. Update on bovine mastitis. **W.B. Saunders Co.**, Philadelphia 9(3): 475-487, 1991.

FRANKLIN, A. Current status of antibiotic resistance in animal production. **Acta Vet. Scand. Suppl.**, v. 92, p. 23-28, 1999.

FREITAS, M.F.L., MOTA R.A., LEÃO A.E.D.S., FIGUEIREDO M.L., FONTE M.M., VIEIRA R.F.C. Sensibilidade antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus spp.* isoladas de carcaças de frango comercializadas em Recife. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.56, n.3, p. 405-407, 2004.

FRENEY, J., BRUN, Y., BES, M., MEUGNIER, H., GRIMONT, F., GRIMONT, P.A.D., NERVI, C., FLEURETTE, J. *Staphylococcus lugdunensis* sp. nov. and *Staphylococcus schleiferi* sp. nov., two species from human clinical specimens. **Int. J. Syst. Bact.** 38(2): 168-172, 1988.

GENTILINI, E., DENAMIEL, G., BETANCOR, A., REBUELTO, M., RODRIGUEZ FERMEPIN, M. and DE TORRES, R.A. Antimicrobial susceptibility of Coagulase-negative Staphylococci isolated from bovine mastitis in Argentina **J. Dairy Sci.** 85: 1913-1917, 2002.

GILMOUR, A., HARVEY, J. Staphylococci in milk and milk products. **Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement**, v. 69, p. 147-166, 1990.

GRIMONT, F., GRIMONT, P.A. Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. **Ann Inst. Pasteurs Microbiol.** 137B(2): 165-175, 1986.

HÁJEK, V. *Staphylococcus intermedius*, a new species isolated from animals. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, 26, p. 401-408, 1976.

HAMMON, R.J. and LANGLOIS, B.E. Mastitis due to coagulase-negative *Staphylococcus* species. **National Mastitis Council Annual Meeting Proceedings**, 56-67, 1995.

HARMON, R.J., CRIST, W.L., HEMKEN, R.W. Prevalence of minor udder pathogens after intramammary dry treatment. **J. Dairy Sci.**, 69, p. 843-849, 1986.

HARMON, R.J., LANGLOIS, B.E. Proceedings of the 34th annual meeting, **National Mastitis Council**, 4<sup>a</sup> Ed., Texas. Arlington, V.A., p. 56, 1995.

HARRY, E.G. (1967) The characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from cases of staphylococcosis in poultry. **Research in Veterinary Science**, 8, 479-489.

HODGES, R.T., JONES, Y.S. & HOLLAND, J.T.S. Characterization of staphylococci associated with clinical and subclinical bovine mastitis. *N. Z. Vet. J.*, 32: 141-145, 1984.

HOGAN, J.S., WHITE, D.G., PANKEY, J.W. Effects of teat dipping on intramammary infections by staphylococci other than *Staphylococcus aureus*. **J. Dairy Res.**, 70: 837-879, 1987.

HOGAN, J.S; SMITH, K.L; TODHUNTER, D.A. Rate of environmental mastitis in quarters infected with *Corynebacterium bovis* and *Staphylococcus* species. **J. Dairy Sci.**, v.71, p. 2520-2525, 1988.

HOLMBERG, O. *Staphylococcus epidermidis* isolated from bovine milk. **Acta Vet. Scand.** 45(Suppl): 203-211, 1973.

HOLMBERG, O. Coagulase-negative staphylococci in bovine mastitis. In: P. A. Mardh and K.H. Schleifer (Editors). Coagulase-negative Staphylococci. **Alquimist & Wiksell International**. Stockholm, Sweden, 203-211, 1985.

HOLT, R.J. The colonization of ventriculo-atrial shunts by cagulase-negative staphylococci, p. 81-87. In M. Finland, W. Marget, and Bartman (ed.), **Bayer-Symposium III. Bactérial infections: changes in their causative agents, trends and possible basis**. Springer-Verlag, Berlin, 1971.

HONKANEM – BUZALSKI, M . LOUHI. Failure mechanisms in lactating therapy of staphylococcal mastitis . **Flem . Vet . J .** 62 , 171-186, 1991.

HUEBNER, J., GOLDMANN, D.A. Cagulase-negative staphylococci: role as pathogens. **Annu Rev. Med.** 50: 223-236, 1999.

IGIMI, S., KAWAMURA, S., TAKAHASHI, E., MITSUOKA, A.T. *Staphylococcus felis*, a new specie from clinical specimens from cats. **Int. J. Syst. Bacterial.**, 39: 373-377, 1989.

IRINO, K., GRIMONT, F., CASIN, I., GRIMONT, P.A. rRNA gene restriction patterns of *Haemophilus influenzae* biogroup aegyptius strains associated with Brazilian purpuric fever. **J. Clin. Microbiol.** 26(8):1535-1538, 1988.

JARP, J. Classification of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine clinical and subclinical mastitis. **Vet. Microbiology**, 27: 151-158, 1991.

JAYARAO, B.M.; GILLESPIE, B.E.; OLIVER, S.P. Amplification of randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting for species identification of bacteria isolated from bovine milk. **J. Food Prot.**, 59(6) 615-620, 1996.

KIRK, J.H.; DEGRAVES, F.; TYLER, J. Recent progress in treatment and control of mastitis in cattle. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.204, p. 1152-1158, 1994.

KLOOS, W.E. Coagulase-negative staphylococci. **Clin. Microbiol. Newsl.**, 4, p. 75-79, 1982.

KLOOS, W.E., and SCHLEIFER, K.H.. Isolation and characterization of staphylococci from human skin. II. Description of four new species: *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus hominis* and *Staphylococcus simulans*. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 25: 62-79, 1975a.

KLOOS, W.E. and SCHLEIFER, K.H. Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus* species. **J. Clin. Microbiol.**, 1, p. 82-88, 1975b.

KLOOS, W.E., BANNERMAN, T.L. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. **Clin. Microbiol. Rev.** 7: 117-140, 1994.

KLOOS, W.E., SCHLEIFER, K.H., Genus IV. *Staphylococcus* Rosenbach 1884, **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 2: 1013-1035, 1986.

KWOK, A.Y.C., CHOW, A.W. Phylogenetic study of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species based on partial *hsp60* gene sequences. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, 53: 87-92, 2003.

KLOOS, W.E. and SCHLEIFER, K.H. The genus *Staphylococcus*. In *The Prokaryotes* ed. Starr, M.P., Stolp, H., Truper, H.G., Ballows, A. and Schlegel, H.G. pp. 1548-1569. Berlin and Heidelberg: Springer Verlag, 1981.

LANGENEGGER, J.; FIGUEIREDO, M.P.; REZENDE, E.F. Eficácia terapêutica de Cefacetile frente aos microrganismos do gênero *Staphylococcus* e *Streptococcus* isolados de mastites subclínicas. **A Hora Veterinária**, v. 30, p. 24-27, 1986.

LANGONI, H.; da SILVA, A.V.; CABRAL, K.G.; DOMINGUES, P.F. Aspectos etiológicos da flora bacteriana aeróbica. **Rev. Bras. Med. Vet.**, v.20, p. 204-209, 1998.



LANGONI, H., PINTO M.P., DOMINGUES P.F. & LISTONI F.J.P. Etiologia e sensibilidade bacteriana da mastite bovina subclínica. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, 43(6): 505-515, 1991.

LANGONI, H., DOMINGUES, P.F., SILVA, A.V., CAUDURO, R.O. Tratamento da mastite bovina com a cefapirina sódica em vacas em plena lactação. **A Hora Veterinária**, ano 19, 112, 37-40, 1999.

LERONDELLE, C. Non-clinical mammary infections of heifers. **Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte**, 37, p. 628, 1985.

LINDE, C. The effect of coagulase-negative in the cow's udder on experimental induction of mastitis and on milk production. **PhD Thesis, Swedish University of Agricultural Science**, Uppsala, Sweden, 1982.

LOEB, L. J. Med. Res., 10: 407, 1903-4. In: ANDERSON, 1976.

MANSEL, R., McKINNON, C.H., COUSINS, C.M., ROUHANI, M.R. Bedding material as a source of bacterial contamination of milk. National Inst. For Res. Dairying, 71-80, 1977.

McDONALD, J.S; ANDERSON, A.J. Antibiotic sensitivity of *Staphylococcus aureus* and coagulase staphylococci isolated from infected bovine mammary glands. **Cornell Vet.**, v. 71, p. 391-396, 1981.

McDERMOTT, P.F; ZHAO, S; WAGNER, D.D. et al. The food safety perspective of antibiotic resistance. **Anim. Biotechnol.**, v. 13, p. 71-84, 2002.

McTAGGART, L.A.; Rigby, R.C., ELLIOTT, T.S. The pathogenesis of urinary tract infections associated with *E. coli*, *Staphylococcus saprophyticus* and *Staphylococcus epidermidis*. **J. Med. Microbiol.** 32: 135-141, 1990.

MEEHAN, P.J.; ATKESON, T.; KEPNER, D.E.; MELTON, M. A foodborne outbreak of gastroenteritis involving two different pathogens. **American Journal of Epidemiology**, v.136, n.5, p.611-616, 1992.

MILLER, D.D.; KEARNS, J.V. Effectiveness of the California Mastitis Test as a measurement of the leucocyte content of quarter samples of milk. **J. Dairy Sci.**, 50(5): 683-686, 1967.

MILLER, G.Y.; BARTLETT, P.C.; LANCE, S.E, et. al. Cost of clinical mastitis and mastitis prevention in dairy herds. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, 220: 1230-1236, 1993.

MIMS, C.A.; PLAYFAIR, J.H.L.; ROIT, I.M.; WAKELIN, D.; WILLIAMS, R. **Microbiologia Médica**. Ed. Manole Ltda, São Paulo, 1995.

Ministério da Agricultura do Abastecimento e da Reforma Agrária. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Defesa Animal. Coordenação Geral de Laboratório Animal, Brasil. **Métodos de Análise Microbiológica para Alimentos** - Revisão 1991/1992.

MORTENSEN, N. Studies in urinary infections. III. Biochemical characteristics of coagulase-negative staphylococci associated with urinary tract infections. **Acta Med. Scand.**, 186, p. 47-51, 1969.

MUCH, H. **Biochem. Z.**, 14:143, 1908. In: ANDERSON, 1976.

MUNCH-PETERSEN, E. Mastitis bovine primiparae. **Vet. Record**, 87: 568-574, 1970.

MYLLIS, V. Staphylococci in heifer mastitis before and after parturition. **J. Dairy Res.**, 62: 51-60, 1995.

MYLLYS, V; ASPLUND, K; BROFELD, E. et al. Bovine mastitis in Finland in 1988 and 1995- Changes in prevalence and antimicrobial resistance. **Acta Vet. Scand.**, v. 39, p. 119-126, 1998.

NADER FILHO, A.; SHOCKEN-ITURRINO, R.P.; ROSSI JUNIOR, O.D. Mastite subclínica em rebanhos produtores de leite gordura 3,2%. **Arq. Bras. Méd. Vet. Zoot.**, Belo Horizonte, v. 36, p. 549-558, 1984.

NADER FILHO, A. ; ROSSI JUNIOR, O.D.; SHOCKEN-ITURRINO, R.P. Prevalencia e Etiologia da Mastite Bovina Na Regiao de Ribeirao Preto/Sp.. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 5, n. 2, p. 53-56, 1985.

NADER FILHO, A; SHOCKEN-ITURRINO, R.P; ROSSI JUNIOR, O.D. Sensibilidade dos *Staphylococcus aureus* isolados em casos de mastite bovina á ação de antibióticos e quimioterápicos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 38, p. 581-588, 1986.

NATIONAL Center for Disease Control and Prevention. Letter to health care providers from Maxine Hayes. Disponível em < [www.cdc.gov](http://www.cdc.gov) >. In: RAPINI *et. al.* (2004).

NAWAZ, M.S. Human health impact and regulatory issues involving antimicrobial resistance en the food animal production environment. Disponível em < [www.fda.gov](http://www.fda.gov) >. In: RAPINI *et. al.* (2004).

NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards, performance standards for antimicrobial susceptibility tests. **Ninth Informational Supplement M**, 19(1): 100-59, 1999.

NEAVE F.K. Diagnosis of mastitis by bacteriological methods alone, in Proceeding: IDF Semin Mastitis Control, 85, p. 19-36, 1975.

NICKERSON, S.C. Preventing new *Staphylococcus aureus* mastitis. **Vet. Med.**, 88, p. 368-374, 1993.

NICKERSON, S.C., OWENS, W.E. BODDIE, R.L. Mastitis in dairy heifers: initial studies on prevalence and control. **J. Dairy Sci.**, 78, p. 1607-1618, 1995.

O'BRIEN, T.F. Emergence, spread and environmental effect of antimicrobial resistance: how use of an antimicrobial anywhere can increase resistance to any antimicrobial anywhere else. **Clin. Infect. Dis. Suppl.**, v. 34, p.S78-S84, 2002.

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

OLIVER, S.P, JAYARO, B.M. Coagulase-negative *Staphylococcus* and prepartum periods. **National Mastitis Council Annual Meeting**, 68-77, 1995.

OLIVER, S.P., LEWIS J.M., GILLESPIE, B.E., DOWLEN, H.H. Influence of Prepartum Antibiotic Therapy on intramammary infections in primigravid heifers during early lactation. **J. Dairy Sci.**, 75: 406-414, 1992.

ORDEN, J.A. *et. al.*, Applicability of an immunoblot technique combined with a semi - automated eletrophoresis systems for detect of staphylococcal enterotoxins in food extrats. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 4083-85, 1992.

OWENS, W.E; RAY, C.H.; WAHSBURN, P.J. effect of selected antibiotics on *Staphylococcus aureus* present in milk from infected mammary glands. **J. Vet. Med. B.** n. 40, p. 508-514, 1993.

OWENS, W.E; RAY, C.H.;WATTS, J.L. Comparision of sucess of antibiotic therapy during lactation and results of antimicrobial susceptility tests for bovine mastitis. **J. Dairy Sci.**, v. 80, p. 313-317, 1997.

PASSOS, M.H.C.R.; KUAYE, A.Y. Avaliação dos surtos de enfermidades transmitidas por alimentos comprovados laboratorialmente no município de Campinas- SP no período de 1987 a 1993. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 56, n. 1, p. 77-82, 1996a.

PASSOS, M.H.C.R.; KUAYE, A.Y. Relato de surtos de intoxicação alimentar provocada por consumo de bolo contaminado por *Staphylococcus aureus* importância da higiene dos manipuladores e condições de conservação do alimento na prevenção da doença. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 56, n. 1, p. 71-76, 1996b.

PEREIRA, M.S.V; SIQUEIRA-JUNIOR, J.P. Antimicrobial drug resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from cattle in Brazil. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 20, p. 391-395, 1995.

PEREIRA, A.T. Coagulase-negative strains of *Staphylococcus* possessing antigen 51 as agents of urinary tract infection. **J. Clin. Pathol.**, 15, p. 252-253, 1962.

PHILPOT, W.N.; NICKERSON, S.C. Mastitis: counter attack. Louisiana Agricultural. Experiment station: **Babson Bros.Co.**, 1991. Cap.01, p. 3-7, 1991.

PITCHER, D.G., OWENS, R.J., DYAL, P. and BECK, A. Synthesis of a biotinylated DNA probe to detect ribosomal RNA cistrons in *Providencia stuartii*. **FEMS Microbiol. Letters**. 48: 283-287, 1987.

POUTREL, B., LERONDELLE, C. Protective effect in the lactating bovine mammary gland induce by coagulase-negative staphylococci against experimental *Staphylococcus aureus* infections. **Ann Rech. Vet.**, 11: 327-332, 1980.

PULVERER, G. and PILLICH, J. Pathogenic significance of coagulase-negative staphylococci, p. 91-96. *In* M. Finland, W. Marget, and K. Bartman (ed.), Bayer – Symposium. III. Bacterial infections: changes in their causative agents, trends and possible basis. Springer – Verlag, Berlin, 1971.

PYÖRÄLÄ, S., PYÖRÄLÄ, E. Efficacy of therapy in clinical mastitis during lactation. **XVII Nordic. Vet. Congress**, Reyjavik, 1994.

PYÖRÄLÄ, S. & SYVÄJÄVI, J. Bovine acute mastitis. Part 1. Clinical aspects and parameters of inflammation in mastitis caused by different pathogens. **J. Vet. Med. B.**, 34: 573-584, 1987.

RADOSTITS, O.M.; BLOOD, D.C.; GAY, C.C. **Veterinary Medicine**. London: Bailliere-Tindall, 173, 1994.

RAJALA-SCHULTZ, P.J; SMITH, K.L; HOGAN, J.S. et al. Antimicrobial susceptibility of mastitis pathogens from first lactation and older cows. **Vet. Microbiol.**, v. 102, p. 33-42, 2004.

RAPINI L.S., TEIXEIRA J.P., MARTINS N.E., CERQUEIRA M.M.O.P., SOUZA M.R., PENNA C.F.A.M. Perfil de resistência antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus sp.*

- Isoladas de queijo tipo coalho. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.56, n.1, p. 130-133, 2004.
- RATHER, P.N., DAVIS, A.P. and WILKINSON, B.J. Slime production by bovine milk *Staphylococcus aureus* and identification of coagulase-negative staphylococcal isolates. **J. Clin. Microbiol.** 23: 858-862, 1986
- RENDOS J.J., EBERHART R.J. & KESLER E.M. Microbial population of teat ends of dairy cows, and bedding materials, J. Pennsylvania Agric. Exper. Statn, p.492-1500, 1975.
- RIEDNER, S., ALBUQUERQUE, A.J.D., BADKE, M.R.T. and WEIBLEN, R. Prevalência de mastite em dois tambos de Santa Maria – RS. **Rev. Cent. de Ciên. Rur.**, Santa Maria, RS, 17(3): 261-273, 1987.
- ROITMAM, I.; TRAVASSOS, L.R.; AZEVEDO, J.L. Tratado de Microbiologia. São Paulo, Manole, v. 1, p. 186, 1988.
- SALMON, S.A; WATTS, J.L; AARESTRUP, F.M. et al. Minimum inhibitory concentrations for selected antimicrobial agents against organisms isolated from the mammary glands of dairy heifers in New Zealand and Denmark. **J. Dairy Sci.**, v. 81, p. 570-578, 1998.
- SARAN, A. Mastitis Bovina: Enfermidades de la ubre y su control en Israel; **Inst. Vet. Kimron**. Israel, 1986. 72p.
- SCHALM, O.W. & NOORLANDER, D.O. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. **JAVMA**, 130(5): 199-207, 1957.
- SCHALM, O.W., CARROLL, E.J., JAIN, N.C. **Bovine mastitis**. Philadelphia: Lea & Febiger, cap. 11. p. 249-282, 1971.
- SCHLEIFER, K.H. and KLOOS, W.E. Isolation and characterization de staphylococci from human skin. I. Amended descriptions of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* and description of three new species: *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus xylosus*. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, 25, p. 50-61, 1975.
- SCHUKKEN, Y.H; VAN DE GEER, D; GROMMERS, F.J et al. Intramammary infections and risk factors for clinical mastitis in herds with low somatic cell counts in bulk milk. **Vet. Rec.**, v. 125, p. 393-396, 1989.
- SEARS, P.M., GONZALEZ, R.N., WILSON, D.J., HAN, H.R. Procedures for mastitis diagnosis and control. **Vet. Clin. of North America: Food Anim. Pract.**, Philadelphia , v. 9, n. 3, p. 445-468, 1993.

SEFTON, A.M. Mechanisms of antimicrobial resistance. Their clinical relevance in the new millennium. **Drugs**, v. 62, p. 557-566, 2002.

SHEAGREN, J. N. *Staphylococcus aureus*: the persistent pathogen. **N. Engl. J. Med.** 310: 1368-1442, 1984.

SILVA, F. F. da. **Zur dominanz bakterieller mastitiserreger in problembetrieben im bereich der landwirtschaftskammer.** Hannover, 1993. Tese (Doutorado) - Hannover, 1993.

SILVA, N. JUNQUEIRA, V.C.A., SILVEIRA, N.F.A. Manual de métodos de análises microbiológicas de alimentos – São Paulo, **Livraria Varela**, 2001.

SMITH, H.W. Antibiotic-resistant bacteria in animal: the danger to human health. **Br. Vet. J.**, v.130, p.110-119, 1974.

SMITH, M.C. & ROGUINSKY, M. Mastitis and other diseases of goats' udder. **J. of the American Vet. and Medical Association**, 171, 1241-1248, 1977.

SMITH, K.L.; TODHUNTER, P.A., SCHONBERGER, P.S. Environmental pathogens and intramammary infection in the dry period. **J. Dairy Sci.**, v. 68, p. 402-404, 1985.

SNYDER, O.P. Jr. An industry safety sell control program. Part. VI. **Dairy Food and Environmental Sanitation**, 12(6), 362-365, 1992.

SOBIRAJ, A., OSTERTAG, H.U. PEIP, D. BOSTEDT, H. and KIELWEIN, G. Clinical and bacteriological findings on the frequency of mastitis in first lactating heifers during and shortly after parturition. **Tierärztliche Praxis**. 16: 243-249, 1988.

SORDILLO, L.M.; SHAFER-WEAVER, K.; DEROSA, D. Symposium: Bovine immunology. Immunobiology of the mammary gland. **J. Dairy Sci.**, v. 80, p. 1851-1865, 1997.

SPERBER, W.H.; TATINI, S.R. Interpretation of the tube coagulase test for identification of *Staphylococcus aureus*. **Applied Microbiology**, 29, (4): 502-505, 1975.

SPERGSE, J., WIESER, M., TÄUBEL, M., ROSSELLÓ-MORA, R.A., ROSENGARTEN, R., BUSSE, H.J. *Staphylococcus nepalensis* sp nov., isolated from goats of the Himalayan region. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 53: 2007-2011, 2003.

SVANBORG, C., GODALY, G. Bacterial virulence in urinary tract infection. **Infect. Dis. Clin. N. Am.** 11:513-529, 1997.

- TAVARES, W. Bactérias Gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.33, 2000.
- TIMMS, L.L., SCHULTZ. L.H. Dynamics and significance of coagulase-negative staphylococcal intramammary infections. **J. Dairy Sci.**, 70: 2648-2657, 1987.
- TOLLERSRUD, T; KENNY, K; REITZ, A.J. et al. Genetic and serologic evaluation of capsule production by bovine mammary isolates of *Staphylococcus aureus* and other *Staphylococcus spp.* from Europe and United States. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 2998-3003, 2000.
- TRINIDAD, P., NICKERSON, S.C., ALLEY, T.K. Prevalence of intramammary infection and teat canal colonization in unbred and primigravid dairy heifers. **J. Dairy Sci.**, 73, p. 107-114.
- TRÜLZSCH, K., RINDER, H., TRÈEK, J., BADER, L., WILHELM, U., HEESEMANN, J. "*Staphylococcus pettenkoferi*", a novel staphylococcal species isolated from clinical specimens. **Diag. Microbiol. Infect. Dis.** 43: 175-182, 2002.
- VALLE, J., GOMEZ-LUCIA, E., PIRIZ, S. *et. al.*, Enterotoxin production by staphylococci isolated from healthy goats. **Appl. Environ. Microbiol.**, 56, p. 1323-1326, 1990.
- WATTS, J.L. Etiological agents of bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, 16, 41-66, 1988.
- WATTS, J.L. & OWENS, W.E. Synergistic hemolysis associated with coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mammary glands. **J. Clin. Microbiol.**, 25: 2037-2039, 1987.
- WATTS, J.L. & OWENS, W.E. Prevalence of staphylococcal species in four dairy herds. **Res. Vet. Sci.**, 46: 1-4, 1989.
- WATTS, J.L; YANCEY Jr, R.J. Identification of veterinary pathogens by use of commercial identification systems and new trends in antimicrobial susceptibility testing of veterinary pathogens. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 7, p. 346-356, 1994.
- WHITE, D.G., HARMON, R.J., MATOS, J.E.S. and LANGLOIS, B.E. Isolation and identification of coagulase-negative staphylococcus species from bovine body sites and streak canals of nulliparous heifers. **J. Dairy Sci.** 72: 1886-1892, 1989.
- WILLIAMS, M.D., WILKINS, S.T. BERGEY'S. **Manual of Determinative Bacteriology.**, 9<sup>a</sup> Ed., Baltimore, p. 787, 1994.

WILSON, I.G.; COOPER, J.E.; GILMOUR, A. Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in dried skimmed milk: use of the polymerase chain reaction for amplification and detection of Staphylococcal enterotoxin genes *entB* and *entCI* and thermonuclease gene *nuc*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 6, p. 1793-1798, 1991.

WILSON, D.J.; GONZALEZ, R.N.; CASE, K.L.; GARRISON, L.L.; GROHN, A.Y.T. Comparison of seven antibiotic treatments with no treatment for bacteriological efficacy against bovine mastitis pathogens. *J. Dairy Sci*, 82, 1664-1670, 1999.

WITTE, W. Ecological impact of antibiotic use in animals on different complex microflora: environment. **Int. J. Antimicrobiol. Agents**, 14: 321-325, 2000.

YOGEV, D.; HALACHMI, D., KENNY, G.E. & RAZIN, S. Distinction of species and strains of mycoplasmas (Mollicutes) by genomic DNA fingerprints with an rRNA probe. **J. Clin. Microbiol.** 26: 1198–1201, 1988.



## SUMMARY

### **ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY OF COAGULASE-NEGATIVE *STAPHYLOCOCCI* ISOLATED FROM BOVINE MASTITIC CATTLE PROCEEDING FROM MILK OF NINE BRAZILIANS STATES**

A total of 109 strains of coagulase-negative *Staphylococci* were isolated from bovine clinical and subclinical mastitic cattle in 35 dairy farms, in 9 states of Brazil from february to may 2005, and investigated for in vitro susceptibility to several antimicrobial agents. Among the isolates, resistance to penicillin was most frequent (93.5%), followed by resistance to sulphonamide (88.9%), novobiocin (88.6%) and ampicillin (85.3%). All isolates exhibited resistance to at least 1 of the antimicrobial drugs tested. Multidrug resistant isolates were quite common, 10.0% of the isolates showing resistance to all antimicrobial drugs tested. This indicates that coagulase-negative *Staphylococci* in Brazil exhibit a high degree of antimicrobial agents' resistance, probably as a consequence of the pressure of the intensive use of antimicrobial drugs, a practice that constitute a public health concern.