

Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho” – UNESP
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS ARAÇATUBA

BEATRIZ PINHEIRO AMATO

**Sensibilidade antimicrobiana de patógenos causadores
de mastite em vacas na região Centro-Oeste Paulista**

**Araçatuba
2023**

BEATRIZ PINHEIRO AMATO

**Sensibilidade antimicrobiana de patógenos causadores
de mastite em vacas na região Centro-Oeste Paulista**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – Unesp, Câmpus de Araçatuba, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal).

Orientadora: Profa. Associada Elisa Helena Giglio Ponsano

Coorientador: Prof. Dr. Thiago Luís Magnani Grassi

**Araçatuba
2023**

A488s Amato, Beatriz Pinheiro
Sensibilidade antimicrobiana de patógenos causadores de mastite em vacas na região Centro-Oeste Paulista / Beatriz Pinheiro Amato. -- Araçatuba, 2023
58 f. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba
Orientadora: Elisa Helena Giglio Ponsano
Coorientador: Thiago Luís Magnani Grassi

1. Mastite. 2. Bactérias. 3. Antibióticos. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título:

Sensibilidade antimicrobiana de patógenos causadores de mastite em vacas na região Centro-
Oeste Paulista

AUTORA: BEATRIZ PINHEIRO AMATO

ORIENTADORA: ELISA HELENA GIGLIO PONSANO

COORIENTADOR: THIAGO LUÍS MAGNANI GRASSI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciência Animal,
área: Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal pela Comissão Examinadora:

Profa. Associada ELISA HELENA GIGLIO PONSANO (Participação Presencial)
Departamento de Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de
Araçatuba/UNESP

Prof. Associado FRANCISCO LEYDSON FORMIGA FEITOSA (Participação Presencial)
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de
Araçatuba/UNESP

Profa. Dra. APARECIDA DE FÁTIMA MICHELIN (Participação Presencial)
Universidade Paulista – Câmpus de Araçatuba

Araçatuba, 24 de agosto de 2023.

Dedico essa dissertação a Deus, responsável por me dar a força necessária para alcançar meus objetivos e aos meus pais que tanto me apoiaram durante esse processo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, por ter colocado forças em meu coração para que pudesse vencer mais esta etapa de minha vida e por ter iluminado meu caminho nesta trajetória.

Aos meus pais, Telma e Laercio, em especial, por terem me incentivado e acreditado que eu seria capaz de completar essa jornada. Agradeço todo o esforço que tiveram para que eu chegasse até aqui.

À minha orientadora, Prof^ª. Dra. Elisa Helena Giglio Ponsano, por toda dedicação, paciência e confiança depositada em mim durante esses anos, pessoa cujas contribuições foram essenciais ao desenvolvimento de meu caminho acadêmico.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Thiago Luis Magnani Grassi, pelas palavras de incentivo e pela confiança sempre depositada em mim. Obrigada por me manter motivada durante todo o processo.

Agradeço aos técnicos que fizeram com que meus dias de análises fossem mais leves e por terem me ensinado tanto. Vocês foram essenciais para que eu conquistasse meu objetivo.

Ao meu noivo, Flávio, por ter estado ao meu lado em todos os momentos que precisei e por ter se desdobrado em esforços para que eu atingisse meus objetivos.

Deixo, também, um agradecimento especial à Universidade Estadual Paulista – UNESP/FMVA, por ter me recebido e acolhido durante esses anos e pela oportunidade de concluir essa pós-graduação.

Agradeço, por fim, a Universidade Paulista – UNIP, câmpus Bauru, por ter disponibilizado a estrutura e ferramentas para realização desse trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

**“EM ALGUM LUGAR, ALGUMA COISA INCRÍVEL ESTÁ ESPERANDO PARA
SER DESCOBERTA.”**

CARL SAGAN

AMATO, B. P. **Sensibilidade antimicrobiana de patógenos causadores de mastite em vacas na região Centro-Oeste Paulista**. 2023. 58 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

RESUMO

A mastite gera prejuízos econômicos em rebanho leiteiros e interfere nos processos industriais de laticínios. O uso indiscriminado de antibióticos para tratar a doença agrava a resistência a tais medicamentos, sendo imprescindível a identificação do agente causador para o sucesso do tratamento. O objetivo do presente estudo foi isolar bactérias causadoras de mastite bovina em amostras de leite obtidas em propriedades leiteiras localizadas no Centro-Oeste Paulista e avaliar sua resistência frente aos antimicrobianos comumente utilizados em seu tratamento. Analisaram-se amostras de leite de 80 vacas com mastite clínica ou subclínica. As amostras foram inoculadas em Ágar Sangue e Ágar MacConkey e incubadas a 37 °C/24 h. As colônias isoladas passaram por identificação morfo-tintorial (coloração de Gram) e bioquímica. Para a determinação da espécie, as amostras de leite também foram analisadas por espectrometria de massa (MALDI-TOF MS). Os microrganismos identificados foram submetidos ao teste de sensibilidade aos antimicrobianos em placa de Ágar Müller-Hinton (35 °C/24 h) com discos contendo Gentamicina (10 µg), Amoxicilina + Clavulanato (20 µg + 10 µg), Tetraciclina (30 µg) e Oxacilina (1 µg). Em 87,5% das amostras houve crescimento de bactérias Gram-positivas, com prevalência de *Staphylococcus aureus* (54,3%) e 21,2% das amostras apresentaram colônias de bactérias Gram-negativas, com o predomínio de *Escherichia coli* (18,6%). A resistência para oxacilina ocorreu em 48,6% das bactérias Gram-positivas e em 100% das bactérias Gram-negativas isoladas e, para tetraciclina, a resistência foi de 12,8% e 29,4% respectivamente. Dentre as bactérias Gram-positivas, 11,4% apresentaram resistência para gentamicina e amoxicilina e clavulanato. As bactérias Gram-negativas apresentaram 5,9% de resistência para amoxicilina e clavulanato e nenhuma resistência frente à gentamicina. Concluiu-se que houve alta incidência de bactérias Gram-positivas causadoras de mastite na região e alta incidência de resistência a oxacilina entre os microrganismos isolados.

Palavras-chave: Mastite. Bactérias. Antibióticos.

AMATO, B. P. **Antimicrobial susceptibility of mastitis pathogens in cows in the Midwest region of São Paulo**. 2023. 58 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

ABSTRACT

Mastitis causes economic losses in dairy herds and interferes in the industrial processes of dairy products. The indiscriminate use of antibiotics for its treatment leads to the worsening of resistance to these drugs, making the correct identification of the causative agent essential for the success of the treatment. The aim of the present study was to characterize the bacteria that cause bovine mastitis in milk samples obtained from dairy farms located in the Midwest of São Paulo and to assess whether there is resistance to the antimicrobials commonly used in the treatment of the disease. Milk samples from 80 cows with clinical or subclinical mastitis were analyzed. The samples were inoculated onto Blood Agar and MacConkey Agar and incubated at 37 °C/24 h. The colonies were identified by morpho-tinctorial identification (Gram staining) and biochemical tests. To determine the species level, the samples were also analyzed by mass spectrometry technique (MALDI-TOF MS). Subsequently, their antimicrobial susceptibility was tested on a Müeller-Hinton Agar plate (35 °C/24 h) with discs containing the antimicrobials Gentamicin (10 µg), Amoxicillin + Clavulanate (20 µg + 10 µg), Tetracycline (30 µg) and Oxacillin (1 µg). 87.5% of the samples had the growth of Gram-positive bacteria, with prevalence of *Staphylococcus aureus* (54.3%) and 21.2% of the samples showed colonies of Gram-negative bacteria, with predominance of *Escherichia coli* (18.6%). Resistance to oxacillin had an incidence of 48.6% for Gram-positive and 100% for Gram-negative and 12.8% and 29.4% for tetracyclines, respectively. Gram-positive bacteria showed 11.4% of resistance for gentamicin and for amoxacillin and clavulanate. Gram-negative bacterium showed 11.4% of resistance for amoxacillin and clavulanate and no resistance for gentamicin. It was concluded that there was a high incidence of Gram-positive bacteria causing mastitis in the region and a high incidence of resistance of the isolates to oxacillin.

Keywords: Mastitis. Bacteria. Antibiotics.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1	Cenário nacional da produção de leite	12
2.2	Mastite	13
2.3	Impactos decorrentes da mastite	16
2.4	Identificação microbiana	18
2.5	Resistência antimicrobiana	20
3	OBJETIVO	23
4	MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1	Amostragem	24
4.2	Isolamento e identificação dos microrganismos por técnicas microbiológicas tradicionais	25
4.3	Identificação microbiana por espectrometria de massa (MALDI-TOF MS)	27
4.3.1	Cultivo microbiológico	27
4.3.2	Extração de proteínas ribossomais dos isolados	27
4.3.3	Obtenção dos espectros de massa	28
4.4	Antibiograma dos microrganismos isolados por técnicas microbiológicas tradicionais	28
4.5	Análise de dados	30
5	RESULTADOS	31
5.1	Agente etiológicos isolados das amostras de leite de vacas portadoras de mastite	31
5.2	Formas clínicas e agentes etiológicos identificados	32
5.3	Sensibilidade antimicrobiana dos agentes etiológicos isolados pelas técnicas microbiológicas tradicionais	33
6	DISCUSSÃO	35
6.1	Bactérias Gram-positivas	35
6.2	Bactérias Gram-negativas	38
6.3	Resistência Antimicrobiana	38
7	CONCLUSÃO	42
	REFERÊNCIAS	43
	ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA	58

1 INTRODUÇÃO

A produção leiteira é uma atividade de grande importância econômica, sendo responsável pela geração de renda e de emprego para muitas pessoas (COBIRKA; TANCIN; SLAMA, 2020). Também apresenta importância para a segurança alimentar por resultar na geração de um alimento altamente nutritivo, composto por proteínas, gordura, vitaminas e minerais, estando dentre os alimentos essenciais para a nutrição da população mundial (ROCHA; CARVALHO; RESENDE, 2020).

Por esses motivos, há crescente demanda para aumentar a produtividade nas propriedades leiteiras e a qualidade do produto. Entretanto, vários fatores podem influenciar na obtenção de leite de qualidade, tais como nutrição e sanidade do rebanho (COBIRKA; TANCIN; SLAMA, 2020).

A mastite é uma das principais enfermidades que afetam o gado leiteiro, causando perda na produção e na qualidade do leite, aumento de custos com tratamentos e probabilidade de descarte de vacas leiteiras com infecções crônicas (JAMALI et al., 2018; TOMAZI et al., 2018). Definida como inflamação da glândula mamária, a mastite é uma afecção complexa e de caráter multifatorial, que acarreta alterações físicas e químicas no leite, podendo ocasionar diminuição de 10% a 20% na produção (KUMARI; BHAKAT; CHOUDHARY, 2018; LANGONI et al., 2017).

Os antimicrobianos são amplamente utilizados para o tratamento dessa enfermidade. Entretanto, o uso indiscriminado desses medicamentos pode contribuir para redução da eficácia do princípio ativo e o surgimento de resistência antimicrobiana, diminuindo a capacidade do antibiótico em controlar doenças tanto na medicina veterinária quanto humana (GONÇALVES et. al., 2022b; TOMAZI; SANTOS, 2020).

Além de estratégias de prevenção como boas práticas agropecuárias e de bem-estar animal, é imprescindível que seja realizado o diagnóstico preciso dos agentes causadores de mastite no rebanho, associado a testes de sensibilidade antimicrobiana, para a elaboração de métodos eficazes de controle da mastite (MONISTERO et al., 2020).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cenário nacional da produção de leite

Segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO, 2019), o Brasil é o terceiro maior produtor de leite do mundo, após os Estados Unidos e a Índia (ROCHA; CARVALHO; RESENDE, 2020). No primeiro trimestre de 2023, o país produziu 5.883.069 mil litros de leite cru. O consumo de leite também é elevado no país, na medida em que, em 2022, foram consumidos aproximadamente 116,7 litros de leite fluído por habitante (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA, 2023; INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2023).

O Estado de Minas Gerais é o maior produtor nacional, tendo produzido 1.433.166 mil litros no primeiro trimestre de 2023, seguido pelo Paraná com 833.177 mil litros, Rio Grande do Sul com 742.114 mil litros, Santa Catarina com 726.0143 mil litros e Goiás com 533.725 mil litros, enquanto o Estado de São Paulo produziu 508.204 mil litros, conforme apresentado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2023).

A produção se distribui por quase todo o território nacional, com destaque para as regiões Sudeste, Centro-Oeste e Sul. Devido aos diferentes climas, características socioeconômicas e culturais presentes no país, a produção apresenta expressiva heterogeneidade, com mão de obra familiar ou patronal, sistemas de produção intensivo, semi-intensivo ou extensivo, com ordenhas manuais ou mecanizadas e utilização de raças taurinas ou zebuínas, apresentando um predomínio de animais mestiços (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA, 2023; MORAIS, 2021).

A produtividade das vacas também apresenta grande variação dependendo da região do país, devido a qualidade de pastagem, suplementação alimentar, raças e técnicas de produção aplicadas. Em 2021, por exemplo, cada vaca produziu em média 10,8 litros por dia na região Sul do país, enquanto no Norte as vacas produziram 1,7 litros por dia (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE – USDA, 2022).

A necessidade de investimentos para automação e melhoria na eficiência produtiva é crescente no país, visto que pequenas e médias propriedades leiteiras apresentam maiores dificuldades de expansão e manutenção da atividade devido a oscilação do custo de alimentação, combustível ou óleo diesel, fertilizantes e do preço do leite, enquanto as maiores propriedades estão crescendo cada vez mais e acompanhando o processo de tecnificação da produção de leite (BRASIL, 2023).

Apesar da grande produção de leite no país, a manutenção da qualidade microbiológica do leite cru é um grande obstáculo enfrentado pela indústria de laticínios, acarretando inúmeros prejuízos ao setor, visto que há influência no rendimento de derivados lácteos, na qualidade e no tempo de prateleira (LANGE et al., 2017). Esse mesmo fator também afeta a exportação de leite, que não apresenta valores significativos no mercado global. A exportação e importação de leite fluído no Brasil são pouco expressivas, devido a logística de distribuição de leite *in natura* e aos valores do produto, quando comparado ao de países externos (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE – USDA, 2022).

Dentre os principais produtos exportados, 21% são compostos por queijos simples, como mussarela, que atingiram a marca de 4,6 toneladas no ano de 2021, para países como Chile, Rússia e Estados Unidos. Nos cinco últimos anos, o Brasil exportou em média 8 mil toneladas de creme de leite por ano e, no ano de 2018, exportou 6,3 mil toneladas de leite *in natura* (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE – USDA, 2022).

Em relação à importação, a Argentina e Uruguai são os principais responsáveis por esse comércio, sendo o leite em pó o principal produto comprado, visto que costuma ter preços menores no exterior e ser um item prático e versátil. Queijos, leite em pó desnatado, proteína de soro de leite e manteiga também são produtos frequentemente importados (MENDES, 2022; UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE – USDA, 2022).

2.2 Mastite

A mastite é uma afecção complexa e multifatorial, caracterizada pela inflamação do parênquima da glândula mamária e dependente de interação entre hospedeiro, meio ambiente e agente etiológico (KALINSKA et al., 2018).

A infecção intramamária, processo que ocorre na patogênese da doença, é iniciada pela invasão de patógenos na glândula mamária por meio do canal do teto que, ao adentrarem a região, multiplicam-se no interior dos tecidos. Como consequência, células de defesa tais como os leucócitos migram para a glândula mamária com o objetivo de eliminar os agentes infecciosos, levando a alteração da permeabilidade vascular e processos inflamatórios (SANTOS; FONSECA, 2007). Tal processo leva a o aumento de células somáticas (CS) na região, constituído por células de defesa e células epiteliais (MURPHY et al., 2016).

Existe ampla gama de agentes etiológicos responsáveis por gerar infecção intramamária, tais como bactérias Gram-positivas e negativas, algas microscópicas e fungos (KALINSKA et al., 2018; REYES et al., 2015). A invasão dos patógenos para o interior da glândula mamária pode ocorrer por diversos fatores, sendo que múltiplos aspectos estão relacionados ao hospedeiro, tais como a idade da vaca, nível de produção e o período de lactação (GONÇALVES et al., 2022a).

Vacas mais velhas são mais susceptíveis à enfermidade devido ao relaxamento natural de esfíncteres dos tetos, possibilitando a entrada de microrganismos e a infecção intramamária. Além disso, o maior espaçamento entre as ordenhas que ocorre no período final da lactação possibilita a presença de leite residual, utilizado como substrato para crescimento e multiplicação de microrganismos (LANGONI, 2013).

O ambiente em que os animais estão inseridos também é um fator importante para a enfermidade, sendo responsável por 90% dos casos de mastite. Instalações inadequadas e mal higienizadas, ambientes superpopulosos, alta umidade e camas sujas aumentam o estresse no animal e a pressão de patógenos nas vacas (KALISKA et al., 2018). Além disso, o tipo e as características de ordenha devem ser considerados, uma vez que a falta de manutenção dos equipamentos de ordenha pode acarretar traumas como prolapso de esfíncter dos tetos devido ao excesso de vácuo na ponta do conjunto de teteiras, facilitando a invasão de patógenos (LANGE et al., 2017).

A infecção intramamária pode ser categorizada em formas clínica e subclínica de acordo com a forma como se apresenta. Na forma clínica, as vacas acometidas apresentam sinais clínicos sistêmicos como febre, anorexia e letargia,

ou locais (úbere), tais como edema, aumento de temperatura e dor. Além da composição anormal, o leite produzido pode conter sangue, pus ou coágulos (GOULART; MELLATA, 2022). Nesse caso, os sinais clínicos percebidos com a realização de exame físico e palpação do animal, juntamente com as alterações macroscópicas do leite apresentadas no teste de caneca de fundo escuro realizado no início da ordenha permitem o diagnóstico (MAIOCHI; RODRIGUES; WOSIACKI, 2019).

A mastite clínica pode ser classificada nas formas catarral, apostematosa e flegmonosa. A forma catarral é caracterizada por um processo inflamatório superficial, que não atinge estruturas secretoras, porém pode ocorrer o aparecimento de pequenos grumos no leite. A apostematosa é um processo inflamatório mais profundo, com acometimento de todas as estruturas glandulares. A forma flegmonosa é considerada um processo inflamatório mais grave, podendo evoluir para gangrena e comprometimento do estado geral do animal (LEITE, 2016).

Na mastite subclínica, considerada a principal forma presente nas propriedades, acometendo entre 20 e 83% das vacas em lactação (KUMARI; BHAKAT; CHOUDHARY, 2018), inexistem alterações macroscópicas no leite ou no úbere, ocorrendo apenas alterações na composição, como o aumento de células somáticas, devido à mobilização de células inflamatórias para a glândula mamária (DALANEZI et al., 2020). Nesse caso, o diagnóstico é feito por métodos indiretos como a contagem de células somáticas (CCS) e o *California Mastitis Test* (CMT) (MARTINS et al., 2016).

A mastite também pode ser classificada em contagiosa ou ambiental, com base na forma de contaminação e na origem do agente infeccioso (ROWBOTHAM; RUEGG, 2016). A mastite contagiosa ocorre quando, durante a ordenha, há exposição de tetos saudáveis a bactérias provenientes de tetos infectados de outras vacas, por meio das mãos dos ordenhadores, de equipamentos de ordenha e outros fômites de uso comum entre os animais. As principais bactérias causadoras dessa forma de infecção são *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium bovis*, *Staphylococcus aureus* e *Mycoplasma* spp. (OLIVEIRA et al., 2011; ROWBOTHAM; RUEGG, 2016).

Na mastite ambiental, a contaminação ocorre, principalmente, após a ordenha, por meio da exposição de tetos saudáveis a um ambiente contaminado, como a sala de ordenha ou a cama utilizada pelos animais (OLIVEIRA et al., 2011). Essa é a forma mais difícil de controle, visto que as vacas permanecem de 40 a 65% de seu tempo em decúbito (ROWBOTHAM; RUEGG, 2016). Dentre os microrganismos responsáveis pela mastite ambiental estão *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* (OLIVEIRA et al., 2011; ROWBOTHAM; RUEGG, 2016).

Os microrganismos causadores de mastite também podem apresentar classificações, sendo elas como patógenos principais ou primários e patógenos secundários. São considerados patógenos principais aqueles que apresentam maiores fatores de virulência e maior impacto para a saúde do animal e a qualidade do leite, por exemplo, *Staphylococcus aureus*. Os patógenos secundários são considerados parte da microbiota do úbere, apontados como de menor virulência e menor efeito nos parâmetros de monitoramento da qualidade do leite como a CCS, por exemplo, os estafilococos coagulase-negativos (LANGONI et al., 2015).

Staphylococcus aureus, estafilococos coagulase-negativos (SNC), *Streptococcus* spp., *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp. são os principais causadores de mastite contagiosa e ambiental em todos os continentes, como demonstrado em estudos feitos na Europa, China, Egito, Austrália e EUA (AMEEN et al., 2019; DYSON et al., 2022; JONG, et al., 2018; LINDEMAN et al., 2013).

2.3 Impactos decorrentes da mastite

A mastite é uma enfermidade que gera grandes prejuízos ao produtor. Tal fato ocorre em razão dos gastos com medicamentos e assistência veterinária (8%), descarte de leite devido ao período de carência e descarte prematuro de animais que apresentam a forma crônica da enfermidade (14%) e redução na produção leiteira (78%), além de alteração nas taxas de reprodução e redução no valor pago pela qualidade do produto (DALANEZI et al., 2020; ROMERO; BENAVIDES; MEZA, 2018).

A doença afeta, diretamente, a lucratividade das fazendas leiteiras, visto que a mastite clínica pode gerar um impacto econômico de R\$ 0,1090 a R\$

0,5985/kg/leite, considerando médias anuais de 1% e 15% de mastite clínica no rebanho, respectivamente (MASSOTE et al., 2019). Além disso, estudos relatam perdas de 2 a 3 kg de leite por dia para cada 100.000 células somáticas por litro (GONÇALVES et al., 2021).

A composição nutricional do leite também é afetada por essa doença, visto que os quartos mamários cronicamente infectados podem apresentar maiores concentrações de proteína total devido ao aumento de proteínas do soro, como imunoglobulinas, apesar de apresentar redução de α - e β -caseínas. Além disso, há aumento de concentração de sódio e cloro e menores concentrações de lactose e gordura (ALHUSSIEN; DANG, 2018; GONÇALVES et al., 2020; MELLO et al., 2012).

Isso ocorre devido ao influxo de proteínas do soro do sangue, sódio e cloro para o leite e ao efluxo de lactose na circulação por vias paracelulares que são proliferadas durante a mastite, à diminuição da produção por danos de células alveolares e ao consumo desse componente pelos microrganismos. O aumento da concentração de íons sódio, cloro e bicarbonato no leite ocorre como tentativa de manter o equilíbrio osmótico que era mantido pela lactose. Também ocorre aumento da atividade de enzimas lipolíticas, gerando danos à membrana dos glóbulos de gordura do leite, expondo-os à ação de lipoproteínas lipases presentes no leite, e elevando os níveis de ácidos graxos livres no produto (ALHUSSIEN; DANG, 2018; ALI et al., 2022; GONÇALVES et al., 2020). Tais alterações interferem nos aspectos sensoriais e tecnológicos dos produtos derivados, como interferência na coagulação, composição química, textura, sabor e rendimento final (MELLO et al., 2012; MORADI et al., 2021).

Essas alterações na composição química do leite com altas contagens de células somáticas resultam em pH mais alcalino, o que afeta a coagulação devido ao tempo maior para a produção de ácido, com abaixamento do pH. Ademais, altos teores de leucócitos com capacidade antimicrobiana podem influenciar o crescimento de culturas iniciadoras, aumentando o tempo de coagulação, devido ao atraso na redução do pH (MORADI et al., 2021).

Níveis altos de células somáticas estão associados ao aumento da ativação de plasminogênio em plasminas. As plasminas são enzimas proteolíticas termorresistentes que hidrolisam a caseína que seria utilizada no processo de

coagulação para fabricação de queijos, por exemplo, aumentando o tempo de coagulação e influenciando no rendimento e na textura. Outras enzimas como elastase e catepsinas também podem gerar alterações na coagulação e maturação dos queijos, respectivamente. Já os altos níveis de ácido graxos livres apresentam influência no sabor (MURPHY et al., 2016).

A enfermidade apresenta, ainda, aspectos importantes de Saúde Pública, visto que diversos microrganismos presentes no leite oriundos de casos de mastites podem ocasionar doenças de origem alimentar (SALINA et al., 2017). Outro fator importante é o consumo de leite com presença de resíduos de antimicrobianos, devido ao não obedecimento do período de carência do fármaco e eliminação incompleta do antibiótico do organismo do animal (BAHRAMIAN et al., 2022).

Tais resíduos, quando acima dos limites permitidos, podem acarretar efeitos maléficos à saúde do consumidor como influência na microbiota intestinal, efeito tóxico, resistência aos antimicrobianos, reações alérgicas devido a hipersensibilidade a penicilina, aminoglicosídeos e tetraciclina, mutagenicidade, hepatotoxicidade e efeitos imunopatológicos e carcinogênicos, devido à exposição prolongada a baixos níveis de oxitetraciclina, por exemplo (BACANLI; BASARAN, 2019; BAHRAMIAN et al., 2022).

2.4 Identificação microbiana

Diversos métodos de identificação microbiana estão disponíveis atualmente, como aqueles de identificações rápidas realizadas por meio da determinação de atividades enzimáticas ou por biologia molecular, até identificações tradicionais, que demandam mais tempo, como a cultura microbiológica (BARREIRO et al., 2017).

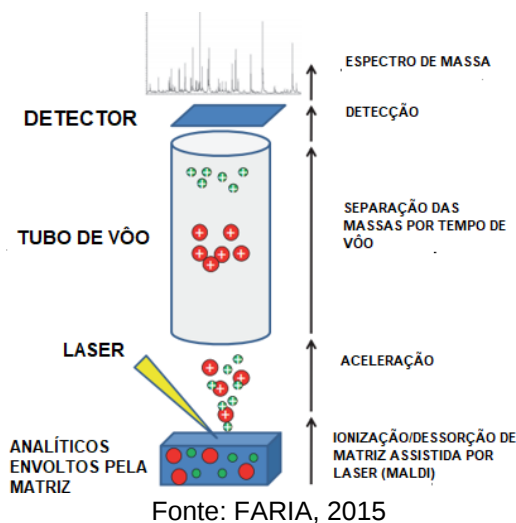
O cultivo tradicional de microrganismos é baseado no plaqueamento, incubação e crescimento de colônias em meios de cultura específicos, sendo que, para identificações em nível de espécie, é necessário realizar testes bioquímicos específicos, avaliar as condições de crescimento, morfologia e suscetibilidade a antibióticos, levando em média de 2 a 7 dias para confirmação dos resultados e diagnóstico do patógeno causador da infecção (BARCELOS et al., 2019; BARREIRO et al., 2018).

Dentre as técnicas de biologia molecular, encontra-se a espectrometria de massa (MS), que utiliza fonte de dessorção/ionização a laser assistida por matriz (MALDI) e um analisador de massa do tipo time-of-flight (TOF), comumente denominado MALDI-TOF MS. Essa metodologia se baseia na proteômica e é capaz de realizar a rápida identificação da bactéria causadora de mastite a partir de proteínas ribossômicas extraídas das colônias bacterianas (BARREIRO et al., 2018).

O MALDI-TOF MS tem sido amplamente utilizado para a identificação de microrganismos em nível de espécie, haja vista que é uma técnica aplicável, confiável, rápida e de alta precisão (BRAGA et al., 2018). É também utilizada como ferramenta para confirmar resultados discordantes que podem ocorrer no cultivo microbiano quando se trabalha com espécies bacterianas com perfis espectrais muito semelhantes (BARCELOS et al., 2019).

A técnica consiste na separação de íons de acordo com a relação massa/carga. Simplificadamente, conforme esquematizado na Figura 1, nesta técnica, os analitos (verdes) são envolvidos pela matriz (vermelho), que absorve a energia gerada pelo laser, ocasionando a dessorção térmica das proteínas ribossômicas das bactérias isoladas (evaporação e formação de íons com massas diferentes). Os íons formados são acelerados pelo campo elétrico de carga positiva (presente na extremidade do detector) para dentro do tubo de vôo de acordo com sua massa e carga elétrica. Os tempos de vôo das partículas dessorvidas até o detector apresentam diferenças mensuráveis e são utilizados para calcular a massa exata da amostras no espectro de massa (FARIA, 2015). Por fim, o perfil do espectro de proteínas é identificado comparando-se os resultados com bancos de dados de referência (BARCELOS et al., 2019).

Figura 1 – Esquema da técnica MALDI-TOF MS



2.5 Resistência antimicrobiana

Compreender o perfil microbiológico do rebanho é de extrema importância para o manejo da mastite, visto que permite determinar protocolos estratégicos de tratamento e prevenção mais assertivos, focando nos possíveis reservatórios de infecção, além de reduzir gastos desnecessários (DYSON et al., 2022). Associado à identificação microbiana, é imprescindível a avaliação da sensibilidade antimicrobiana, especialmente em relação aos antimicrobianos criticamente importantes, ou seja, aqueles utilizados para tratamento de doenças fatais aos humanos, como os aminoglicosídeos (NOBREGA; BUCK; BARKEMA, 2018).

O uso de antimicrobianos nas propriedades rurais é a principal estratégia para o tratamento de mastites clínicas e subclínicas. Dentre os grupos utilizados com maior frequência na pecuária leiteira, encontram-se as tetraciclinas, antibióticos bacteriostáticos de amplo espectro, que inibem a síntese proteica do microrganismo; os beta-lactâmicos, que apresenta ação bactericida por meio da inibição da formação da parede celular bacteriana; e os aminoglicosídeos, cuja ação bactericida ocorre pela produção de proteínas defeituosas ou pela inibição da síntese proteica bacteriana (SILVA, 2018).

Tais medicamentos são utilizados para prevenir o agravamento da doença e o acometimento sistêmico com bacteremia e auxiliar no rápido retorno do animal à produção de leite comercializável (TOMAZI; SANTOS, 2020). Entretanto,

em sua maioria, o tratamento é realizado de forma empírica e inadequada, sem atender à frequência ou à duração da exposição bacteriana ao medicamento, o que contribui para o desenvolvimento de resistência antimicrobiana (RAM) e, até mesmo, à presença de resíduos de antibiótico no leite (MARTINS et al., 2021; NOBREGA; BUCK; BARKEMA, 2018).

A RAM é a capacidade dos microrganismos resistirem ao efeito de antimicrobianos (RAHMEH et al., 2020). Existe uma grande preocupação por parte da Organização Mundial da Saúde (OMS) pelo tema, que considera a resistência frente aos antimicrobianos uma ameaça urgente à saúde e a associa ao uso exacerbado de antibióticos (JONG et al., 2018).

A RAM é uma pauta que vem adquirindo cada vez mais ênfase nas agendas nacionais e internacionais, visto que, anualmente, cerca de 700.000 seres humanos morrem de infecções causadas por bactérias multirresistentes. Estima-se que, em 2050, cerca de 10 milhões de pessoas morrerão de infecções bacterianas causadas por bactérias que apresentam RAM (NOBREGA; BUCK; BARKEMA, 2018).

Pensando nisso, diretrizes sobre o uso de antimicrobianos já foram abordados pela OMS, que apresentou um Plano de Ação Global sobre Resistência Antimicrobiana para o monitoramento de resistências dos microrganismos (JONG et al., 2018), assim como a Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos da América (FDA), em 2002 (LINDEMAN et al., 2013). Na mesma linha, a Comissão Europeia apresentou um Plano de Ação da Comunidade Europeia, visando o monitoramento da resistência antimicrobiana, principalmente na medicina veterinária. Ademais, a Agência Europeia de Medicamentos estabeleceu ações para o uso responsável de antibióticos em animais entre os anos de 2016 e 2020 (JONG et al., 2018).

Assim também ocorreu no Egito com o Plano de Ação Nacional para Resistência Antimicrobiana (2018 – 2022) (WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2018) e na Austrália, com a Estratégia Nacional de Resistência Antimicrobiana (2015 – 2019) e diretrizes definidas por indústrias de laticínios do país (DYSON et al., 2022). Em 2010, a China era responsável pela maior parcela (23%) de uso mundial de antimicrobianos no setor de alimentação animal, apresentando projeção para utilização de 30% até o ano de 2030 (CHENG et al.,

2019). Atualmente, o país estabeleceu o Plano de Ação Nacional para Combater a Resistência Antimicrobiana (2022-2025) (DING; HU, 2023).

O Brasil realiza seu controle por meio de programas como o Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos, no Âmbito da Saúde Única (2018 -2022) (BRASIL, 2019).

A RAM pode ser classificada em três categorias principais: intrínseca, adaptativa e adquirida. A resistência intrínseca ocorre quando a parede celular bacteriana apresenta uma permeabilidade naturalmente baixa, o que limita a absorção de diversos antibióticos. A resistência adaptativa ocorre como resultado de um estímulo ambiental que gera alterações temporárias nos níveis de expressão de genes e/ou proteínas dos microrganismos que contribuem para a tolerância aos antibióticos (CHRISTAKI; MARCOU; TOFARIDES, 2020; GARNEAU-TSODIKOVA; LABBY, 2016). A resistência adquirida ocorre pela mutação de genes existentes ou pela incorporação de material genético exógeno, como um plasmídeo carregado de múltiplos genes de resistência, podendo ocorrer a transferência do plasmídeo de uma bactéria para outra (GARNEAU-TSODIKOVA; LABBY, 2016).

Como mecanismos de resistência, os microrganismos podem sofrer mutações cromossômicas no receptor onde o antimicrobiano se ligaria, reduzindo, assim, a afinidade entre o fármaco e seu sítio alvo ou, ainda, produzir proteínas que se ligam a tal receptor, evitando a ação do antimicrobiano (FARIA; GODOI; ROMANO, 2021).

Outros mecanismos englobam a ação de enzimas, que degradam ou inativam os antimicrobianos por meio de hidrólise, transferência de um grupo químico ou processo de oxirredução; ou mudanças na permeabilidade da membrana celular, devido a superexpressão de bombas de efluxo, que impede a entrada do antibiótico nas células ou faz com que ele seja expelido e não atinja concentrações ideais para destruição do microrganismo (DA COSTA; JUNIOR, 2017; FARIA; GODOI; ROMANO, 2021).

3 OBJETIVO

O objetivo do presente estudo foi caracterizar as bactérias causadoras de mastite bovina em amostras de leite produzido no Centro-Oeste Paulista e investigar a ocorrência de resistência dos microrganismos isolados frente aos antimicrobianos mais utilizados no tratamento da doença.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

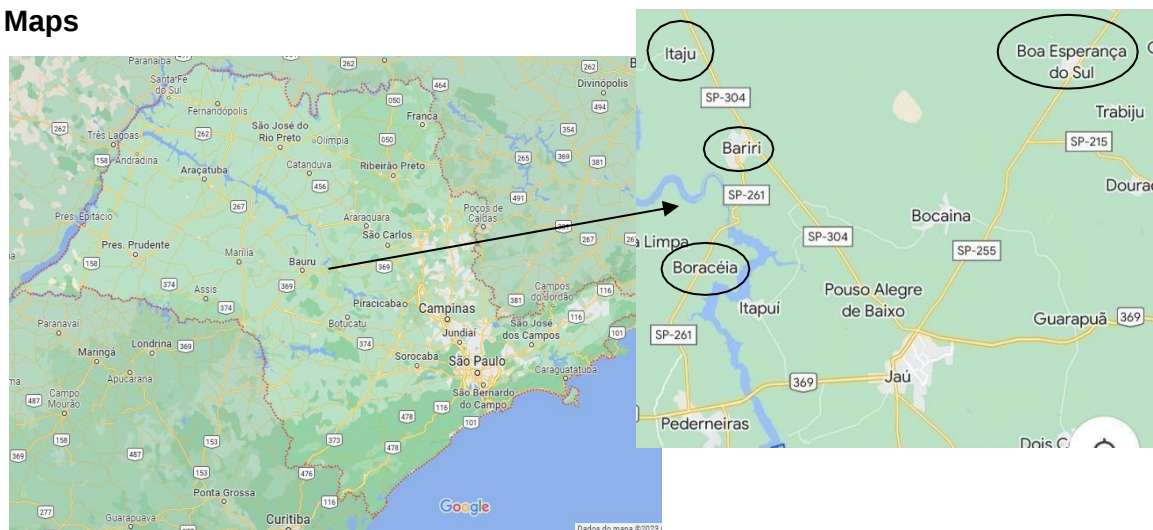
4.1 Amostragem

Este estudo teve a aprovação do Comitê de Ética Animal (Processo FOA nº 0546-2022 – ANEXO A). Foram analisadas amostras de leite cru de 80 vacas oriundas de quatro propriedades rurais localizadas no Centro-Oeste Paulista (Figura 2) entre os meses outubro e dezembro. Os locais foram escolhidos devido a facilidade de acesso e concordância dos produtores rurais. Foram coletadas 20 amostras em cada propriedade, de modo a obter porções equitativas entre elas.

As vacas que forneceram as amostras de leite eram das raças girolando ou jersey ou holandês, primíparas ou multíparas, estavam em período normal de lactação, apresentavam mastite clínica ou subclínica e não estavam em tratamento.

As propriedades apresentavam sistema de criação semi-intensivo e ordenha do tipo mecânica. Todas apresentavam procedimentos descritos de higienização de ordenhas, porém com diferentes condições de instalações e higiene na sala de ordenha e local de descanso dos animais, além de diferentes condições de manutenção dos equipamentos de ordenha, verificadas *in loco*.

Figura 2 – Distribuição geográfica dos municípios amostrados, obtida do Google Maps



Fonte: Elaborado pela autora

Para a detecção de mastite, foi realizada a inspeção clínica da glândula mamária das vacas, para verificação de processo inflamatório (edema e rubor) e presença de pus, coágulos ou sangue, nos três primeiros jatos descartados em caneca de fundo escuro. As vacas que não apresentaram sinais de mastite clínica

passaram pelo teste *California Mastitis Test* (CMT) para o diagnóstico de mastite subclínica (Figura 3). Vacas que apresentaram pontuação de CMT ≥ 3 em uma escala de 1 a 5 em pelo menos um teto foram incluídas na amostragem. Os testes e exames foram realizados por médico veterinário.

Figura 3 – Teste de *California Mastitis Test* (CMT) realizado em vacas da região Centro-Oeste Paulista



Fonte: Arquivo pessoal, 2022

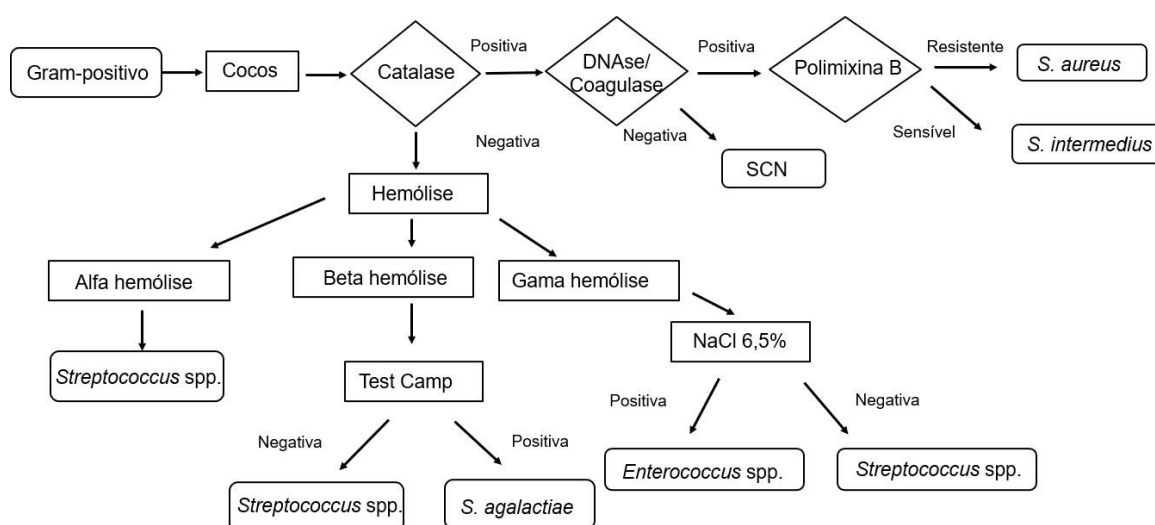
Em seguida, os tetos foram higienizados com álcool 70% e secos com papel toalha. Com a utilização de luvas e antissepsia das mãos com álcool 70%, foram coletados 50 mL de leite de cada vaca (somando-se todos os tetos mastíticos) em tubos plásticos estéreis sem conservante e devidamente identificados. As amostras foram mantidas refrigeradas em temperatura de 2 °C a 4 °C e encaminhadas até o laboratório de Análises Clínicas – UNIP, campus Bauru em, no máximo, 48 horas, para o início das análises.

4.2 Isolamento e identificação dos microrganismos por técnicas microbiológicas tradicionais

As amostras de leite foram semeadas em placas de Petri contendo Ágar Sangue desfibrinado de ovino a 5% e Ágar MacConkey, e incubadas a 37 °C por 24 horas. Após esse período, foram realizadas as leituras, observando-se as características culturais das colônias (morfologia, produção de pigmento e hemólise) e a atividade metabólica no ágar MacConkey (fermentador ou não fermentador de lactose). As características morfo-tintoriais das colônias isoladas

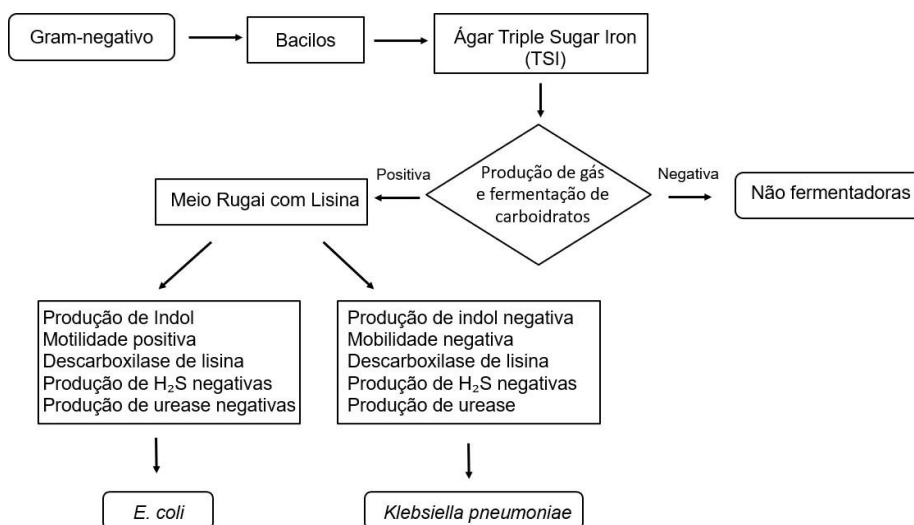
foram verificadas por meio da coloração de Gram. Para bactérias Gram-positivas foram realizados os seguintes testes bioquímicos: catalase, DNase, coagulase, resistência a Polimixina B, tolerância em NaCl 6,5% e Teste Camp (Fluxograma 1). As bactérias Gram-negativas foram repicadas em Meio de Rugai com Lisina e Ágar Triple Sugar Iron (TSI) para a verificação das seguintes características bioquímicas: produção de indol, motilidade, produção de H₂S, produção de urease, descarboxilação de lisina e fermentação de açúcares, de acordo com o Fluxograma 2 (QUINN et al., 1993; SILVA et al., 2017).

Fluxograma 1 – Identificação de bactérias Gram-positivas



Fonte: Elaborado pela autora

Fluxograma 2 – Identificação de bactérias Gram-negativas



Fonte: Elaborado pela autora

4.3 Identificação microbiana por espectrometria de massa (MALDI-TOF MS)

A fim de confirmar as espécies isoladas na metodologia tradicional, parte das amostras de leite, mantidas sob congelamento a -20 °C, também foram destinadas para a identificação por espectrometria de massa (MALDI-TOF MS). As amostras foram encaminhadas congeladas para o Laboratório Qualileite, no Departamento de Nutrição e Produção Animal, UNESP, câmpus Botucatu (FMVZ). A metodologia foi realizada de acordo com o descrito por Barcelos et al., 2019.

4.3.1 Cultivo microbiológico

As amostras foram cultivadas em Ágar Sangue de bovino a 5%, em aerobiose, a 37 °C, durante 24 horas. Os isolados foram submetidos à coloração de Gram, catalase e teste de KOH para determinação da morfologia e diferenciação.

4.3.2 Extração de proteínas ribossomais dos isolados

Uma alçada de cada isolado puro foi transferida para uma mistura de 300 µL de água Milli-Q autoclavada e 900 µL de etanol grau HPLC. Realizou-se a homogeneização em misturador tipo Vórtex K45-2820 K45-2820 (Kasvi, Curitiba, Brasil) durante 1 minuto e procedeu-se à centrifugação 13.000 x g por 2 minutos (modelo 5417R, Eppendorf®, Hamburgo, Alemanha) para a completa remoção do sobrenadante, obtendo-se pellets bacterianos, que foram secos à temperatura ambiente por 5 a 10 minutos.

A dissolução dos pellets bacterianos foi realizada com quantidade suficiente de ácido fórmico 70% (entre 10 e 50 µL), proporcionalmente ao tamanho do sedimento. Na sequência, adicionou-se acetonitrila 100% em volumes iguais aos da solução de ácido fórmico 70% adicionada anteriormente, obedecendo-se a um intervalo de 10 minutos entre os reagentes. Seguiu-se para a etapa de centrifugação para separar restos de células bacterianas do sobrenadante contendo as proteínas ribossômicas extraídas.

Aplicou-se uma colônia na placa de aço com o auxílio de um palito de madeira, adicionou-se 1,0 µL de ácido fórmico 70% na placa e deixou-se secar à

temperatura ambiente. Após a secagem, aplicou-se 1,0 µL de solução matriz (ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA)) diluído em acetonitrila 50% e ácido trifluoroacético 2,5% e, novamente, deixou-se secar em temperatura ambiente por 5 a 10 minutos.

4.3.3 Obtenção dos espectros de massa

Antes de iniciar a análise, o equipamento MALDI-TOF MS (Bruker Daltonik, Bremen, Alemanha) foi calibrado com uma solução de proteína padrão (Bacterial Test Standard, BTS; Bruker), um controle positivo (*Escherichia coli*) e um controle negativo (ácido fórmico e matriz) em cada placa. A análise foi realizada com o uso do software FlexControl 3.4 (Bruker Daltonik, Bremen, Alemanha), operado em modo linear e equipado com um laser de nitrogênio de 337 nm.

Os espectros de massa foram coletados em um alcance de massa de 2.000 a 20.000 m/z (massa/carga) no modo automático, com três mil disparos de laser. A leitura da placa foi realizada de acordo com as especificações para identificação de proteínas extraídas e o processamento de dados espectrais foi feito com o software para identificação de microrganismos MALDI Biotyper 4.1.70 (Bruker Daltonik, Bremen, Alemanha). Para a interpretação dos resultados, escores $\geq 1,7$ foram considerados confiáveis para identificação de gênero, e escores $\geq 2,0$ foram considerados confiáveis para identificação de gênero e espécie.

4.4 Antibiograma dos microrganismos isolados por técnicas microbiológicas tradicionais

Os microrganismos foram submetidos ao teste de sensibilidade aos antimicrobianos pelo método de difusão em disco, seguindo as especificações do Instituto de Padrões Cínicos e Laboratoriais (CLSI) (WATTS et al., 2008). Os antimicrobianos utilizados nesta análise foram selecionados por serem os mais utilizados para tratar e controlar a mastite na região. Em especial, a oxacilina foi escolhida para a busca de possível presença de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina.

Os isolados foram transferidos para tubos contendo solução fisiológica estéril até atingir o padrão de turbidez de referência (0,5 McFarland) e, posteriormente, para placas contendo Ágar Müller-Hinton, utilizando um swab

estéril. Sobre o ágar, foram adicionados discos contendo os antimicrobianos Gentamicina (10 µg), Amoxicilina + Clavulanato (20 µg + 10 µg), Tetraciclina (30 µg) e Oxacilina (1 µg). A incubação foi realizada a 35 °C durante 24 h.

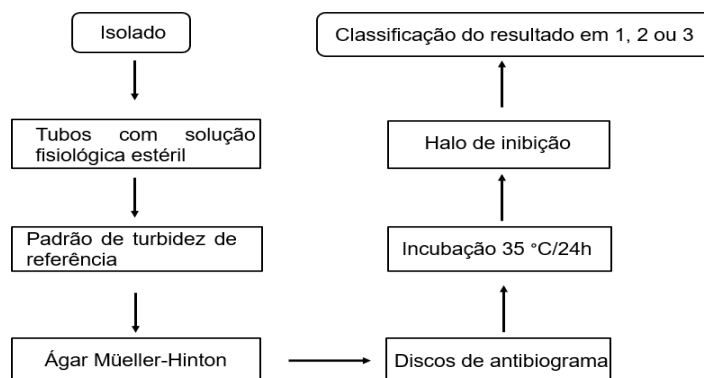
Após o período de incubação, o halo de inibição dos antimicrobianos foi mensurado em milímetros, com o auxílio de uma régua (Figura 4). Os resultados obtidos foram classificados de acordo com a seguinte pontuação: 1 – microrganismo sensível ao antimicrobiano; 2 – microrganismo com resistência intermediária ao antimicrobiano; e 3 – microrganismo resistente ao antimicrobiano (Fluxograma 3), com base no preconizado pelo CLSI 2021 (WATTS et al., 2008).

Figura 4 – Antibiograma dos agentes etiológicos de mastite isolados do leite por técnicas microbiológicas tradicionais



Fonte: Arquivo pessoal

Fluxograma 3 – Procedimento de realização do antibiograma das colônias isoladas do leite por técnicas microbiológicas tradicionais



Fonte: Elaborado pela autora

4.5 Análise de dados

Os dados obtidos foram analisados por meio de estatística descritiva.

5 RESULTADOS

5.1 Agentes etiológicos isolados das amostras de leite de vacas portadoras de mastite

Os microrganismos isolados das amostras de leite pelas técnicas tradicionais estão relacionados na Tabela 1. Os resultados obtidos mostram uma etiologia múltipla, visto que em 87,50% das amostras analisadas foram isoladas bactérias Gram-positivas causadoras de mastite contagiosa e, em 24,3% destas, também foram isoladas bactérias Gram-negativas, relacionadas à mastite ambiental. Nas demais amostras (12,5%) não houve crescimento de microrganismos.

Tabela 1 – Incidência de agentes etiológicos isolados de amostras de leite de vacas com mastite pelas técnicas microbiológicas tradicionais

Agente etiológico	Incidência
Gram-positivas	
<i>Staphylococcus aureus</i>	54,3 %
Estafilococos coagulase negativa (SCN)	31,4 %
<i>Streptococcus</i> spp.	5,71 %
<i>Enterococcus</i> spp.	4,3 %
<i>Streptococcus agalactiae</i>	4,3 %
Gram-negativas	
<i>Escherichia coli</i>	18,6 %
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5,7 %

Fonte: Elaborado pela autora

Dentre os microrganismos isolados na cultura microbiológica que precedeu a identificação das espécies por espectrometria de massa, foram identificados os gêneros *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp. e estafilococos coagulase negativos. As espécies *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* também foram confirmadas pela técnica. A identificação das espécies por MALDI-TOF MS está apresentada na Tabela 2.

Tabela 2 – Incidência de agentes etiológicos isolados de amostras de leite de vacas com mastite por espectrometria de massa

Agente etiológico	Incidência
<i>Staphylococcus aureus</i>	
<i>Staphylococcus aureus</i>	54,3 %
Estafilococos coagulase negativa (SNC)	
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	77,3 %
<i>Staphylococcus simulans</i>	9,1 %
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	9,1 %
<i>Staphylococcus sciuri</i>	4,5 %
<i>Streptococcus spp.</i>	
<i>Streptococcus uberis</i>	5,7 %
<i>Streptococcus agalactiae</i>	4,3%
<i>Enterococcus spp.</i>	
<i>Enterococcus faecium</i>	4,3 %
<i>Escherichia coli</i>	
<i>Escherichia coli</i>	18,6 %
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5,7 %

Fonte: Elaborado pela autora

5.2 Formas clínicas e agentes etiológicos identificados

A triagem realizada nos animais para o diagnóstico das mastites permitiu detectar mastite subclínica em 76,3% dos animais e mastite clínica em 23,7% deles. As espécies bacterianas isoladas das formas clínica e subclínica de mastite estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 – Agentes etiológicos isolados de amostras de leite de vacas com mastite clínica e subclínica

Forma	Agente etiológico	Incidência (%)
Mastite Clínica	<i>Staphylococcus aureus</i>	6,3
	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	1,3
	<i>Staphylococcus simulans</i>	0,0
	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	0,0
	<i>Staphylococcus sciuri</i>	1,3
	<i>Streptococcus uberis</i>	2,5
	<i>Streptococcus agalactiae</i>	0,0
	<i>Enterococcus faecium</i>	0,0
	<i>Escherichia coli</i>	16,3
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3,8
Mastite Subclínica	<i>Staphylococcus aureus</i>	41,3
	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	20,0
	<i>Staphylococcus simulans</i>	2,5
	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	2,5
	<i>Staphylococcus sciuri</i>	0,0
	<i>Streptococcus uberis</i>	2,5
	<i>Streptococcus agalactiae</i>	3,8
	<i>Enterococcus faecium</i>	3,8
	<i>Escherichia coli</i>	0,0
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1,3

Fonte: Elaborado pela autora

5.3 Sensibilidade antimicrobiana dos agentes etiológicos isolados pelas técnicas microbiológicas tradicionais

Os graus de sensibilidade antimicrobiana dos microrganismos isolados no presente estudo estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Grau de sensibilidade antimicrobiana dos agentes etiológicos de mastite isolados por técnicas microbiológicas tradicionais

Agente etiológico	Antimicrobianos											
	Tetraciclinas (30 µg)			Gentamicina (10 µg)			Amoxicilina com Clavulanato (20 µg + 10 µg)			Oxacilina (1 µg)		
	Grau de Sensibilidade											
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
GRAM-POSITIVOS (%)												
<i>S. aureus</i>	89	0	11	89	0	11	87	0	13	66	0	34,2
SCN	72,8	13,6	13,6	77	9	14	87	0	13	13,6	13,6	72,8
<i>S. chromogenes</i>	64,7	17,6	17,6	70,6	11,8	17,6	82,4	17,6	0	17,6	17,6	64,7
<i>S. simulans</i>	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0
<i>S. haemolyticus</i>	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0
<i>S. sciuri</i>	100	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	100
<i>S. uberis</i>	75	0	25	100	0	0	100	0	0	50	0	50
<i>E. faecium</i>	66,7	0	33,3	0	66,7	33,3	100	0	0	33,3	0	66,7
<i>S. agalactiae</i>	67	0	33	0	67	33	100	0	0	66,7	0	33,3
GRAM-NEGATIVOS (%)												
<i>E. coli</i>	54	8	38	100	0	0	77	15	8	0	0	100
<i>K. pneumoniae</i>	100	0	0	100	0	0	75	0	25	0	0	100

SCN: Estafilococos coagulase negativa

Fonte: Elaborado pela autora

6 DISCUSSÃO

6.1 Bactérias Gram-positivas

Foi encontrada uma alta incidência de *Staphylococcus aureus* nas amostras de leite provenientes de vacas com mastite coletados neste estudo (54,3%), principalmente nas mastites subclínicas diagnosticadas (41,3%). Esses resultados estão de acordo com dados recentes encontrados no Estado de Minas Gerais, onde houve o isolamento de 28 a 93% desse microrganismo (GONÇALVES et al., 2023), e confirmam *S. aureus* como o principal agente causador de mastite no mundo (KRISHNAMOORTHY et al., 2021), o que gera grandes preocupações, visto que a taxa de cura de mastite causada por essa espécie bacteriana é relativamente baixa.

A presença desse microrganismo no leite representa risco aos consumidores devido à existência de fatores de virulência tais como as hemolisinas, α -toxina (hla), que apresenta efeitos dermonecróticos e neurotóxicos, e β -toxina (hlb), responsável por aumentar a aderência do *S. aureus* às células epiteliais mamárias bovinas (MONISTERO et al., 2020).

Esse microrganismo também é capaz de produzir TSST-1 (toxina da síndrome do choque tóxico) e 24 tipos de enterotoxinas termoestáveis, tais como enterotoxina estafilocócica A (SEA), enterotoxina estafilocócica B (SEB) e enterotoxina estafilocócica I (SEI), capazes de permanecer viáveis mesmo após o tratamento térmico, podendo causar intoxicações e outras enfermidades fatais (OLIVEIRA et al., 2022) após a ingestão de leite ou derivados lácteos contaminados. Por se tratar de um microrganismo oriundo de fora da glândula mamária, sua erradicação na propriedade é muito desafiadora (KEEFE, 2012).

Os Estafilococos coagulase negativos (SNC) foram o segundo grupo de microrganismos de maior incidência encontrados neste estudo (31,4%). O mesmo ocorreu em uma pesquisa que relacionou a mastite com a eficiência reprodutiva de vacas leiteiras, onde 40,7% dos agentes isolados apresentados pertenciam a este grupo (DALANEZI et al., 2020). Valores próximos (48,7%) também foram encontrados em estudos que abordaram aspecto etiológico, celularidade e contagem bacteriana de leite oriundo de vacas com mastite em propriedades do Estado de São Paulo (LANGONI et al., 2015).

SNC é um grupo heterogêneo de microrganismos, contendo 47 espécies, dentre elas *S. chromogenes*, *S. xylosus*, *S. haemolyticus*, *S. epidermidis*, *S. simulans*, *S. sciuri* e *S. hyicus* (LANGONI et al., 2017; RALL et al., 2014). Esses microrganismos são tipicamente utilizados como culturas iniciadoras na produção de alimentos fermentados e, por vários anos, foram identificados apenas em nível de gênero, visto que os microrganismos componentes desse grupo eram considerados não patogênicos (CHAJECKA-WIERZCHOWSKA et al., 2015; MARTINS et al., 2014).

Entretanto, já foram relatados diversos surtos de intoxicação alimentar envolvendo pessoas imunossuprimidas, causados por espécies de SCN encontradas, principalmente, em alimentos crus, como o leite (MARTINS et al., 2014; SOUMYA et al., 2017). Tal fato ocorre devido à capacidade desses microrganismos produzirem enterotoxinas, confirmada em testes laboratoriais, como, por exemplo, a produção de enterotoxina estafilocócica C (SEC) e enterotoxina estafilocócica D (SED) por *S. warneri* e *S. chromogenes* (LANGONI et al., 2017; MARTINS et al., 2014).

Dentre as espécies pertencentes a esse grupo, *S. chromogenes* foi encontrado em 77,3% das amostras, principalmente nas provenientes de animais com mastite subclínica (20%). A elevada taxa de identificação de *S. chromogenes* encontrada dentre os estafilococos coagulase negativos é condizente com estudos atuais, em que esta espécie de SCN é a isolada com maior frequência em casos de mastites (BOCHNIARZ et al., 2016).

Também foram encontrados *S. haemolyticus* (9,1%) dentre os SNC isolados. Esses microrganismos são responsáveis por causar infecções nasocomiais, meningite, infecções cutâneas e oculares em humanos. A espécie *S. simulans*, isolada em 9,1% das amostras, pode gerar endocardite, osteomielite e infecções em tecidos moles, embora seja rara a infecção em humanos (DROBENIUC et al., 2021; ELTWISY et al., 2022).

Streptococcus uberis foi isolado em 5,7% das amostras de leite provenientes de vacas com mastite neste estudo, aparecendo nas mesmas quantidades, tanto nos casos de mastite clínica quanto nos casos de mastite subclínica (2,5%). Essa espécie é descrita como um patógeno ambiental responsável por provocar cerca de um terço de casos de mastite clínica e

subclínica, principalmente em rebanhos com manejo intensivo (MONISTERO et al., 2021; PERRIG et al., 2015). Esse microrganismo apresenta alta variedade genética entre suas linhagens, com capacidade de se adaptar em diferentes meios, além de possuir ampla flexibilidade nutricional, o que dificulta a realização de estratégias de controle eficazes nas propriedades leiteiras (REINOSO, 2017).

Dentre as estratégias de controle utilizadas para *S. uberis* está a utilização de vacinas específicas, que devem conferir proteção contra as cepas predominantes do patógeno. Entretanto, ainda se encontram dificuldades devido aos diversos fatores de virulência do microrganismo, tais como proteoglicanos e proteínas (LOURES et al., 2017; REINOSO, 2017).

A presença de *Streptococcus agalactiae* foi identificada em 4,3% das amostras, com prevalência em animais acometidos de mastite subclínica (3,8%). Esse é um importante agente causador de mastite no Brasil, na Colômbia e no Uruguai, com prevalência em nível de rebanho de 60%, 42% e 11%, respectivamente (REYES et al., 2015). *S. agalactiae* caracteriza-se por ser um patógeno contagioso que sobrevive pouco tempo no ambiente fora da glândula mamária, mas que, uma vez dentro dela, pode permanecer por longos períodos (LANGONI et al., 2017).

Pertencente ao grupo B na classificação Lancefield, *S. agalactiae* é responsável por causar mastite clínica ou subclínica em gado leiteiro (PINTO et al., 2013) e doenças graves em recém-nascidos, gestantes, adultos imunocomprometidos e idosos, tais como meningite e septicemia (PINTO et al., 2013; THOMAS; COOK, 2020). Estudos sugerem uma possível similaridade genética entre as linhagens de origem bovina e humana e alguns citam a possibilidade de transmissão interespecíes; entretanto ainda há muito a ser elucidado sobre essa relação (SANTOS et al., 2007; SUKHANAND et al., 2005).

Enterococcus spp. apresenta alta capacidade de adaptação a condições adversas, podendo sobreviver no ambiente por longos períodos (KIM et al., 2022). Dentre as espécies causadoras de mastite ambiental, *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* se destacam. Embora tenha sido detectado em menor quantidade neste estudo (4,3%), com prevalência em mastite subclínica (3,8%), *Enterococcus faecium* representa um risco para a saúde pública quando presente no leite, pois apresenta capacidade de resistir a altas temperaturas (CHAJECKA-

WIERZCHOWSKA et al., 2020; RÓŻAŃSKA et al., 2019). Mais de 50% dos *Enterococcus* spp. presentes em alimentos crus resistem à pasteurização rápida e algumas populações podem sobreviver em temperaturas de 85 °C por 16 segundos (CHAJECKA-WIERZCHOWSKA et al., 2020). A resistência térmica desse microrganismo pode fazer com que ele esteja presente em leite pasteurizado ou em derivados lácteos, causando prejuízos à saúde de consumidores imunodebilitados (RÓŻAŃSKA et al., 2019).

6.2 Bactérias Gram-negativas

Dentre as bactérias Gram-negativas isoladas neste estudo, foi encontrado um crescimento elevado de *E. coli* (76,5%) e *Klebsiella* spp. (23,5%), com presença em 16,3% e 3,8% das mastites clínicas, respectivamente. Estas bactérias são agentes oportunistas e podem causar mastite ambiental e clínica (SANTOS; FONSECA, 2019).

A ocorrência desses microrganismos como causadores de mastite apresenta maior relação com a associação entre hospedeiro e fatores de exposição (saúde dos animais e higiene ambiental) do que com um conjunto de cepas patogênicas mamárias (TOMAZI et al., 2018). A elevada incidência desses microrganismos em amostras de leite provenientes de vacas com mastite foi relatada anteriormente, com números muito próximos aos encontrados neste estudo: 76,4% de *E. coli* e 23,6% de *Klebsiella* spp. (DALANEZI et al., 2020).

A presença de cepas patogênicas de *E. coli* em leite cru e em produtos lácteos elaborados com leite não pasteurizado é uma grande preocupação de Saúde Pública, visto que esse é um microrganismo capaz de produzir toxinas importantes, como a toxina Shiga (STEC), e de provocar alterações entéricas graves em pessoas de qualquer idade (ROSARIO et al., 2021).

Dentre o gênero *Klebsiella*, a espécie *K. pneumoniae* é uma das mais frequentes causadoras da mastite bovina (ZADOKS et al., 2011). *Klebsiella pneumoniae* já foi associada a surtos de doenças transmitidas por alimentos, provocando sintomas intestinais; entretanto, não é um importante patógeno de origem alimentar (DAVIS; PRICE, 2016).

6.3 Resistência Antimicrobiana

Nesse estudo, foi encontrada uma alta taxa de resistência a oxacilina (55%) pelas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, o que pode estar associado à produção de enzimas beta-lactamases, originadas de plasmídeos ou transposon, que degradam os antibióticos beta-lactâmicos, como as penicilinas (CESUR; DEMIROZ, 2013).

A oxacilina é um antibiótico semissintético pertencente ao grupo das penicilinas, resistente a ácidos e enzimas. Por ser uma penicilina estável, é eficaz contra cocos Gram-positivos e bacilos Gram-negativos produtores de penicilinases (CHENG et al., 2019). Esse antimicrobiano está relacionado com a resistência à meticilina, também chamada de resistência à penicilina ou à oxacilina, sendo utilizado em testes para detecção de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA), que pode ser confirmada pela avaliação dos genes *mecA* (AGUIAR et al., 2022; JONG et al., 2018).

MRSA é um importante patógeno de humanos e sua ocorrência em casos de mastite bovina pode estar associado ao contato entre bovinos e humanos ou outros hospedeiros, como suínos ou, até mesmo, pela infecção por SCN que, em sua maioria, carregam determinantes de resistência antimicrobiana que podem ser transferidos para *S. aureus* (OLIVER; MURINDA, 2012).

Dentre as amostras de *S. aureus* isoladas neste estudo, 34,2% foram consideradas MRSA, devido à resistência apresentada frente à oxacilina, o que causa preocupação para a Saúde Pública, visto que esse grupo apresenta resistência a, praticamente, todos os antibióticos β -lactâmicos disponíveis, devido à presença de enzimas β -lactamases (OLIVEIRA et al., 2022). O aumento da presença de *S. aureus* isolados de mastite bovina com características multirresistentes é um grande problema à Saúde Pública, haja vista que eleva os custos de tratamento e a morbidade da doença (BONSAGLIA et al., 2018).

S. agalactiae é um parasita comensal da glândula mamária bovina e apresenta baixa resistência aos antimicrobianos, como verificado neste estudo (58,4%) (KEEFE, 2012; ZADOKS et al., 2011). Contudo, a resistência demonstrada para a tetraciclina pelos microrganismos encontrados neste estudo (33%) é preocupante, pois esse é um dos principais antimicrobianos utilizados para o controle da infecção intramamária em bovinos leiteiros (PINTO et al., 2013). Essa resistência parece estar associada à redução da permeabilidade da membrana do

microrganismo, resultante de mutações cromossômicas espontâneas durante a absorção do fármaco devido ao seu uso intenso (CESUR; DEMIROS, 2013).

As taxas de resistência de *S. agalactiae* às tetraciclinas vêm crescendo desde os anos 1980 devido ao uso excessivo desse antimicrobiano. Em estudo realizado com leite de vacas acometidas de mastite e linhagens isoladas de superfícies mucosas humanas, os autores encontraram resistência de 89,6% para linhagens bovinas e de 89,2% para a linhagem humana desse microrganismo (PINTO et al., 2013). Embora as técnicas de controle *S. agalactiae* sejam relativamente simples, a presença desse microrganismo no leite e derivados gera impactos importantes na de Saúde Pública, podendo ocasionar graves infecções neonatais, como septicemia e meningite (RIBEIRO et al., 2021).

Similarmente ao *S. agalactiae*, *Streptococcus uberis* também apresentou elevada taxa de resistência (25%) frente à tetraciclina. O aumento da resistência de *Streptococcus uberis* às tetraciclinas decorre do uso intenso do antimicrobiano nas propriedades leiteiras no decorrer dos anos, atingindo 80% a 95% de casos (STEMPLER; MUÑOZ; LUCAS, 2022). Essa espécie bacteriana é altamente sensível à classe de antimicrobianos β -lactâmicos, que são frequentemente utilizados para o tratamento de mastites; entretanto, a ocorrência de subespécies resistentes a estes antibióticos vem sendo relatada nos últimos anos (MONISTERO et al., 2021; STEMLER; MUÑOZ; LUCAS, 2022).

Apesar de apresentar diferentes níveis de resistência às espécies identificadas, os antimicrobianos pertencentes aos grupos de tetraciclinas são os mais recomendados para o tratamento de animais infectados, visto que sua sensibilidade (81,6%) para inibição dos microrganismos é maior que sua resistência (15,8%), como demonstrado nos resultados do presente estudo.

A espécie *Enterococcus faecium* isolada neste estudo apresentou 33,3% de resistência frente aos antimicrobianos testados. Tal resistência está relacionada a mecanismos intrínsecos e adquiridos, e o consumo de alimentos contaminados com esse microrganismo, como leite e derivados, possibilita a transposição de *Enterococcus* spp. resistentes a antimicrobianos para humanos devido à colonização temporária ou permanente no trato gastrointestinal (CHAJECKA-WIERZCHOWSKA et al., 2020; RÓŻAŃSKA et al., 2019). O gênero *Enterococcus* spp apresenta habilidade de adquirir e transferir genes determinantes de resistência

para outras bactérias e, por esse motivo, é considerado um bom indicador de resistência antimicrobiana no ambiente (RÓŻAŃSKA et al., 2019).

O grupo SCN apresentou 28,4% de resistência frente aos microrganismos isolados, um valor expressivo e preocupante, visto que são capazes de abrigar diversos genes de resistência a vários antimicrobianos, e que podem ser transferidos para *S. aureus* por meio de plasmídeos e/ou transposons (CHAJECKA-WIERZCHOWSKA et al., 2015; NOBREGA et al., 2021). Estudos envolvendo a detecção de genes de resistência, incluindo o gene blaZ, mostraram que nenhum dos *S. aureus* analisados possuía mais de três genes de resistência, enquanto 25% dos isolados de SNC abrigavam, pelo menos, quatro genes que codificam resistência a antibióticos (ROBLES et al., 2014).

A alta ocorrência de resistência antimicrobiana apresentada pelo isolado de *E. coli* (36,5%) também representa um problema, visto que, apesar de a terapia para mastites causada por esse microrganismo, muitas vezes, ser limitada à redução dos sinais clínicos e à manutenção da vaca, com cura espontânea (CHENG et al., 2019; RUEGG, 2018), há possibilidade de infecção por cepas produtoras de toxinas que podem acarretar riscos à Saúde Pública quando da ingestão de alimento contaminado.

Diferente do que ocorre com *E. coli*, as mastites causadas por *K. pneumoniae* tendem a manifestar uma baixa taxa de cura espontânea, podendo, ainda, apresentar recorrência de casos clínicos e abrigar genes de resistência antimicrobiana (NOBREGA et al., 2021).

A resistência antimicrobiana apresentada pelos coliformes está ligada à produção de enzimas β -lactamases de espectro estendido (ESBL), que inativam a ação de antimicrobianos da classe de β -lactâmicos de amplo espectro (amoxicilinae oxacilina) (DAHMS et al., 2015). Além disso, apresentam uma menor permeabilidade, reduzindo a entrada dos antimicrobianos na célula bacteriana, haja vista que sua parede celular apresenta uma membrana externa composta por fosfolipídeos, lipoproteínas, proteínas e lipopolissacarídeos (LPS), além da camada de peptidoglicanos (DAHMS et al., 2015; NOBREGA et al., 2021).

7 CONCLUSÃO

As bactérias Gram-positivas foram as principais causadoras de mastite contagiosa na região na região Centro-Oeste Paulista e, tanto as bactérias Gram-positivas quanto as Gram-negativas isoladas de leite proveniente de vacas com mastite apresentaram alta taxa de resistência à oxacilina e sensibilidade frente ao antimicrobiano amoxicilina com clavulanato.

Com base nos resultados obtidos, reforça-se a necessidade do monitoramento de patógenos no rebanho leiteiro por meio do diagnóstico dos agentes causadores de mastite e de programas de manejo e uso consciente de antimicrobianos nas propriedades rurais para um tratamento eficaz.

Ressalta-se, também, a necessidade de estabelecer uma estratégia de controle e manejo de ordenha para evitar e/ou diminuir a ocorrência de patógenos contagiosos e a contaminação cruzada entre vacas saudáveis e enfermas, utilizando-se boas práticas agropecuárias, tais como pré e pós-*dipping*, higiene do ordenhador e descarte de vacas que apresentem mastite crônica.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, R. A. C.; FERREIRA, F. A.; DIAS, R. S.; NERO, L. A.; MIOTTO, M.; VERRUCK, S.; MARCO, I.; LINDNER, J. D. Graduate student literature review: enterotoxigenic potential and antimicrobial resistance of staphylococci from Brazilian artisanal raw milk cheeses. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 105, n. 7, p. 5685-5699, jul. 2022. DOI: 10.3168/jds.2021-21634. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35636996/>. Acesso em: 19 jan. 2023.
- ALHUSSIEN, M. N.; DANG, A.K. Milk somatic cells, factors influencing their release, future prospects, and practical utility in dairy animals: An overview. **Veterinary World**, v. 11, n. 5, p. 562-577, mai. 2018. DOI: 10.14202/vetworld.2018.562-577. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5993762/>. Acesso em: 31 jul. 2023.
- ALI, A.; MIR, M. U. R.; GANIE, S. A.; MUSHTAQ, S.; BUKHARI, S. I.; ALSHEHRI, S.; RASHID, S. M.; MIR, T. M.; REGMAN, M. U. Milk-Compositional Study of Metabolites and Pathogens in the Milk of Bovine Animals Affected with Subclinical Mastitis. **Molecules**, v. 27, n. 23, p. 8631, dez. 2022. DOI: 10.3390/molecules27238631. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/27/23/8631>. Acesso em: 25 ago. 2023.
- AMEEN, F.; REDA, S. A.; EL-SHATOORY, S. A.; RIAD, E. M.; ENANY, M. E.; ALARFAJ, A. A. Prevalence of antibiotic resistant mastitis pathogens in dairy cows in Egypt and potential biological control agents produced from plant endophytic actinobacteria. **Saudi Journal of Biological Sciences**, Riyadh, v. 26, n. 7, p. 1492-1498, set. 2019. DOI: 10.1016/j.sjbs.2019.09.008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31762615/>. Acesso em: 31 jan. 2023.
- BACANLI, M.; BASARAN, N. Importance of antibiotic residues in animal food. **Food and Chemical Toxicology**, v. 125, p. 462-466, mar. 2019. DOI: 10.1016/j.fct.2019.01.033. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691519300456>. Acesso em: 31 jan. 2023.
- BAHRAMIAN, B.; SANI, M. A.; PARSA-KONDELAJI, M.; HOSSEINI, H.; KHALEDIAN, Y.; REZAIE, M. Antibiotic residues in raw and pasteurized milk in Iran: A systematic review and meta-analysis. **AIMS Agriculture and Food**, v. 7, n. 3, p. 500-519, jul. 2022. DOI: 10.3934/agrfood.2022031. Disponível em: <https://www.aimspress.com/article/id/62cd5803ba35de7bde6cf64b>. Acesso em: 31 jul. 2023.
- BARCELOS, M. M.; MARTINS, L.; GRENFELL, R. C.; JULIANO, L.; ANDERSON, K. L.; SANTOS, M. V.; GONÇALVES, J. L. Comparison of standard and on-plate extraction protocols for identification of mastitis-causing bacteria by MALDI-TOF MS. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 50, p. 849-857, jun. 2019. DOI: 10.1007/s42770-019-00110-5. Disponível em:

<https://link.springer.com/article/10.1007/s42770-019-00110-5>. Acesso em: 9 jul. 2023.

BARREIRO, J. R.; GONÇALVES, J. L.; BRAGA, P. A. C.; DIBBERN, A. G.; EBERLIN, M. N.; SANTOS, M. V. Non-culture-based identification of mastitis-causing bacteria by MALDI-TOF mass spectrometry. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 100, n. 4, p. 2928-2934, abr. 2017. DOI: 10.3168/jds.2016-11741. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030217300942>. Acesso em: 14 jul. 2023.

BARREIRO, J. R.; GONÇALVES, J. L.; GRENFELL, R.; LEITE, R. F.; JULIANO, L.; SANTOS, M. V. Direct identification of bovine mastitis pathogens by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in pre-incubated milk. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 49, n. 4, p. 801-807, out./dez. 2018. DOI: 10.1016/j.bjm.2018.04.012. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjm/a/4KbzyNxHymZ9q9Dk9PDwrrK/?format=html&lang=en>. Acesso em: 14 jul. 2023.

BOCHNIARZ, M.; ADASZEK, L.; DZIEGIEL, B.; NOWACZEK, A.; WAWRON, W.; DABROWSKI, R.; SZCZUBIAL, M.; WINIARCZYK, S. Factors responsible for subclinical mastitis in cows caused by *Staphylococcus chromogenes* and its susceptibility to antibiotics based on *bap*, *fnbA*, *eno*, *mecA*, *tetK*, and *ermA* genes. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 99, n. 12, p. 9514-9520, dez. 2016. DOI: 10.3168/jds.2016-11723. Disponível em: [https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(16\)30662-2/fulltext](https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(16)30662-2/fulltext). Acesso em: 18 jul. 2023.

BONSAGLIA, E. C. R.; SILVA, N. C. C.; ROSSI, B. F.; CAMARGO, C. H.; DANTAS, S. T. A.; LANGONI, H.; GUIMARÃES, F. F.; LIMA, F. S.; FITZGERALD, J. R.; FERNANDES JUNIOR, A.; RALL, V. L.M. Molecular epidemiology of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) isolated from milk of cows with subclinical mastitis. **Microbial Pathogenesis**, London, v. 124, p. 130-135, nov. 2018. DOI: 10.1016/j.micpath.2018.08.031. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0882401018302663?via%3Dihub>. Acesso em: 10 jul. 2023.

BRAGA, P. A. C.; GONÇALVES, J. L.; BARREIRO, J. R.; FERREIRA, C. R.; TOMAZI, T.; EVERLIN, M. N.; SANTOS, M. V. Rapid identification of bovine mastitis pathogens by MALDI-TOF mass spectrometry. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 4, p. 586-594, abr. 2018. DOI: 10.1590/1678-5150-PVB-4821. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/pvb/a/Gd4HFxFG95XBhWKTSxNXq3z/#>. Acesso em: 14 jul. 2023.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Projeções do Agronegócio: Brasil 2022/2022 a 2032/33**, Brasília, DF: Ministério Da Agricultura Pecuária e Abastecimento, 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/politica-agricola/todas-publicacoes-de-politica-agricola/projecoes-do>

agronegocio/projecoes-do-agronegocio-2022-2023-a-2032-2033.pdf/. Acesso em: 8 ago. 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Plano de ação nacional de prevenção e controle da resistência aos antimicrobianos no âmbito da Saúde Única: 2018-2022 (PAN-BR)**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2019. 24 p. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/plano_prevencao_resistencia_antimicrobianos.pdf. Acesso em: 1 fev. 2023.

CESUR, S.; DEMIROZ, A. P. Antibiotics and the mechanisms of resistance to antibiotics. **Medical Journal of Islamic World Academy of Sciences**, Ankara, v. 21, n. 4, p. 138-142, 2013. Disponível em: https://jag.journalagent.com/ias/pdfs/IAS_21_4_138_142.pdf. Acesso em: 7 fev. 2023.

CHAJECKA-WIERZCHOWSKA, W.; ZADERNOWSKA, A.; GARCÍA-SOLACHE, M. Ready-to-eat dairy products as a source of multidrug-resistant *Enterococcus* strains: phenotypic and genotypic characteristics. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 103, n. 5, p. 4068-4077, mai. 2020. DOI: 10.3168/jds.2019-17395. Disponível em: [https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(20\)30206-X/fulltext](https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(20)30206-X/fulltext). Acesso em: 17 jan. 2023.

CHAJECKA-WIERZCHOWSKA, W.; ZADERNOWSKA, A.; NALEPA, B.; SIERPINSKA, M.; LANIEWSKA-TROKENNHEIM, L. Coagulase-negative staphylococci (CoNS) isolated from ready-to-eat food of animal origin: phenotypic and genotypic antibiotic resistance. **Food Microbiology**, London, v. 46, p. 222-226, abr. 2015. DOI: 10.1016/j.fm.2014.08.001. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002014001981>. Acesso em: 18 jul. 2023.

CHENG, J.; QU, W.; BARKEMA, H. W.; NOBREGA, D. B.; GAO, J.; LIU, G.; BUCK, J.; KASTELIC, J. P.; SUN, H.; HAN, B. Antimicrobial resistance profiles of 5 common bovine mastitis pathogens in large Chinese dairy herds. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 102, n. 3, p. 2416-2426, mar. 2019. DOI: 10.3168/jds.2018-15135. Disponível em: [https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(19\)30030-X/fulltext](https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(19)30030-X/fulltext). Acesso em: 19 jan. 2023.

CHRISTAKI, E.; MARCOU, M.; TOFARIDES, A. Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence. **Journal of Molecular Evolution**, v. 88, p. 26-40, out. 2020. DOI: 10.1007/s00239-019-09914-3. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00239-019-09914-3>. Acesso em: 31 jul. 2023.

COBIRKA, M.; TANCIN, V.; SLAMA, P. Epidemiology and classification of mastitis. **Animals**, Boston, v. 10, n. 12, artigo 2212, 17 p., nov. 2020. DOI:

10.3390/ani10122212. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2615/10/12/2212>. Acesso em: 10 jul. 2023.

DA COSTA, A. L. P.; JUNIOR, A. C. S. S. Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura. **Estação Científica** (UNIFAP), Amapá, v. 7, n. 2, p. 45, 2017. Disponível em: <https://periodicos.unifap.br/index.php/estacao/article/view/2555>. Acesso em: 31 jul. 2023.

DAHMS, C.; HÜBNER, N.-O.; KOSSOW, A.; MELLMANN, A.; DITTMANN, K.; KRAMER, A. Occurrence of ESBL-producing *Escherichia coli* in livestock and farm workers in Mecklenburg-Western Pomerania, Germany. **PLoS One**, San Francisco, v. 10, n. 11, artigo e0143326, 13 p., nov. 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0143326. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26606146/>. Acesso em: 10 jul. 2023.

DALANEZI, F. M.; JOAQUIM, S. F.; GUIMARÃES, F. F.; GUERRA, S. T.; LOPES, B. C.; SCHMIDT, E. M. S.; CERRI, R. L. A.; LANGONI, H. Influence of pathogens causing clinical mastitis on reproductive variables of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 103, n. 4, p. 3648-3655, abr. 2020. DOI: 10.3168/jds.2019-16841. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32089296/>. Acesso em: 18 jan. 2023.

DAVIS, G. S.; PRICE, L. B. Recent research examining links among *Klebsiella pneumoniae* from food, food animals, and human extraintestinal infections. **Current Environmental Health Reports**, Heidelberg, v. 3, p. 128-135, mar. 2016. DOI: 10.1007/s40572-016-0089-9. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40572-016-0089-9>. Acesso em: 27 jan. 2023.

DING, L.; HU, F. China's new national action plan to combat antimicrobial resistance (2022–25). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v. 78, n. 2, p. 558-560, fev. 2023. DOI: 10.1093/jac/dkac435. Disponível em: <https://academic.oup.com/jac/article/78/2/558/6962276>. Acesso em: 1 fev. 2023.

DROBENIUC, A.; TRAENKNER, J.; REBOLLEDO, P. A.; GHAZATYAN, V.; ROUPHAEL, N. *Staphylococcus simulans*: a rare uropathogen. **IDCases**, Amsterdam, v. 25, artigo e01202, 3 p., 2021. DOI: 10.1016/j.idcr.2021.e01202. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S221425092100158X>. Acesso em: 18 jul. 2023.

DYSON, R.; CHARMAN, N.; HODGE, A.; ROWE, S. M.; TAYLOR, L. F. A survey of mastitis pathogens including antimicrobial susceptibility in southeastern Australian dairy herds. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 105, n. 2, p. 1504-1518, dez. 2022. DOI: 10.3168/jds.2021-20955. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030221010729?via%3Dihub>. Acesso em: 17 jan. 2023.

ELTWISY, H. O.; TWISY, H. O.; HAFEZ, M. H. R.; SAYED, I. M.; EL-MOKHTAR, M. A. Clinical infections, antibiotic resistance, and pathogenesis of *Staphylococcus haemolyticus*. **Microorganisms**, Basel, v. 10, n. 6, artigo 1130, 17 p., mai. 2022. DOI: 10.3390/microorganisms10061130. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2607/10/6/1130>. Acesso em: 18 jul. 2023.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. **Anuário Leite 2023**: leite baixo carbono. Brasília, 2023. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1154264/anuario-leite-2023-leite-baixo-carbono>. Acesso em: 28 jul. 2023.

FARIA, L. F.; GODOI, L. B. F.; ROMANO, L. H. Principais mecanismos de resistência bacteriana relacionados ao uso indiscriminado de antibióticos. **Revista Saúde em Foco**, Amparo, n. 13, p. 576 – 587, 2021. Disponível em: <https://portal.unisepe.com.br/unifia/wp-content/uploads/sites/10001/2021/11/PRINCIPAIS-MECANISMOS-DE-RESIST%C3%80NCIA-BACTERIANA-RELACIONADOS-AO-USO-INDISCRIMINADO-DE-ANTIBI%C3%93TICOS.pdf>. Acesso em: 29 jul. 2023.

FARIA, L. V. **Identificação por MALDI-TOF MS de isolados de *Aspergillus* seção *Nigri* e avaliação do potencial biotecnológico na produção de biossurfactantes**. 2015. 92 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. **Livestock primary**. Roma, 2019. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QL>. Acesso em: 20 jan. 2023.

GARNEAU-TSODIKOVA, S.; LABBY, K. J. Mechanisms of resistance to aminoglycoside antibiotics: overview and perspective. **Medicinal Chemistry Communications**, Cambridge, v. 7, p. 11-27, 2016. DOI: 10.1039/C5MD00344J. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2016/md/c5md00344j>. Acesso em: 14 jul. 2023.

GONÇALVES, J. L.; CUE, R. I.; NETTO, E. P. L.; GAMEIRO, A. H.; SANTOS, M. V. Herd-level associations between somatic cell counts and economic performance indicators in Brazilian dairy herds. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.104, n. 2, p. 1855-1863, fev. 2021. DOI: 10.3168/jds.2019-17834. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002203022031002X>. Acesso em: 31 jul. 2023.

GONÇALVES, J. L.; DE CAMPOS, J. L.; STEINBERGER, A. J.; SAFDAR, N.; KATES, A.; SETHI, A.; SHUTSKE, J.; SUEN, G.; GOLDBERG, T.; CUE, R. I.; RUEGG, P. L. Incidence and Treatments of Bovine Mastitis and Other Diseases on 37 Dairy Farms in Wisconsin. **Pathogens**, v.11, n. 11, p. 1282, 2022a. DOI: doi.org/10.3390/pathogens11111282. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-0817/11/11/1282>. Acesso em: 31 jul. 2023.

GONÇALVES, J. L.; KAMPHUIS, C.; VERNOOIJ, H.; ARAUJO JR, J. P.; GRENFELL, R. C.; JULIANO, L.; ANDERSON, K. L.; HOGEVEEN, H.; SANTOS, M. V. Pathogen effects on milk yield and composition in chronic subclinical mastitis in dairy cows. **The Veterinary Journal**, London, v. 262, artigo 105473, 7 p., ago. 2020. DOI: 10.1016/j.tvjl.2020.105473. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023320300502?via%3Dihub>. Acesso em: 18 jul. 2023.

GONÇALVES, J. L.; YOUNG, J.; LEITE, R. F.; FIDELIS, C. E.; TREVISOLI, P. A.; COUTINHO, L. L.; SILVA, N. C. C.; CUE, R. I.; RALL, V. L. M.; SANTOS, M. V. The impact of selective dry cow therapy adopted in a brazilian farm on bacterial diversity and the abundance of quarter milk. **Veterinary Sciences**, Basel, v. 9, n. 10, artigo 550, 18 p., out. 2022b. DOI: 10.3390/vetsci9100550. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2306-7381/9/10/550>. Acesso em: 14 jul. 2023.

GONÇALVES, M. S.; DORNELES, E. M. S.; HEINEMANN, M. B.; BRITO, M. A. V. P.; GUIMARÃES, A. S. Genetic diversity and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Minas Gerais, Brazil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 53, n. 3, artigo e202110643, 11 p., 2023. DOI: 10.1590/0103-8478cr20210643. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cr/a/QfrBzBGHySKTmwHXcHYDpRB/?lang=en>. Acesso em: 23 jan. 2023.

GOULART, D. B.; MELLATA, M. *Escherichia coli* mastitis in dairy cattle: etiology, diagnosis, and treatment challenges. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 13, artigo 928346, 15 p., jul. 2022. DOI: 10.3389/fmicb.2022.928346. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.928346/full>>. Acesso em: 14 de jul. 2023.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Pesquisa trimestral do leite**. [S.l.], 2023. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9209-pesquisa-trimestral-do-leite.html?t=destaques>. Acesso em: 14 jul. 2023.

JAMALI, H.; BARKEMA, H. W.; JACQUES, M.; LAVALLE-BOURGET, E.-M.; MALOUIN, F.; SAINI, V.; STRYHN, H.; DUFOUR, S. Invited review: incidence, risk factors, and effects of clinical mastitis recurrence in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 101, n. 6, p. 4729-4746, jun. 2018. DOI: 10.3168/jds.2017-13730. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002203021830211X>. Acesso em: 14 jul. 2023.

JONG, A.; GARCH, F. E.; SIMJEE, S.; MOYAERT, H.; ROSE, M.; YOUALA, M.; SIEGWART, E. Monitoring of antimicrobial susceptibility of udder pathogens recovered from cases of clinical mastitis in dairy cows across Europe: VetPath results. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 213, p. 73-81, jan. 2018. DOI: 10.1016/j.vetmic.2017.11.021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113517310180?via%3Dihub>. Acesso em: 31 jan. 2023.

KALINSKA, A.; WÓJCIK, A.; SŁÓSZARZ, J.; KRUZINSKA, B.; MICHALCZUK, M.; JAWORSKI, S.; WIERZBICKI, M.; GOLEBIEWSKI, M. Occurrence and etiology of staphylococcal mastitis: a review. **Animal Science Papers and Reports**, Warsaw, v. 36, n. 3, p. 263-273, jul. 2018. Disponível em: <https://www.igbzpan.pl/uploaded/FSiBundleContentBlockBundleEntityTranslatableBlockTranslatableFilesElement/filePath/1186/str263-274.pdf>. Acesso em: 20 jan. 2023.

KEEFE, G. Update on control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for management of mastitis. **Veterinary Clinics North America: Food Animal Practice**, Amsterdam, n. 2, v. 28, p. 203-216, jul. 2012. DOI: 10.1016/j.cvfa.2012.03.010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0749072012000278?via%3Dihub>. Acesso em: 18 jan. 2023.

KIM, H. J.; YOUN, H. Y.; KANG, H. J.; MOON, J. S.; JANG, Y. S.; SONG, K. Y.; SEO, K. H. Prevalence and Virulence Characteristics of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in Bovine Mastitis Milk Compared to Bovine Normal Raw Milk in South Korea. **Animals**, Boston, v. 2022, n. 12, p. 1407, jun. 2022. DOI: 10.3390/ani12111407. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9179290/>. Acesso em: 14 jul. 2023.

KRISHNAMOORTHY, P.; SURESH, K. P.; JAYAMMA, K. S.; SHOME, B. R.; PATIL, S. S.; AMACHAEADI, R. G. An understanding of the global status of major bacterial pathogens of milk concerning bovine mastitis: a systematic review and meta-analysis (scientometrics). **Pathogens**, v. 10, n. 5, artigo 545, 31 p., abr. 2021. DOI: 10.3390/pathogens10050545. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-0817/10/5/545>. Acesso em: 31 jan. 2023.

KUMARI, T.; BHAKAT, C.; CHOUDHARY, R. K. A review on sub clinical mastitis in dairy cattle. **Indian Journal of Pure and Applied Biosciences**, Kota, v. 6, n. 2, p. 1291-1299, mar./abr. 2018. DOI: 10.18782/2320-7051.6173. Disponível em: <http://www.ijpab.com/form/2018%20Volume%206,%20issue%202/IJPAB-2018-6-2-1291-1299.pdf>. Acesso em: 14 jul. 2023.

LANGE, M. J.; ZAMBOM, M. A.; POZZA, M. S. S.; SIMÕES, G. H.; FERNANDES, T.; TININI, R. C. R.; FORNARI, J.; ANSCHAU, F. A. Typology of milking management: analysis of risk factors for subclinical mastitis. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 37, n. 11, p. 1205-1212, nov. 2017. DOI: 10.1590/S0100-736X2017001100004. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/pvb/a/wYSvYfHbCbChLrX4nKCynZk/abstract/?lang=pt#>. Acesso em: 14 jul. 2023.

LANGONI, H. Qualidade do leite: utopia sem um programa sério de monitoramento da ocorrência de mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 5, p. 620-626, mai. 2013. DOI: 10.1590/S0100-736X2013000500012. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/pvb/a/Z5TcnvtpCJwTqLrnyHmjwQN/citation/?lang=pt>. Acesso em: 14 jul. 2023.

LANGONI, H.; GUIMARÃES, F. F.; COSTA, E. O.; JOAQUIM, S. F.; MENOZZI, B. D. Milk cellularity and colony forming units in mastitis caused by coagulase-positive staphylococci and coagulase negative **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 35, n. 6, p. 518-524, jun. 2015. DOI: 10.1590/S0100-736X2015000600005. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/pvb/a/FX5kBZTGx8CnSwqSkTFVZSw/?lang=pt#>. Acesso em: 10 jul. 2023.

LANGONI, H.; SALINA, A.; OLIVEIRA, G. C.; JUNQUEIRA, N. B.; MENOZZI, B. D.; JOAQUIM, S. F. Considerations on the treatment of mastitis. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 37, n. 11, p. 1261-1269, nov. 2017. DOI: 10.1590/S0100-736X2017001100011. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/pvb/a/T7rLVhnbGbyh85kFLtqPnN/#>. Acesso em: 10 jul. 2023.

LEITE, R. F. **Concentração inibitória mínima de extratos brutos produzidos por actinobactérias para agentes causadores de mastite**. 2016. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

LINDEMAN, C. J.; PORTIS, E.; JOHANSEN, L.; MULLINS, L. M.; STOLTMAN, G. A. Susceptibility to antimicrobial agents among bovine mastitis pathogens isolated from North American dairy cattle, 2002-2010. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Thousand Oaks, v. 25, n. 5, p. 581-591, ago. 2013. DOI: 10.1177/1040638713498085. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1040638713498085>. Acesso em: 1 fev. 2023.

LOURES, R. A.; PEREIRA, U. P.; CARVALHO-CASTRO, G. A.; MIAN, G. F.; CUSTÓDIO, D. A. C.; SILVA, J. R.; COSTA, G. M. Diversidade genética e genes de virulência em amostras de *Streptococcus uberis* isolados de mastite bovina. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 38, n. 4, p. 2595-2606, ago. 2017. Suplemento 1. DOI: 10.5433/1679-0359.2017v38n4Supl1p2595. Disponível em: <https://ojs.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/27726>. Acesso em: 18 jul. 2023.

MAIOCHI, R. R.; RODRIGUES, R. G. A.; WOSIACKI, S. R. Principais métodos de detecção de mastites clínicas e subclínicas de bovinos. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 16, n. 29, p. 137, jun. 2019. Disponível em: <https://conhecer.org.br/ojs/index.php/biosfera/article/view/270>. Acesso em: 28 jul. 2023.

MARTINS, I. M.; KABUKI, D. Y.; MIYA, N. T. N.; PEREIRA, J. L. Occurrence and characterization of enterotoxigenic potential of *Staphylococcus* isolated from dairy products. **Journal of Food Safety**, v. 34, n. 3, p. 185-192, maio 2014. DOI: 10.1111/jfs.12112. Disponível em:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/jfs.12112>. Acesso em: 28 jan. 2023.

MARTINS, J. D.; NICOLAU, E. S.; MESQUITA, A. J.; JARDIM, E. A. G. V. Mastite subclínica em rebanhos leiteiros de propriedades rurais de Goiás. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, Fortaleza, v. 10, n. 3, p. 374-381, jul.-set. 2016. Disponível em: <http://www.higieneanimal.ufc.br/seer/index.php/higieneanimal/article/view/326>. Acesso em: 17 jan. 2023.

MARTINS, L.; GONÇALVES, J. L.; LEITE, R. F.; TOMAZI, T.; RALL, V. L. M.; SANTOS, M. V. Association between antimicrobial use and antimicrobial resistance of *Streptococcus uberis* causing clinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 104, n. 11, p. 12030-12041, ago. 2021. DOI: 10.3168/jds.2021-20177. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34389143/>. Acesso em: 17 jan. 2023.

MASSOTE, V. P.; ZANATELI, B. M.; ALVES, G. V.; GONÇALVES, E. S.; GUEDES, E. Diagnóstico e controle de mastite bovina: uma revisão de literatura. **Revista Agroveterinária do Sul de Minas**, Varginha, v. 1, n. 1, p. 41-54, out. 2019. Disponível em: <https://periodicos.unis.edu.br/index.php/agrovetsulminas/article/view/265>. Acesso em: 17 jul. 2023.

MELLO, P.; AGOSTINIS, R. O.; BARZON, E. M.; COLOMBO, R. B.; SILVA, A. V.; MARTINS, L. A. Prevalence of mastitis and association of etiologic agents with somatic cell count of dairy cows in the southwestern region of Paraná. **Veterinária e Zootecnia**, Botucatu, v. 19, n. 4, p. 513-521, jan. 2012. Disponível em: <https://rvz.emnuvens.com.br/rvz/article/view/1391>. Acesso em: 20 jan. 2023.

MENDES, K. **Efeitos da remoção de tarifas e barreiras não tarifárias na cadeia produtiva do leite em pó no Brasil**. Brasília: Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada – IPEA, nov. 2022. DOI: 10.38116/td2816. Disponível em: https://repositorio.ipea.gov.br/bitstream/11058/11583/1/TD_2816_Web.pdf. Acesso em: 12 ago. 2023.

MONISTERO, V.; BARBERIO, A.; BISCARINI, F.; CREMONESI, P.; CASTIGLIONI, B.; GRABER, H. U.; BOTTINI, E.; CEBALLOS-MARQUEZ, A.; KROEMKER, V.; PETZER, I. M.; POLLERA, C.; SANTISTEBAN, C.; SANTOS, M. V.; BRONZO, V.; PICCININI, R.; RE, G.; COCCHI, M.; MORONI, P. Different distribution of antimicrobial resistance genes and virulence profiles of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical mastitis in six countries. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 103, n. 4, p. 3431-3446, abr. 2020. DOI: 10.3168/jds.2019-17141. Disponível em: [https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(20\)30059-X/fulltext](https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(20)30059-X/fulltext). Acesso em: 14 jul. 2023.

MONISTERO, V.; BARBERIO, A.; CREMONESI, P.; CASTIGLIONI, B.; MORANDI, S.; LASSEN, D. C. K.; ASTRUP, L. B.; LOCATELLI, C.; PICCININI, R.;

ADDIS, M. F.; BRONZO, V.; MORONI, P. Genotyping and antimicrobial susceptibility profiling of *Streptococcus uberis* isolated from a clinical bovine mastitis outbreak in a dairy farm. **Antibiotics**, Basel, v. 10, n. 6, artigo 644, 11 p., jun. 2021. DOI: 10.3390/antibiotics10060644. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8229259/>. Acesso em: 14 jul. 2023.

MORAIS, M.; G.; B. **Sistemas de produção de leite: revisão bibliográfica**. 2021.37 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia Agrônômica) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal, 2021.

MORADI, M.; OMER, A. K.; RAZAVI, R.; VALIPOUR, S.; GUIMARÃES, J. T. The relationship between milk somatic cell count and cheese production, quality and safety: A review. **International Dairy Journal**, v. 113, fev. 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958694620302545>. Acesso em: 31 jul. 2023.

MURPHY, S. C.; MARTIN, N. H.; BARBANO, D. M.; WIEDMANN, M. Influence of raw milk quality on processed dairy products: How do raw milk quality test results relate to product quality and yield?. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 99, n. 12, p. 10128-10149, dez. 2016. DOI: 10.3168/jds.2016-11172. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030216306403>. Acesso em: 31 jul. 2023.

NOBREGA, D. B.; BUCK, J.; BARKEMA, H. W. Antimicrobial resistance in non-aureus staphylococci isolated from milk is associated with systemic but not intramammary administration of antimicrobials in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 101, n. 8, p. 7425-7436, ago. 2018. DOI: 10.3168/jds.2018-14540. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29729922/>. Acesso em: 17 jan. 2023.

NOBREGA, D. B.; CALARGA, A. P.; NASCIMENTO, L. C.; VASCONCELOS, C. G. C.; LIMA, E. M.; LANGONI, H.; BROCCCHI, M. Molecular characterization of antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolated from Brazilian dairy herds. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 104, n. 6, p. 7210-7224, jun. 2021. DOI: 10.3168/jds.2020-19569. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030221004471?via%3Dihub>. Acesso em: 10 jul. 2023.

OLIVEIRA, C. M. C.; SOUSA, M. G. S.; SILVA, N. S.; MENDONÇA, C. L.; SILVEIRA, J. A. S.; OAIGEN, R. P.; ANDRADE, S. J. T.; BARBOSA, J. D. Prevalência e etiologia da mastite bovina na bacia leiteira de Rondon do Pará, estado do Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 2, p. 104-110, fev. 2011. DOI: 10.1590/S0100-736X2011000200002. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/pvb/a/JT4Y54pzCQNrTDhQvwjV35F/?lang=pt>. Acesso em: 18 jan. 2023.

OLIVEIRA, R.; PINHO, E.; ALMEIDA, G.; AZEVEDO, N. F.; ALMEIDA, C. Prevalence and diversity of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal

enterotoxins in raw milk from Northern Portugal. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 13, artigo 846653, 12 p., mar. 2022. DOI: 10.3389/fmicb.2022.846653. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.846653/full>. Acesso em: 18 jan. 2023.

OLIVER, S. P.; MURINDA, S. E. Antimicrobial resistance of mastitis pathogens. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Amsterdam, v. 28, n. 2, p. 165–185, jul. 2012. DOI: 10.1016/j.cvfa.2012.03.005. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0749072012000229?via%3Dihub>. Acesso em: 7 fev. 2023.

PERRIG, M. S.; AMBROGGIO, M. B.; BUZZOLA, F. R.; MARCIPAR, I. S.; CALVINHO, L. F.; VEAUTE, C. M.; BARBAGELATA, M. S. Genotyping and study of the pauA and sua genes of *Streptococcus uberis* isolates from bovine mastitis. **Revista Argentina de Microbiología**, Amsterdam, v. 47, n. 4, p. 282-294, out./dez. 2015. DOI: 10.1016/j.ram.2015.06.007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0325754115000942>. Acesso em: 18 jul. 2023.

PINTO, T. C. A.; COSTA, N. S.; SOUZA, A. R. V.; SILVA, L. G.; CORRÊA, A. B. A.; FERNANDES, F. G.; OLIVEIRA, I. C. M.; MATTOS, M. C.; ROSADO, A. S.; BENCHETRIT, L. C. Distribution of serotypes and evaluation of antimicrobial susceptibility among human and bovine *Streptococcus agalactiae* strains isolated in Brazil between 1980 and 2006. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 17, n. 2, p. 131-136, abr. 2013. DOI: 10.1016/j.bjid.2012.09.006. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjid/a/V9rFxxgZLNnFhJNm4qF4KT7h/abstract/?lang=en>. Acesso em: 27 jan. 2023.

QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B. K.; CARTER, G. R. **Clinical veterinary microbiology**. London: Wolfe/Mosby, 1993. 684 p.

RAHMEH, R.; AKBAR, A.; ALONAIZI, T.; KISHK, M.; SHAJAN, A.; AKBAR, B. Characterization and application of antimicrobials produced by *Enterococcus faecium* S6 isolated from raw camel milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 103, n. 12, p. 11106-11115, dez. 2020. DOI: 10.3168/jds.2020-18871. Disponível em: [https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(20\)30756-6/fulltext](https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(20)30756-6/fulltext). Acesso em: 14 jul. 2023.

RALL, V. L. M.; MIRANDA, E. S.; CASTILHO, I. G.; CAMARGO, C. H.; LANGONI, H.; GUIMARÃES, F. F.; ARAÚJO JUNIOR, J. P.; FERNANDES JUNIOR, A. Diversity of *Staphylococcus* species and prevalence of enterotoxin genes isolated from milk of healthy cows and cows with subclinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 97, n. 2, p. 829-837, fev. 2014. DOI: 10.3168/jds.2013-7226. Disponível em: [https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(13\)00857-6/fulltext](https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(13)00857-6/fulltext). Acesso em: 10 jul. 2023.

REINOSO, E. B. Bovine mastitis caused by *Streptococcus uberis*: virulence factors and biofilm. **Journal of Microbial and Biochemical Technology**, Uxbridge, v. 9, n. 5, p. 237-243, dez. 2017. DOI: 10.4172/1948-5948.1000371, Disponível em: <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/66232?show=full>. Acesso em: 18 jul. 2023.

REYES, J.; CHAFFER, M.; SANCHEZ, J.; TORRES, G.; MACIAS, D.; JARAMILLO, M.; DUQUE, P. C.; CEBALLOS, A.; KEEFE, C. P. Evaluation of the efficacy of intramuscular versus intramammary treatment of subclinical *Streptococcus agalactiae* mastitis in dairy cows in Colombia. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 98, n. 8, p. 5294-5303, ago. 2015. DOI: 10.3168/jds.2014-9199. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26074229/>. Acesso em: 20 jan. 2023.

RIBEIRO, E. A.; TOMICH, G. M.; COSTA, B. A.; OLIVEIRA, R. A.; JESUS, L. K. B. *Streptococcus agalactiae*: colonização de gestantes de alto risco em um hospital regional da Amazônia brasileira e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v.12, jun. 2021. DOI: /10.5123/s2176-6223202100542. Disponível em: http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2176-62232021000100013. Acesso em: 26 ago. 2023.

ROBLES, B. F.; NÓBREGA, D. B.; GUIMARÃES, F. F.; WANDERLEY, G. G.; LANGONI, H. Beta-lactamase detection in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* isolated from bovine mastitis. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 34, n. 4, p. 325–328, abr. 2014. DOI: 10.1590/S0100-736X2014000400004. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/pvb/a/yf6wJmvmCpJk9KGZPTPyJHC/?lang=en#>. Acesso em: 14 jul. 2023.

ROCHA, D. T.; CARVALHO, G. R.; RESENDE, J. C. **Cadeia produtiva do leite no Brasil**: produção primária. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, ago. 2020. 15 p. (Circular Técnica, 123). Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/215880/1/CT-123.pdf>. Acesso em: 20 jan. 2023.

ROMERO, J.; BENAVIDES, E.; MEZA, C. Assessing Financial Impacts of Subclinical Mastitis on Colombian Dairy Farms. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 5, nov. 2018. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2018.00273/full>. Acesso em: 01 ago. 2023.

ROSARIO, A. I. L.; CASTRO, V. S.; SANTOS, L. F.; LISBOA, R. C.; VALLIM, D. C.; SILVA, M. C. A.; FIGUEIREDO, E. E. S.; CONTE-JUNIOR, C. A.; COSTA, M. P. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from pasteurized dairy products from Bahia, Brazil. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 104, n. 6, p. 6535-6547, jun. 2021. DOI: 10.3168/jds.2020-19511. Disponível em:

[https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(21\)00429-X/fulltext](https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(21)00429-X/fulltext). Acesso em: 27 jan. 2023.

ROWBOTHAM, R. F.; RUEGG, P. L. Bacterial counts on teat skin and in new sand, recycled sand, and recycled manure solids used as bedding in freestalls. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 99, n. 8, p. 6594-6608, ago. 2016. DOI: 10.3168/jds.2015-10674. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27265163/>. Acesso em: 17 jan. 2023.

RÓŻAŃSKA, H.; LEWTAK-PILAT, A.; KUBAJKA, M.; WEINER, M. Occurrence of enterococci in mastitic cow's milk and their antimicrobial resistance. **Journal of Veterinary Research**, Warsaw, v. 63, n. 1, p. 93-97, mar. 2019. DOI: 10.2478/jvetres-2019-0014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6458559/>. Acesso em: 28 jan. 2023.

RUEGG, P. L. Making antibiotic treatment decisions for clinical mastitis. **Veterinary Clinics North America: Food Animal Practice**, Amsterdam, v. 34, n. 3, p. 413-425, nov. 2018. DOI: 10.1016/j.cvfa.2018.06.002. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0749072018300318?via%3Dihub>. Acesso em: 07 fev. 2023.

SALINA, A.; JUNQUEIRA, N. B.; LATOSINSKI, G. S.; OLIVEIRA, G. C.; JOAQUIM, S. F.; PARDO, R. B.; LANGONI, H. Importância da diferenciação dos *Streptococcus agalactiae* e não *agalactiae* nas mastites. **Veterinária e Zootecnia**, Botucatu, v. 24, n. 1, p. 209-215, mar. 2017. Disponível em: <https://rvz.emnuvens.com.br/rvz/issue/view/13/22>. Acesso em: 14 jul. 2023.

SANTOS, E. M. P.; BRITO, M. A. V. P.; LANGE, C.; BRITO, J. R. F.; CERQUEIRA, M. M. O. P. *Streptococcus* e gêneros relacionados como agentes etiológicos de mastite bovina. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 35, n. 1, p. 17-27, mar. 2007. DOI: 10.22456/1679-9216.15805. Disponível em: <https://seer.ufrgs.br/ActaScientiaeVeterinariae/article/view/15805>. Acesso em: 18 jan. 2023.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. **Controle da mastite e qualidade do leite: desafios e soluções**. Pirassununga: Edição dos autores, 2019. 301 p.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. Principais agentes causadores da mastite. In: SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. **Estratégia para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite**. Barueri: Manole, 2007. Cap. 3, p. 24-37.

SILVA, D. B. C. **Uso de antimicrobianos em propriedades leiteiras do Estado de Goiás**. 2018. 52 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2018. Disponível em: https://files.cercomp.ufg.br/weby/up/67/o/Damila_Batista_Caetano_Silva.pdf. Acesso em: 26 ago. 2023.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; GOMES, R. A. R.; OKAZAKI, M. M. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 6. ed. São Paulo: Blucher, 2017. 602 p.

SOUMYA, K. R.; PHILIP, S.; SUGATHAN, S.; MATHEW, J.; RADHAKRISHNAN, E. K. Virulence factors associated with Coagulase Negative Staphylococci isolated from human infections. **3 Biotech**, Heidelberg, v. 7, n. 2, artigo 140, 10 p., jun. 2017. DOI: 10.1007/s13205-017-0753-2. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13205-017-0753-2>. Acesso em: 28 jan. 2023.

STEMPLER, A.; MUÑOZ, A. J.; LUCAS, M. F. *Streptococcus uberis* y su importancia como agente causal de la mastitis bovina. **Revista Veterinaria**, Corrientes, v. 33, n. 2, p.192-201, abr. 2022. DOI: 10.30972/vet.3326181. Disponível em: <https://revistas.unne.edu.ar/index.php/vet/article/view/6181>. Acesso em: 18 jul. 2023.

SUKHNANAND, S.; DOGAN, B.; AYODELE, M. O.; ZADOKS, R. N.; GRAVER, M. P. J.; DUMAS, N. B.; SCHUKKEN, Y. H.; BOOR, K. J.; WIEDMANN, M. Molecular subtyping and characterization of bovine and human *Streptococcus agalactiae* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 43, n. 3, p. 1177-1186, mar. 2005. DOI: 10.1128/jcm.43.3.1177-1186.2005. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/JCM.43.3.1177-1186.2005>. Acesso em: 28 jan. 2023.

THOMAS, L.; COOK, L. Two-component signal transduction systems in the human pathogen, *Streptococcus agalactiae*. **Infection and Immunity**, Washington, DC, v. 88, n. 7, artigo e000931-19, 16 p., jun. 2020. DOI: 10.1128/iai.00931-19. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/iai.00931-19>. Acesso em: 28 jan. 2023.

TOMAZI, T.; COURA, F. M.; GONÇALVES, J. L.; HEINEMANN, M. B.; SANTOS, M. V. Antimicrobial susceptibility patterns of *Escherichia coli* phylogenetic groups isolated from bovine clinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 101, n. 10, p. 9406-9418, out., 2018. DOI: 10.3168/jds.2018-14485. Disponível em: [https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(18\)30664-7/fulltext](https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(18)30664-7/fulltext). Acesso em: 10 jul. 2023.

TOMAZI, T.; SANTOS, M. V. Antimicrobial use for treatment of clinical mastitis in dairy herds from Brazil and its association with herd-level descriptors. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 176, artigo 104937, 8 p., mar. 2020. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2020.104937. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167587719302594?via%3Dihub>. Acesso em: 14 jul. 2023.

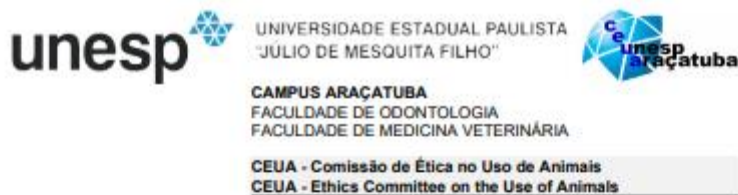
UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE – USDA. **Brazil: Dairy and Products Annual**, Brasília, 2022. Disponível em: <https://www.fas.usda.gov/data/brazil-dairy-and-products-annual-9>. Acesso em: 9 ago. 2023.

WATTS, J. L.; SHRYOCK, T. R.; APLEY, M.; BADE, D. J.; BROWN, S. D.; GRAY, J. T.; HEINE, H.; HUNTER, R. P.; MEVIUS, D. J.; PAPICH, M. G.; SILLEY, P.; ZURENKO, G. E. **Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals:** approved standard. 3. ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2008. 99 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Egypt national action plan for antimicrobial resistance:** (2018-2022). Geneva, 2018. Disponível em: <https://www.who.int/publications/m/item/egypt-national-action-plan-for-antimicrobial-resistance>. Acesso em: 1 fev. 2023.

ZADOKS, R. N.; MIDDLETON, J. R.; MCDOUGALL, S.; KATHOLM, J.; SCHUKKEN, Y. H. Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and comparative relevance to humans. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, New York, v. 16, n. 4, p. 357-372, dez. 2011. DOI: 10.1007/s10911-011-9236-y. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21968538/>. Acesso em: 17 jan. 2023.

ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **"Características dos agentes etiológicos causadores de mastite: Estudo de caso em laticínios no Centro Oeste Paulista"**, Processo FOA nº 0546-2022, sob responsabilidade de Elisa Helena Giglio Ponsano apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 30 de Novembro de 2022.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 07 de Julho de 2023.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 07 de Agosto de 2023.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Characteristics of etiological agents causing mastitis: Case study in dairy products in Paulista Central West"**, Protocol FOA nº 0546-2022, under the supervision of Elisa Helena Giglio Ponsano presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on November 30, 2022.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: July 07, 2023.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: August 07, 2023.

Prof. Dr. Fellippo Ramos Verri
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator