

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE RESIDÊNCIA EM ÁREA PROFISSIONAL DA SAÚDE
- MEDICINA VETERINÁRIA/ MEDICINA VETERINÁRIA
PREVENTIVA**

**RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA
DE *Staphylococcus* spp. ISOLADOS DE VACAS
LEITEIRAS DA REGIÃO SUL DO BRASIL**

MONOGRAFIA DE PROGRAMA DE RESIDÊNCIA

Ananda Paula Kowalski

**Santa Maria, RS, Brasil
2013**

**RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE *Staphylococcus* spp.
ISOLADOS DE VACAS LEITEIRAS DA REGIÃO SUL DO
BRASIL**

por

Ananda Paula Kowalski

Monografia apresentada ao Programa de Residência em Área Profissional da
Saúde - Medicina Veterinária/ Medicina Veterinária Preventiva da
Universidade Federal de Santa Maria
(UFSM, RS) como requisito parcial para obtenção do grau de especialista em
Medicina Veterinária Preventiva

**Orientadora: Agueda Castagna de Vargas, Dr.
Co-orientadora: Sônia de Avila Botton, Dr.**

Santa Maria, RS, Brasil

2013

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciência da Saúde
Centro de Ciências Rurais
Programa de Residência em Área Profissional da Saúde – Medicina
Veterinária/ Medicina Veterinária Preventiva
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Monografia de Programa de Residência

**RESISTÊNCIA ANTMICROBIANA DE *Staphylococcus* spp. ISOLADOS
DE VACAS LEITEIRAS DA REGIÃO SUL DO BRASIL**

elaborada por
Ananda Paula Kowalski

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Especialista em Medicina Veterinária Preventiva

Comissão Examinadora:

Agueda Castagna de Vargas, Dr.
(Presidente/Orientadora)

Letícia Trevisan Gressler, Ms. (UFSM)

Régis Adriel Zanette, Ms. (UFRGS)

Santa Maria, 12 de julho de 2013.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me dar saúde, coragem e amparo.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Residência em Área Profissional da Saúde – Medicina Veterinária/ Medicina Veterinária Preventiva pela oportunidade de realização da Residência.

À Professora Agueda P. C. Vargas pelo incentivo e entusiasmo durante a Residência; pela atenção e orientação no trabalho de conclusão e por despertar em mim o gosto pela bacteriologia.

Aos Professores Luis Antonio Sangioni e Sônia de Avila Botton por acreditarem no Programa de Residência e não medirem esforços para que tivéssemos uma formação de qualidade. À vocês, meu especial obrigada.

Aos meus pais, Dulcimar e Carolina, por me ensinarem os valores de uma vida digna.

Obrigada pelo amor e por confiarem nas minhas escolhas.

Ao meu irmão Bruno, pela torcida.

Ao Welden Panziera, pelo amor, dedicação e compreensão sem medidas. Obrigada também pelo exemplo de determinação e pela alegria de ter você ao meu lado.

Aos amigos Jonas F. Maciel, Camila Tochetto, Candice Schmidt e Gabriele Serafini pelo incentivo que veio na hora certa.

À Francine Cenzi de Ré e sua família, pela amizade sincera e carinho.

Aos Professores Fernanda S. F. Vogel, Eduardo F. Flores e Rudi Weiblen e suas equipes do Ladopar e Setor de Virologia por todos os ensinamentos e ótima acolhida durante o período que estive em seus laboratórios.

A todos os colegas e amigos do Laboratório de Bacteriologia – LABAC, pelos ensinamentos, agradável ambiente de trabalho e colaboração durante todo o período da Residência.

Ao pós graduandos Denis Spricigo e Cláudia Balzan pelas opiniões e sugestões na escrita do trabalho.

À Grazielle Maboni, Júlia Spindola, Ariane Foletto e ao Guerino Bandeira Jr. pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

À Professora Luciana Pötter, pelo suprimento com as análises estatísticas e atenção durante todo o trabalho.

A todas as pessoas que de alguma forma colaboraram e me incentivaram.

Muito Obrigada!

RESUMO

Monografia de Programa de Residência
Programa de Residência em Área Profissional da Saúde - Medicina Veterinária/
Medicina Veterinária Preventiva
Universidade Federal de Santa Maria

RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE *Staphylococcus* spp. ISOLADOS DE VACAS LEITEIRAS DA REGIÃO SUL DO BRASIL

AUTORA: Ananda Paula Kowalski
ORIENTADORA: Agueda Castagna de Vargas
CO-ORIENTADORA: Sônia de Avila Botton
Santa Maria, 12 de julho de 2013.

A mastite bovina é a enfermidade infecto-contagiosa de maior importância na exploração leiteira devido a sua alta ocorrência e às perdas econômicas, além do potencial risco à saúde pública. A mesma caracteriza-se por um processo inflamatório da glândula mamária cuja apresentação pode variar conforme a etiologia e o grau de severidade da doença, sendo a forma subclínica, de maior ocorrência em rebanhos. Infecções intramamárias de origem bacteriana representam a principal causa da doença, sendo que bactérias do gênero *Staphylococcus* respondem pela maioria dos casos subclínicos. O tratamento da enfermidade é predominantemente baseado na utilização de antimicrobianos; no entanto, a resistência destes patógenos aos fármacos comumente utilizados na rotina clínica tem sido um grande entrave no sucesso das terapias empregadas. Este trabalho objetivou analisar o perfil de resistência antimicrobiana de 2.430 isolados de *Staphylococcus* spp. oriundos de amostras de leite de vacas com mastite durante o período de 1992 a 2011, além de verificar possíveis tendências ou mudanças no comportamento destes patógenos frente aos principais antimicrobianos utilizados no tratamento da enfermidade ao longo do tempo. Do total, 729 isolados (30%) mostraram-se sensíveis a todos os antimicrobianos testados. De maneira geral, ocorreu uma redução do percentual de resistência da primeira década do período estudado (29,2%) em relação à segunda (17,1%) ($P < 0,0004$). As maiores taxas de resistência ($P < 0,0001$) foram observadas para a classe dos betalactâmicos (34,3%), com exceção da cefalexina (6,9%), e das tetraciclinas (28%). Frente aos demais fármacos (norfloxacina, sulfazotrim, gentamicina e neomicina) os isolados apresentaram médias de resistência entre 7,6% e 15,7%. A partir da análise de regressão da resistência dos isolados frente aos antimicrobianos, em função dos 20 anos, observou-se redução da resistência para penicilina e ampicilina ao longo do período. Todavia para a oxacilina e a neomicina houve um decréscimo da resistência dos microorganismos testados durante a primeira década, entretanto ocorreu um aumento no segundo período. Em relação ao sulfazotrim, foi verificada uma tendência à diminuição da resistência dos isolados ao passo que, para os demais antimicrobianos, nenhum comportamento foi destacado. Os resultados não indicaram tendência de aumento da resistência dos isolados de *Staphylococcus* spp. oriundos de casos de mastite bovina para a maioria dos antimicrobianos testados, reforçando a importância do monitoramento dos padrões de resistência destes patógenos, a fim de que estes fármacos sejam preservados garantindo uma reserva terapêutica.

Palavras-chave: mastite, bovinos, suscetibilidade *in vitro*, tratamento intramamário, sanidade

ABSTRACT

Monografia de Programa de Residência
Programa de Residência em Área Profissional da Saúde - Medicina Veterinária/
Medicina Veterinária Preventiva
Universidade Federal de Santa Maria

ANTIMICROBIAL RESISTANCE OF *Staphylococcus* spp. ISOLATES FROM DAIRY CATTLE IN SOUTHERN BRAZIL

AUTHOR: Ananda Paula Kowalski
ADVISER: Agueda Castagna de Vargas
CO-ADVISER: Sônia de Avila Botton
Santa Maria, June 28th, 2013.

The bovine mastitis is an infectious disease of major importance in the dairy farm due to its high occurrence and the economic losses, in addition to the potential risk to public health. Mastitis is characterized by an inflammatory process of the mammary gland and the clinical presentation may vary according to the etiology and severity of the disease, besides the subclinical form shows great occurrence in herds. Intramammary bacterial infections are the major cause of the mastitis, and bacteria belonging to the genus *Staphylococcus* are involved as main causative agent of subclinical mastitis. Treatment of the disease is predominantly based on the use of antimicrobials; however, the resistance of these pathogens to the drugs commonly used in clinical practice has been a major obstacle to the success of the therapy. This study aimed to analyze the profile of antimicrobial resistance of 2,430 *Staphylococcus* spp. isolates from milk samples of cows with mastitis during the period 1992-2011. Additionally, it was also observed possible tendency or changes in the behavior of these pathogens against the major drugs used in the treatment of the disease in these two decades. Of the total, 729 *Staphylococcus* spp. isolates (30%) were susceptible to all antimicrobials tested. In general, there was a reduction in the percentage of resistance during the first decade analyzed (29.2%) compared to the second period (17.1%) ($P < 0.0004$). The highest rates of resistance ($P < 0.0001$) were observed for the class of betalactamics (34.3%), except for cephalixin (6.9%), and tetracyclines (28%). In regarding to the other drugs (norfloxacin, sulfazotrim, gentamicin and neomycin) *Staphylococcus* spp. isolates showed on average of resistance between 7.6% and 15.7%. In the regression analysis of isolates against antimicrobials during 20 years, it was possible to verify a reduction of resistance to penicillin and ampicillin. However, the micro-organisms tested demonstrated a decrease in the resistance against oxacillin and neomycin during the first decade, followed by an increase in the second period. Regarding to sulfazotrim, there was a tendency to decrease the resistance while to the other antimicrobials, no tendency was highlighted. The results indicated no tendency of increasing resistance of *Staphylococcus* spp. isolates from bovine mastitis for the most antimicrobial tested, reinforcing the importance of monitoring the resistance patterns of these pathogens, in order to preserve these drugs as a therapeutic reserve.

Key words: mastitis, bovine, *in vitro* susceptibility, intramammary treatment, sanity

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 (QUADRO 1) - Perfil de resistência antimicrobiana de isolados de *Staphylococcus* spp. oriundos de amostras de leite bovino (1992-2011)..... 39

TABELA 2 (QUADRO 2) - Resistência dos antimicrobianos modelada para os anos de 1992 a 2011 (coeficiente de determinação (%) e probabilidade dos efeitos linear, quadrático e cúbico)..... 40

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Evolução da resistência de *Staphylococcus* spp. isolados de leite bovino frente aos antimicrobianos testados no período de 1992 a 2011. (A) Betalactâmicos (oxacilina – regressão quadrática; penicilina e ampicilina – regressão linear; cefalexina – sem regressão). (B) Norfloxacin – sem regressão. (C) Tetraciclina – sem regressão. (D) Sulfazotrim – tendência de regressão linear. (E) Aminoglicosídeos (neomicina – regressão quadrática; gentamicina- sem regressão)..... 41

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
°C	Graus Celsius
CCS	Contagem de Células Somáticas
CMT	<i>California Mastitis Test</i>
CS	Células Somáticas
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
h	Hora
IN	Instrução Normativa
Kg	Quilograma
MRSA	<i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i> (<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina)
mL	Mililitro
mm	Milímetro
pH	Potencial hidrogeniônico
n	Número
Nº	Número
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
ONPG	o-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo
SCN	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa
TSST-1	Toxina da síndrome do choque tóxico
UI	Unidades Internacionais
µg	Micrograma
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Mastite bovina	14
2.2 Etiologia	15
2.2.1 <i>Staphylococcus</i> spp.	16
2.3 Detecção e diagnóstico da mastite	17
2.3.1 <i>California Mastitis Test</i>	18
2.3.2 Contagem de Células Somáticas	18
2.3.3 Cultura microbiológica	19
2.4 Tratamento e Controle	20
2.5 Resistência aos antimicrobianos	22
3 CAPÍTULO 1 Perfil temporal de resistência antimicrobiana de <i>Staphylococcus</i> spp. isolados de casos de mastite bovina durante 20 anos (1992 – 2011)	25
ABSTRACT	26
RESUMO	27
INTRODUÇÃO	27
MATERIAL E MÉTODOS	29
RESULTADOS	30
DISCUSSÃO	31
CONCLUSÃO	34

REFERÊNCIAS	35
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	42
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

1 INTRODUÇÃO

A bovinocultura leiteira representa uma das principais atividades do agronegócio brasileiro, dada sua importância econômica e social (VILELA et al., 2002). O Brasil possui o segundo maior rebanho leiteiro do mundo e se consolidou como o quinto maior produtor mundial no ano de 2010, com a produção de 31,67 bilhões de litros de leite (BRASIL, 2010). No entanto, o setor apresenta uma grande heterogeneidade e baixa produtividade, com a maior parte das vacas ordenhadas produzindo menos de 4 kg de leite/vaca/dia (ZOCCAL & STOCK, 2011).

Fatores relacionados à sanidade do rebanho são limitantes para a exploração leiteira (VIEIRA et al., 1998), sendo a mastite considerada a enfermidade infecto-contagiosa de maior impacto nos rebanhos leiteiros em todo o mundo (SÁ et al., 2004; LI et al., 2009). A doença, caracterizada por um processo inflamatório da glândula mamária (RIBEIRO et al., 2003) é responsável por grandes prejuízos na produção de leite (SARAN & CHAFFER, 2000; DUQUE et al., 2005). As principais consequências relacionadas à mastite são as alterações físico-químicas do leite que resultam na diminuição da produção e qualidade e baixo rendimento na elaboração de derivados (HILLERTON & BERRY, 2005; MUNGATANA et al., 2011; OLIVER & MURINDA, 2012), além dos custos com tratamento, prejuízos decorrentes do descarte precoce do animal e condenação do leite na usina (FREITAS et al., 2005; CUNHA et al., 2006).

Embora estejam relacionadas a aspectos multifatoriais (ANNAYA-LOPEZ et al., 2006), as infecções intramamárias de origem bacteriana representam a principal causa de mastite bovina (OLIVER et al., 2011). Entre os agentes etiológicos, o gênero *Staphylococcus* compreende o principal grupo envolvido em casos de mastite subclínica (TAPONEN & PYÖRÄLÄ, 2009), sendo essa, considerada a forma de apresentação de maior impacto econômico (CARVALHO et al., 2007).

Dentre as espécies, *Staphylococcus aureus* destaca-se por ser considerado a mais patogênica. Este micro-organismo é portador de diversos fatores de virulência que, além de contribuírem para sua persistência no tecido mamário (FONSECA & SANTOS, 2000; CARVALHO et al., 2007), representam potencial risco à saúde pública, uma vez que é capaz de produzir toxinas termoestáveis (VIÇOSA et al., 2010).

A terapia antimicrobiana ainda é uma das principais ferramentas no controle da mastite (ERSKINE et al., 2003; HILLERTON & BERRY, 2005; OLIVER et al., 2011).

Entretanto, diversos patógenos, em especial, *S. aureus* são referidos pela resistência aos vários antimicrobianos comumente utilizados no tratamento da mastite bovina (FREITAS et al., 2005; KUMAR et al., 2009; MEDEIROS et al. 2009a). Além disso, espécies de *Staphylococcus* coagulase negativos (SCN) vêm recebendo atenção devido à emergência de linhagens multirresistentes (NEVES et al., 2007; TAPONEN & PYÖRÄLÄ, 2009).

A pressão de seleção exercida pelo uso frequente e indiscriminado de antimicrobianos ou aplicações sub-terapêuticas, tanto para o tratamento como para a profilaxia de doenças bacterianas, predispõe ao desenvolvimento do fenômeno de resistência entre os microorganismos (BRITO et al., 2001; CUNHA et al., 2006). Além disso, a falta de conhecimento do perfil de suscetibilidade do agente causador em relação aos antimicrobianos disponíveis, em muitos casos, contribui para o insucesso do tratamento (MOTA et al., 2005). Desta forma, os resultados de testes de suscetibilidade antimicrobiana *in vitro* têm sido úteis na seleção da terapia mais adequada, aumentando a probabilidade de cura (GUARDABASSI et al., 2010), além de possibilitar o monitoramento de padrões de resistência antimicrobiana dos patógenos (ERSKINE et al., 2002; MAKOVEC & RUEGG, 2003).

Diversos estudos de diferentes regiões do Brasil têm demonstrado a suscetibilidade antimicrobiana de agentes causadores de mastite em vacas leiteiras, incluindo *Staphylococcus* spp., para os quais observa-se diferentes perfis (FREITAS et al., 2005; CUNHA et al., 2006, MACHADO et al., 2008; MEDEIROS et al., 2009a). Entretanto, no país há uma escassez de estudos demonstrando, a longo prazo, a dinâmica nos padrões de resistência antimicrobiana destes patógenos em relação aos antimicrobianos comumente utilizados na rotina clínica.

O presente estudo objetivou analisar o perfil de resistência de isolados de *Staphylococcus* spp. oriundos de amostras de leite de vacas com mastite, obtidos da rotina de diagnóstico do Laboratório de Bacteriologia (LABAC) da Universidade Federal de Santa Maria, no período de 20 anos. Além de verificar o comportamento de resistência destes patógenos frente aos principais antimicrobianos utilizados no tratamento de mastite bovina ao longo do período.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Mastite bovina

A mastite caracteriza-se por um processo inflamatório da glândula mamária acompanhado por danos ao epitélio glandular e redução de secreção de leite (HOLANDA Jr. et al., 2005). Economicamente, é considerada a doença de maior importância na cadeia produtiva do leite, apresentando alta prevalência em rebanhos leiteiros (DUQUE et al., 2005).

Os prejuízos decorrem especialmente das alterações provocadas no volume e qualidade do leite produzido, refletindo em baixa estabilidade e baixo rendimento industrial (CARVALHO et al., 2007; SPANAMBERG et al., 2009; MUNGATANA et al., 2011). As perdas econômicas incluem ainda o gasto com tratamentos, serviços médico-veterinários, descarte do leite e de animais cronicamente afetados e, em alguns casos, morte do animal (RADOSTITS et al., 2002; RIBEIRO et al., 2003). Além disso, esta enfermidade representa um importante risco à saúde pública devido à presença de enterotoxinas termoestáveis no leite, produzidas por alguns patógenos e a possibilidade de resíduos antimicrobianos no leite decorrente de tratamentos (FAGUNDES & OLIVEIRA, 2004; OLIVEIRA et al., 2011).

De acordo com a forma de manifestação, a mastite pode ser classificada em clínica ou subclínica (FONSECA & SANTOS, 2000). A forma clínica caracteriza-se pela visualização dos sinais clínicos do processo inflamatório, como edema, aumento da temperatura, hiperemia e sensibilidade da glândula mamária. No leite observa-se presença de grumos e filamentos, pus e, algumas vezes, sangue ou outras alterações nas características do leite. O mesmo torna-se mais aquoso e sofre descoloração (FONSECA & SANTOS, 2000; NASCIF Jr., 2001). A inflamação persistente ou crônica pode levar à destruição do tecido secretor e à sua substituição por tecido não produtivo (CARLTON & MCGAVIN, 1998).

Entretanto, as maiores perdas econômicas devem-se a forma subclínica da doença, sendo essa a de maior ocorrência entre os rebanhos leiteiros (PEDRINI & MARGATHO, 2003). Nessa manifestação, ao contrário da forma clínica, não ocorrem mudanças visíveis no úbere ou no aspecto do leite, o que dificulta o diagnóstico e permite que a doença se mantenha por longos períodos no rebanho (FONSECA & SANTOS, 2000). No entanto, são verificadas acentuadas alterações na composição do leite, como aumento na contagem de células

somáticas (CCS), aumento nos teores de proteínas séricas, cloro e sódio e redução nos teores de caseína, lactose, gordura e cálcio (DIAS, 2007), resultando dessa forma, em menor rendimento na produção de leite e seus derivados (MUNGATANA et al., 2011; OLIVER & MURINDA, 2012). Estima-se uma redução de 25% da produção de leite por quarto mamário afetado em vacas com mastite subclínica (REIS et al., 2003).

2.2 Etiologia

A mastite pode ter diferentes origens: infecciosa, traumática, térmica ou ainda ser consequência de problemas metabólicos (HOLANDA Jr. et al., 2005). Entretanto, a origem infecciosa é a de maior importância, sendo as bactérias as maiores indutoras deste processo inflamatório, embora fungos, leveduras possam estar etiologicamente envolvidos (LANGONI, 1999; SPANAMBERG, et al., 2009).

Em relação à origem do agente etiológico e forma de contaminação, as mastites podem ser classificadas em contagiosas e ambientais (FONSECA & SANTOS, 2000). Entre os agentes considerados contagiosos, *S. aureus*, *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN), *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium bovis* e *Trueperella pyogenes* respondem por cerca de 80% dos casos desta forma de mastite (PINTO, 2009). A superfície da pele dos tetos e o interior da glândula mamária constituem o habitat preferencial desses patógenos, sendo portanto, o momento da ordenha, a principal forma de transmissão da mastite contagiosa (LANGONI, 1999).

A mastite ambiental, por sua vez, é causada por micro-organismos adaptados à sobrevivência no ambiente da ordenha ou do curral, presentes no ar, água e em locais com acúmulo de esterco, urina, barro e camas orgânicas (MÜLLER, 2002). Dessa forma, a maioria das novas infecções ocorre no período entre ordenhas (FONSECA & SANTOS, 2000). *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Proteus sp.* são os patógenos mais frequentemente isolados em casos de mastite ambiental (PEDRINI & MARGATHO, 2003). Com menor participação, *Nocardia spp.*, fungos e algas também estão incluídos entre os agentes ambientais (RADOSTITS et al., 2002).

2.2.1 *Staphylococcus* spp.

O gênero *Staphylococcus* compreende bactérias Gram-positivas, aeróbias ou microaerófilas com morfologia de coco. Em cultura em placas de ágar sangue ovino a 5% são visualizadas colônias de cerca de 1 a 3 mm de diâmetro, de coloração esbranquiçada ou amarela, convexas, de superfície livre, bordas circulares e brilhantes com diferentes padrões de hemólise, os quais variam conforme a capacidade de produção de hemolisinas das espécies (QUINN et al., 1994).

A produção de catalase, enzima que permite que essas bactérias degradem peróxido de hidrogênio é uma importante ferramenta de diagnóstico desse gênero. As espécies são divididas em dois grandes grupos, conforme a capacidade de produção de coagulase. A mesma possibilita a transformação de fibrinogênio em fibrina ao redor da célula bacteriana, dificultando ação dos mecanismos de defesa do organismo e está correlacionada com a patogenicidade do agente (QUINN et al., 1994; KONEMAN, et al., 2001; MEDEIROS, 2009b).

O mesmo representa o grupo de agentes isolados com maior frequência em casos de mastite bovina em todas as espécies animais em todo o mundo (LI et al. 2009). Espécies desse gênero são amplamente distribuídas na natureza e fazem parte da microbiota normal da pele e mucosa de mamíferos, podendo, por vezes, causar infecções patogênicas (GIAMMARINARO et al., 2005).

Dentre as espécies classificadas como *Staphylococcus* coagulase positiva, *S. aureus* é o mais patogênico (FONSECA & SANTOS, 2000; CARVALHO et al., 2007). A espécie possui vários fatores de virulência que contribuem para sua persistência no tecido mamário e para a patogênese da mastite. De maneira geral, esses fatores são relacionados à evasão da bactéria, danos ao tecido do hospedeiro ou indução e modulação da resposta inflamatória (QUINN et al., 1994; GYLES et al., 2010). Além disso, a produção de enterotoxinas estafilocócicas e da toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1) caracterizam esse patógeno como um potencial risco à saúde pública (DRESCHER et al., 2010; VIÇOSA et al., 2010).

S. aureus tem a importante característica de se instalar em camadas profundas da glândula mamária, onde há formação de tecido fibroso no foco de infecção. Isso impede a

penetração de antimicrobianos e reflete na forma de infecção, que é de longa duração, tendendo a cronicidade e com baixíssima taxa de cura (FONSECA & SANTOS, 2000). Normalmente a mastite por *S. aureus* é subclínica, porém, pode manifestar-se como uma mastite gangrenosa superaguda que acomete principalmente novilhas de primeira cria, em início de lactação, o que resulta na diminuição de tecido mamário. Isso ocorre pela produção de alfa toxina, responsável por danos nos vasos sanguíneos, levando a necrose coagulativa isquêmica do tecido adjacente (TIMONEY et al., 1988).

Embora *S. aureus* seja considerado o principal patógeno envolvido em infecções intramamárias, espécies de SCN vêm recebendo atenção como agentes emergentes de mastite subclínica (TAPONEN & PYÖRÄLÄ, 2009). SCN têm sido identificados em infecções persistentes, sendo responsáveis por significativo aumento da CCS do leite e redução na produção, além de fibrose intra-alveolar do tecido mamário, perda da função secretória (SILVA, 2003) bem como produção de toxinas termoestáveis (UDO et al., 1999). O comportamento oportunista destes agentes associado à ausência de sinais clínicos evidentes favorecem sua manutenção na glândula mamária (SOARES et al., 2008).

2.3 Detecção e diagnóstico da mastite

Em casos de mastite clínica, a primeira abordagem possível é a observação de sinais de inflamação da glândula mamária, como já descritos anteriormente. Em muitos casos, o úbere fica extremamente doloroso, e os animais reagem à palpação. Durante a palpação, pode-se detectar ainda, zonas de fibrose muitas vezes associadas com infecções subclínicas provocadas por agentes contagiosos com *S. aureus* (REBHUN, 2000).

Na forma clínica, alterações na aparência do leite podem ser observadas durante a ordenha, analisando os primeiros jatos de leite sobre uma caneca de fundo escuro. As mastites subclínicas, por sua vez, são detectadas através de testes indiretos, sendo o *California Mastitis Test* (CMT) e a CCS os mais empregados. A confirmação, entretanto, deve ser realizada através do isolamento bacteriano (RADOSTITS et al., 2002; DIAS, 2007; SANTOS & FONSECA 2007).

2.3.1 *California Mastitis Test*

O CMT é um dos testes mais usuais para o diagnóstico da mastite subclínica, sendo um indicador indireto da contagem de células somáticas no leite. O resultado do teste é avaliado em função do grau de gelificação ou viscosidade da mistura de partes iguais de leite e reagente, um detergente aniônico neutro com indicador de pH, que atua dissolvendo as paredes celulares e nucleares das células e liberando o material nucleico (DNA). De acordo com a intensidade da reação classifica-se em cinco escores: negativa (de 0 a 200.000 células/ml), traços ou suspeito (150.000 a 500.000 células/ml), leve (400.000 a 1.500.000 células/ml), moderada (800.000 a 5.000.000 células/ml) e intensa (com mais de 5.000.000 células/ml) (FONSECA & SANTOS, 2000). Pela sua praticidade, é o método de triagem indicado no diagnóstico de mastites subclínicas a campo (RADOSTITIS et al., 2002).

2.3.2 Contagem de Células Somáticas

A contagem de células somáticas do leite de animais individuais ou de tanque é uma ferramenta valiosa na avaliação do nível de mastite subclínica no rebanho (MÜLLER, 2002). As células somáticas no leite são constituídas por células de defesa e epiteliais que, em caso de inflamação da glândula mamária, aumentam sua contagem consideravelmente. Do total de células somáticas, 75 a 98% são leucócitos, que migram para o úbere para fagocitar e digerir os micro-organismos invasores e 2 a 25%, correspondem a células epiteliais, provenientes da descamação natural que ocorre no tecido de revestimento e secretor interno da glândula mamária (RIBAS, 1994).

No Brasil, a IN nº 62/2011 que substituiu a IN nº51/2002, estipula uma contagem máxima de 600.000 CS/mL em leite cru refrigerado bovino, devendo, a partir de 2014, alcançar a contagem de 500.000 CS/mL e em 2016, 400.000 CS/mL, nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste (MAPA, 2011).

Além das infecções intramamárias, outros fatores como estágio de lactação, produção de leite, número de lactações, estresse causado por deficiências no manejo, problemas nutricionais e doenças intercorrentes podem interferir na CCS e, portanto, devem ser considerados (MÜLLER, 2002). Apesar de não ser o único indicador da mastite, CCS pode

ser utilizada como critério para seleção de vacas para cultura microbiológica de leite, assim como o CMT (RADOSTITIS et al., 2002).

2.3.3 Cultura microbiológica

O isolamento microbiológico de micro-organismos patogênicos em amostras de leite é considerado o método diagnóstico padrão para mastite (SÁNCHEZ et al., 2004). A identificação dos agentes responsáveis pelas mastites, contagiosos ou ambientais, é fundamental para a determinação de protocolos terapêuticos e desenvolvimento de programas de controle (FONSECA & SANTOS, 2007).

A realização da cultura individual de todos os quartos mamários das vacas em lactação é a melhor forma de se conhecer o nível de infecção de um rebanho. Porém, o elevado custo dessa prática, restringe seu emprego na rotina. Assim, a cultura de amostras compostas de todos os quartos do animal constitui uma alternativa economicamente viável (BRITO et al. 1999).

Em rebanhos com CCS elevadas ou com grande número de quartos mamários com reações positivas no CMT, geralmente observa-se alta prevalência de mastite subclínica. Nestes rebanhos, a avaliação das infecções presentes pode ser feita pela cultura de uma amostragem de quartos mamários com base nos escores do CMT (BRITO et al. 1999; FONSECA & SANTOS, 2007).

Algumas espécies de bactérias, como *S. aureus*, apresentam um padrão cíclico de infecção, sendo que sua taxa de eliminação no leite pode ocorrer em maior ou menor quantidade, alternadamente. Dessa forma, estima-se que a probabilidade de isolamento de *S. aureus* a partir de uma única amostra seja de 74,5% (FONSECA & SANTOS, 2007). Assim, recomenda-se examinar duas ou três amostras de leite consecutivas a fim de aumentar a sensibilidade da cultura microbiológica do leite de vacas infectadas por *S. aureus*, principalmente aquelas com baixas contagens de células somáticas, de modo a se obter maior confiabilidade dos resultados (RADOSTITIS et al., 2002).

A cultura microbiológica a partir de leite de tanque também é uma maneira de identificar os agentes envolvidos em casos de mastite no rebanho. Porém, apesar dessa forma de diagnóstico apresentar alta especificidade e ser menos onerosa, possui baixa sensibilidade,

uma vez que o número de micro-organismos encontrados varia com o número de vacas infectadas, com a produção de leite e com a gravidade da infecção. (RADOSTITS et al., 2002). Assim, para o controle da enfermidade é necessário a identificação dos animais responsáveis pelas alterações do leite de tanque, para que sejam tomadas as devidas medidas (BRITO et al., 2002).

2.4 Tratamento e Controle

Os princípios básicos para o controle da mastite compreendem a eliminação de infecções existentes, a prevenção de novas infecções e o monitoramento da saúde da glândula mamária (SANTOS & FONSECA, 2007). Existe uma relação direta entre o número de bactérias presentes nos tetos e a taxa de infecções intramamárias. Desta forma, todos os procedimentos que contribuam para a manutenção de uma baixa população de bactérias na superfície dos tetos ajudam de forma significativa no controle da mastite (FONSECA & SANTOS, 2000).

O manejo da ordenha é um dos principais fatores relacionados à prevenção de infecções da glândula mamária. A adequada higiene do úbere, incluindo a realização pré e pós-*dipping*, com desinfetantes apropriados, associada ao correto funcionamento do sistema de ordenha e a segregação dos animais, no momento da ordenha, são essenciais para a redução da taxa de novas infecções em rebanhos com alta incidência de mastite (DIAS, 2007).

O tratamento precoce de casos de mastite clínica durante a lactação aumenta a probabilidade de cura e retorno da produção normal de leite. Entretanto, em casos de mastite crônica e recorrente recomenda-se o descarte dos animais, uma vez que, estes são potenciais fontes de infecção no rebanho (SANTOS & FONSECA, 2007). O tratamento da enfermidade é predominantemente baseado na utilização de antimicrobianos de aplicação intramamária (SILVA, 2003; ERSKINE et al., 2004). Dentre as vantagens desta via, destaca-se a manutenção de elevadas concentrações da substância antimicrobiana diretamente no local da aplicação, quando comparada à administração sistêmica (GUARDABASSI et al., 2010).

Entretanto, em casos de mastite clínica aguda, a administração sistêmica pode ser necessária, a fim de evitar a septicemia, uma vez que a intensidade do processo inflamatório determina o aumento da permeabilidade vascular, facilitando a disseminação dos micro-organismos (SILVA, 2003). Porém, poucas substâncias têm características farmacocinéticas e

farmacodinâmicas adequadas para tratamento sistêmico da mastite. Antimicrobianos de largo espectro comumente utilizados, como oxitetraciclina, sulfonamida/trimetoprim e combinações de ceftiofur, com frequência não atingem concentrações terapêuticas no leite, apresentando eficácia variável para o tratamento da mastite clínica (GUARDABASSI et al., 2010).

Desta forma, a escolha de drogas para o tratamento da mastite deve ser pautada em alguns fatores, os quais são fundamentais para o sucesso da terapia, incluindo: identificação do agente, suscetibilidade do mesmo aos antimicrobianos disponíveis, dosagem correta e duração do tratamento, além do estado imunológico do animal (ERSKINE et al., 1993). O conhecimento do agente etiológico pode influenciar na escolha do medicamento de acordo com o local desejado para que ocorra maior atividade do fármaco. *S. aureus*, preferencialmente, penetram no tecido do úbere, enquanto *Streptococcus* spp., por exemplo, permanecem nos ductos alveolares, estando esses, mais vulneráveis à exposição de drogas de aplicação intramamária (ERSKINE et al., 2003).

O tratamento da mastite subclínica durante a lactação não é recomendado, uma vez que os custos com o descarte do leite, devido ao período de carência pelo uso de antimicrobianos, na maioria das vezes, superam os benefícios do tratamento (RUEGG, 2004; ZAFALON et al., 2007). Além disso, as taxas de cura para terapias durante a lactação, em especial, de mastites causadas por *S. aureus* são baixas (25 a 30%). A formação de tecido cicatricial e a proteção da bactéria dentro de leucócitos, associadas à pobre difusão das drogas no tecido mamário e a inativação do fármaco por componentes do leite e proteínas teciduais contribuem para o insucesso de tratamentos durante essa fase (SANTOS & FONSECA, 2007). Guardabassi et al. (2010) descrevem que há atividade reduzida no leite para diversas classes de antimicrobianos, como: macrolídeos, tetraciclina, sulfonamidas e trimetoprim.

Dessa forma, recomenda-se o tratamento de todas as vacas ao final da última lactação, sendo essa, a maneira mais eficiente para o controle da mastite subclínica e prevenção de novas infecções no rebanho (BERRY & HILLERTON, 2002; RADOSTITIS et al., 2002). Essa estratégia é justificada pelas maiores taxas de cura no período seco e pelo fato das vacas tornarem-se extremamente suscetíveis às novas infecções nessa fase (SANTOS & FONSECA, 2007). As formulações para terapia de vaca seca contêm doses elevadas de antimicrobianos em veículos mais oleosos, com finalidade de prolongar a ação do produto (RADOSTITIS et al., 2002). Entretanto, alguns autores questionam a eficácia da terapia durante o período seco para prevenção de novas infecções que podem ocorrer próximo ao parto, já que as drogas disponíveis para esta finalidade não persistem por todo este período (DINGWELL et al., 2003). Além disso, essa prática tem sido contestada por não ser prudente

quanto à utilização de antimicrobianos, uma vez que, todos os animais são tratados, independente da ocorrência de mastite ou não (HILLERTON & BERRY, 2005).

Assim, a terapia seletiva de vacas secas tem sido um método cada vez mais atraente para diminuir a rotina de tratamentos antimicrobianos na atividade leiteira. Essa estratégia limita o tratamento às vacas infectadas ou aos quartos infectados no momento da secagem (GUARDABASSI et al., 2010); no entanto, o risco de novas infecções durante o período seco deve ser considerado (BERRY & HILLERTON, 2002).

2.5 Resistência aos antimicrobianos

A resistência bacteriana é um dos maiores problemas inerentes ao uso de antimicrobianos (AARESTRUP, 2005; MOTA et al., 2005). Tão logo os primeiros antimicrobianos foram introduzidos, observou-se a emergência de cepas de *S. aureus* resistentes à penicilina (ABRAHAM & CHAIN, 1988). Nos anos subsequentes, o desenvolvimento de novas classes de antimicrobianos foi seguido pelo desenvolvimento de resistência para estes compostos entre as diferentes espécies de bactérias (TENOVER, 2006). O uso constante de fármacos antimicrobianos é aceito como o principal fator de risco para a resistência bacteriana (VAN DEN BOGAARD & STOBBERINGH, 2000; PHILLIPS et al., 2004). O emprego contínuo e inadequado destes agentes criticamente importantes na medicina humana tem sido relatado na pecuária ao longo dos anos (GRAVE & WEGENER, 2006).

A mastite bovina é a causa mais comum para o uso de antimicrobianos em rebanhos leiteiros (ERSKINE et al., 2004), chegando a representar mais de 40% do total do consumo nas explorações pecuárias (KORB et al., 2011). Diversos estudos sobre suscetibilidade a antimicrobianos de patógenos de mastite bovina demonstraram elevados percentuais de resistência, principalmente para *Staphylococcus* spp. (BRITO et al., 2001; MATEU & MARTIN, 2001; OLIVEIRA et al., 2002; MACHADO et al., 2008).

Os antimicrobianos utilizados em animais pertencem essencialmente às mesmas classes de antimicrobianos utilizados na medicina humana (ARIAS & CARRILHO, 2012), constituindo assim, um sério problema do ponto de vista clínico e de saúde pública. A liberação de resíduos antimicrobianos no meio ambiente devido ao uso, por vezes indiscriminado, destes fármacos no tratamento de animais, pode contribuir para mudanças de

populações locais de micro-organismos, além de favorecer o desenvolvimento de resistência entre patógenos, incluindo espécies de importância em medicina humana (AARESTRUP & SCHWARZ, 2006; MARTINEZ, 2009).

As bactérias são capazes de suplantar os efeitos de agentes antimicrobianos por meio de uma grande variedade de mecanismos. De maneira geral, as estratégias de resistência aos agentes antimicrobianos baseiam-se em modificações ou substituições do sítio alvo da droga, inativação enzimática do fármaco, efluxo da droga e redução da assimilação. Ocasionalmente, a resistência pode manifestar-se através de vários mecanismos, como é o caso da resistência à tetraciclina. Em termos gerais, a resistência é classificada como intrínseca ou adquirida (WRIGHT, 2005; AARESTRUP & SCHWARZ, 2006; TENOVER, 2006; QUINN et al., 2011).

A primeira está relacionada a características estruturais ou funcionais das células bacterianas, as quais conferem tolerância a um fármaco específico ou classe de antimicrobianos (GUARDABASSI & COURVALIN, 2006). A mesma é uma propriedade espécie ou gênero-específica e resulta de processos adaptativos geralmente relacionados à multiplicação bacteriana necessários para a maioria das ações antimicrobianas das drogas (WRIGHT, 2005; BECERRA et al., 2009). Complexidade da parede celular ou mecanismos de extrusão do fármaco e produção de enzimas que inativam as droga são exemplos destes mecanismos de resistência bacteriana (GUARDABASSI & COURVALIN, 2006; MOTA et al., 2005).

Enquanto isso, a resistência adquirida decorre de alterações no genoma bacteriano, as quais podem ocorrer por mutação espontânea (resistência endógena) ou transferência horizontal de genes que codificam algum determinante de resistência (resistência exógena). Esta representa uma grande ameaça para a saúde animal e humana, pois provoca o surgimento e a propagação de genes de resistência em populações de bactérias normalmente suscetíveis. Ao contrário da anterior, a resistência adquirida normalmente está associada a apenas algumas cepas de uma população bacteriana (BERGER-BACHI & McCALLUM, 2006; GUARDABASSI & COURVALIN, 2006; QUINN et al., 2011). A disseminação de genes de resistência de bactérias resistentes para cepas sensíveis pode ocorrer por conjugação por meio de plasmídeos, por transdução mediada por bacteriófagos ou ainda, por transformação (BERGER-BACHI & McCALLUM, 2006; QUINN et al., 2011). Uma vez que, distintos genes de resistência são frequentemente agrupados, a transferência horizontal de um único elemento genético pode resultar em aquisição de múltiplos genes de resistência pelas bactérias receptoras (TAVARES, 2000; GUARDABASSI et al., 2010).

Acredita-se que concentrações subinibitórias de penicilina, por exemplo, estimulam a transferência de DNA plasmidial entre espécies (BERGER-BACHI & McCALLUM, 2006). Independente do antimicrobiano ou do mecanismo de resistência, a exposição de bactérias a estes agentes resulta na seleção de genótipos resistentes, permitindo sua predominância na população bacteriana (WRIGHT, 2005).

O uso prudente dos antimicrobianos é um componente crítico na terapia humana e animal frente às infecções por micro-organismos. Neste sentido, o teste de suscetibilidade *in vitro* aos agentes antimicrobianos é uma ferramenta no controle de infecções e na tentativa de prevenir o desenvolvimento de resistência dos micro-organismos, especialmente das bactérias. Assim sendo, esta deve ser uma condição prévia para o tratamento de mastite (GUARDABASSI et al., 2010). O teste baseado no método de difusão em disco de Kirby Bauer é habitualmente utilizado na prática veterinária devido à simplicidade e rapidez (NCCLS, 1997). Além do conhecimento do perfil de suscetibilidade de patógenos para a seleção da terapia mais adequada, o monitoramento de padrões de resistência aos antimicrobianos é fortemente desejável, a fim de se avaliar o comportamento dos agentes frente aos fármacos mais utilizados bem como para a construção de estratégias de tratamento efetivas.

3 CAPÍTULO 1

Perfil temporal de resistência antimicrobiana de *Staphylococcus* spp. isolados de casos de mastite bovina durante 20 anos (1992 – 2011)

**Ananda P. Kowalski, Grazieli Maboni, Julia P. Espindola, Ariane S. Foletto, Guerino
Bandeira Jr., Luciana Pötter, Sônia A. Botton, Agueda P. C. Vargas**

(Artigo a ser submetido para publicação – Pesquisa Veterinária Brasileira)

Perfil temporal de resistência antimicrobiana de *Staphylococcus* spp. isolados de casos de mastite bovina durante 20 anos (1992 – 2011)¹

Ananda P. Kowalski², Grazieli Maboni², Julia P. Espindola², Ariane S. Foletto², Guerino Bandeira Jr.², Luciana Pötter³, Sônia A. Botton², Agueda P. C. Vargas^{2*}

ABSTRACT.- Kowalski A.P., Maboni G., Espindola J.P., Foletto A.S., Bandeira Jr. G., Pötter L., Botton S.A. & Vargas A.C. 2013. [Temporal profile of antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. isolates from cases of bovine mastitis for 20 years (1992 – 2011).] Perfil temporal de resistência antimicrobiana de *Staphylococcus* spp. isolados de casos de mastite bovina durante 20 anos (1992 – 2011). *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Laboratório de Bacteriologia (LABAC). Avenida Roraima, nº 1000, Sala 5137, Prédio 44, Camobi, Santa Maria, Brasil. E-mail: agueda.vargas@gmail.com

Records of *in vitro* susceptibility tests conducted in the period from 1992 to 2011 were reviewed retrospectively in order to evaluate the antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. isolated from milk samples of cows with mastitis, as well as to check the dynamic profiles of possible changes in resistance during two decades. The results of 2,430 isolates tested by disk diffusion technique to oxacillin, penicillin, ampicillin, cephalexin, norfloxacin, tetracycline, sulfazotrim, gentamicin, and neomycin were analyzed. Comparisons were performed between the percentages of resistance to antimicrobials and their classes and also between to the decades studied using the Kruskal-Wallis and Bonferroni tests. Additionally, it was also evaluated possible tendency or changes in the behavior of these pathogens against the major drugs used in the treatment of the disease in these two decades by regression analysis. The highest rates of resistance ($P < 0.0001$) were observed for the betalactams (34.3%), with exception of cephalexin (6.9%), and for the tetracyclines (28%). Similar resistance rates (7.6% to 15.7%) were observed for the remaining drugs. Regression analysis showed a reduction in resistance to penicillin and ampicillin throughout the period, whilst for oxacillin and neomycin it was observed a decrease of the resistance during the first decade, followed by an increase. A tendency to decreased resistance was observed in relation to sulfazotrim, whereas for the other antimicrobials no tendency was highlighted. The results indicated no tendency of increasing resistance of *Staphylococcus* spp. isolates from bovine mastitis for the most antimicrobials tested, reinforcing the importance of monitoring the resistance patterns of these pathogens, in order to preserve these drugs as a therapeutic reserve.

INDEX TERMS: cows, milk, *Staphylococcus* spp., susceptibility *in vitro*, sanity

¹ Recebido em.....

Aceito para publicação em

²Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima 1000, prédio 44, sala 5137, Cidade Universitária, Bairro Camobi, Santa Maria, RS 97105-900, Brasil. *Autor para correspondência: agueda.vargas@gmail.com

³Departamento de Zootecnia, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

RESUMO - Os registros de resultados de testes de suscetibilidade *in vitro* realizados no período de 1992 a 2011 foram revisados, retrospectivamente, a fim de avaliar a resistência antimicrobiana de isolados de *Staphylococcus* spp. oriundos de amostras de leite de vacas com mastite; bem como verificar a dinâmica de possíveis mudanças dos perfis de resistência ao longo do tempo. Os resultados de 2.430 isolados testados pela técnica de difusão em disco para oxacilina, penicilina, ampicilina, cefalexina, norfloxacin, tetraciclina, sulfazotrim, gentamicina e neomicina foram analisados. Comparações entre as médias de resistência para os antimicrobianos e suas respectivas classes e em relação ao período analisado foram estabelecidas por meio dos testes de Kruskal-Wallis e de Bonferroni. O comportamento da resistência para cada antimicrobiano foi avaliado por meio de análise de regressão. As maiores taxas de resistência ($P < 0,0001$) foram observadas para os betalactâmicos (34,3%), com exceção da cefalexina (6,9%), e tetraciclina (28%). Frente aos demais fármacos, os isolados apresentaram médias de resistência semelhantes entre si (de 7,6% a 15,7%). A análise de regressão demonstrou redução da resistência para penicilina e ampicilina ao longo do período. Para a oxacilina e a neomicina houve um decréscimo da resistência dos micro-organismos testados durante a primeira década; entretanto, houve um aumento no segundo período. Em relação ao sulfazotrim, foi verificada uma tendência à diminuição da resistência dos isolados ao passo que, para os demais antimicrobianos, nenhum comportamento foi destacado. Os resultados não indicaram tendência de aumento da resistência dos isolados de *Staphylococcus* spp. oriundos de casos de mastite bovina para a maioria dos antimicrobianos testados, reforçando a importância do monitoramento dos padrões de resistência destes patógenos, a fim de que estes fármacos sejam preservados garantindo uma reserva terapêutica.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: vacas, leite, *Staphylococcus* spp., suscetibilidade *in vitro*, sanidade

INTRODUÇÃO

A mastite é a principal doença infecto-contagiosa em rebanhos leiteiros (Carvalho et al. 2007, Getahun et al. 2008), sendo responsável por grandes perdas econômicas na indústria deste setor, além de representar a maior causa da utilização de antimicrobianos de uso veterinário em todo o mundo (Saran & Chaffer 2000). A enfermidade caracteriza-se como um processo inflamatório da glândula mamária, geralmente de caráter infeccioso (Ribeiro et al. 2003), sendo mais comumente identificada durante o período de lactação, nas formas clínica ou subclínica (Barlow 2011, Oliver et al. 2011). Esta última destaca-se pela elevada ocorrência, de forma silenciosa, em rebanhos (Santos & Fonseca 2007).

Infecções intramamárias de origem bacteriana representam a principal causa de mastite bovina. Entre os agentes etiológicos, bactérias do gênero *Staphylococcus* são citadas como os micro-organismos mais prevalentes em mastite subclínica (Langoni et al. 1998, Sá et al. 2004, Martins et al. 2006, Bandeira et al. 2013), sendo *Staphylococcus aureus* a espécie mais patogênica (Carvalho et al. 2007). A capacidade de invasão do tecido mamário e a

formação de tecido fibroso no foco da infecção conferem às infecções por *S. aureus* a característica de longa duração, com tendência a cronicização e baixa taxa de cura (Fonseca & Santos 2000).

Fatores de virulência como a produção de diversas toxinas superantigênicas, contribuem para a persistência de *S. aureus* no tecido mamário e para a patogenicidade da mastite (Omoe et al. 2002, Gyles et al. 2010). Além disso, infecções por *S. aureus* representam potencial risco à saúde pública devido à estabilidade de algumas toxinas aos tratamentos térmicos aplicados ao leite (Drescher et al. 2010, Viçosa et al. 2010). As espécies de *Staphylococcus* coagulase negativo (SCN) têm recebido atenção como agentes emergentes de mastite subclínica e, assim como *S. aureus*, são referidas por apresentarem resistência a múltiplos antimicrobianos comumente utilizados no tratamento da enfermidade (Kumar et al. 2009, Taponen & Pyörälä 2009, Weese & Duijkeren 2010).

A emergência de resistência antimicrobiana entre patógenos de impacto na saúde animal é motivo de preocupação tanto na medicina veterinária como humana, especialmente devido à transferência de determinantes de resistência entre os micro-organismos (Erskine et al. 2002, Carvalho et al. 2007). A pressão seletiva imposta pelo uso constante de antimicrobianos e a presença de genes de resistência são os principais fatores determinantes deste fenômeno (van den Bogaard & Stobberingh 2000, Witte 2000, Phillips et al. 2004).

A determinação da suscetibilidade antimicrobiana *in vitro* pode direcionar a escolha da terapia mais adequada para cada caso, aumentando dessa forma, as chances de sucesso do tratamento (Moroni et al. 2006). Testes de suscetibilidade também têm sido úteis para o monitoramento da resistência a antimicrobianos ao longo do tempo (Erskine et al. 2002, Makovec & Ruegg, 2003, Lollai et al. 2008). Estudos a partir de patógenos isolados de leite de vacas com mastite, no Brasil, têm demonstrado diferentes perfis de suscetibilidade aos antimicrobianos disponíveis (Brito et al. 2001, Freitas et al. 2005, Medeiros et al. 2009). Entretanto, no país, há uma carência de trabalhos demonstrando a dinâmica, a longo prazo, dos perfis de resistência antimicrobiana destes patógenos em relação aos antimicrobianos comumente empregados na rotina clínica. O objetivo deste estudo retrospectivo foi verificar o perfil de resistência antimicrobiana de isolados de *Staphylococcus* spp. oriundos de amostras de leite de vacas com mastite no período de 20 anos (1992-2011), além de observar o comportamento destes patógenos frente aos principais antimicrobianos utilizados no tratamento de mastite bovina durante esse período.

MATERIAL E MÉTODOS

Os resultados de testes de suscetibilidade aos antimicrobianos de 2.430 isolados de *Staphylococcus* spp. foram revisados e analisados. Os dados foram coletados a partir de registros de amostras de leite bovino suspeitas de mastite, submetidas à rotina diagnóstica de análise microbiológica e teste de suscetibilidade aos antimicrobianos do Laboratório de Bacteriologia da Universidade Federal de Santa Maria-RS realizados durante o período de 1992 a 2011.

Resumidamente, o diagnóstico de mastite consistiu no isolamento do agente pela semeadura das amostras de leite em base de ágar sangue (Himedia Laboratories[®]) enriquecido com 5% de sangue ovino desfibrinado e incubados em aerobiose a 37 °C por 48 h. A partir do crescimento bacteriano, a identificação dos isolados foi procedida por meio de análise morfológica, provas de catalase, coagulase, ONPG (o-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo) e fermentação de carboidratos (glicose, manitol e maltose), conforme Quinn et al. (1994). Como na maioria dos casos não foi realizada a identificação das espécies de *Staphylococcus* isoladas, os resultados foram unificados pelo gênero.

Os testes de suscetibilidade antimicrobiana *in vitro* foram realizados utilizando o método de difusão em disco de Kirby Bauer modificado (Bauer et al. 1966; NCCLS 2004). Foram testados os seguintes antimicrobianos pertencentes às classes: 1) betalactâmicos - oxacilina (1 µg), penicilina (10 UI), ampicilina (10 µg) e cefalexina (30 µg); 2) fluoroquinolonas - norfloxacin (10 µg); 3) tetraciclinas - tetraciclina (30 µg); 4) sulfonamidas - sulfazotrim (25 µg) e 5) aminoglicosídeos - gentamicina (10 µg) e neomicina (30 µg). Os resultados foram interpretados de acordo com o padrão estabelecido pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) vigente no ano analisado. Os isolados foram classificados como sensíveis, intermediários ou resistentes aos antimicrobianos. Para efeitos de contagem os resultados intermediários foram considerados como resistentes. Como controle de qualidade dos testes de suscetibilidade amostras padrão da *American Type Culture Collection* (ATCC) foram utilizadas: *S. aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Durante o período de estudo, o número de isolados testados variou em relação aos antimicrobianos em um mesmo ano devido a eventuais indisponibilidades de determinados discos para a realização dos testes *in vitro*.

A resistência dos isolados de *Staphylococcus* spp. para cada antimicrobiano foi avaliada a partir do percentual de isolados resistentes em relação ao número de amostras

testadas em cada ano e, também, comparada segundo as classes dos antimicrobianos e décadas analisadas. As comparações foram feitas pelo teste de Kruskal-Wallis. Quando identificadas diferenças entre classes ou antimicrobianos, aplicou-se o teste de Bonferroni para a comparação das médias. As análises foram realizadas com auxílio do programa estatístico SAS (2001).

Para avaliar o comportamento dos isolados frente aos antimicrobianos e suas respectivas classes, no decorrer do período estudado, foi realizada análise de regressão, com os dados transformados para raiz quadrada do arco do seno, para a qual a escolha dos modelos baseou-se na significância dos coeficientes linear, quadrático e cúbico, utilizando-se o teste “t” de Student, com 5% de probabilidade (SAS 2001).

RESULTADOS

Os resultados dos testes de suscetibilidade *in vitro* revisados demonstraram que 729 (30%) dos isolados de *Staphylococcus* spp. foram sensíveis a todos antimicrobianos testados. O perfil de resistência dos isolados frente aos diferentes antimicrobianos avaliados neste estudo pode ser visualizado no Quadro 1.

Pode-se observar uma redução do percentual de resistência dos isolados da primeira década do período estudado (29,2%) em relação à segunda (17,1%) ($P < 0,0004$).

Entre as classes de antimicrobianos testados, verificou-se maior resistência ($P < 0,0001$) ao grupo dos betalactâmicos (34,3%) e à tetraciclina (28%), não diferindo estatisticamente entre ambos. Frente às demais classes, da mesma forma, foram observadas médias de resistência semelhantes entre si (de 8,5% a 11,6%). Avaliando-se cada classe, constatou-se diferença nos perfis de resistência dos isolados entre os antimicrobianos testados ($P < 0,0001$). As maiores taxas de resistência durante o período foram observadas em relação à família das penicilinas, evidenciando que 46,2% dos isolados foram resistentes à penicilina, 43,9% à ampicilina e 34,7% à oxacilina. Ao analisar o perfil de resistência dos isolados frente a cefalexina, verificou-se que 6,9% dos isolados mostraram-se resistentes, diferindo dos demais antimicrobianos da classe dos betalactâmicos ($P < 0,0001$). Quanto à norfloxacin, observou-se que 8,5% dos isolados foram resistentes, semelhante ao encontrado em relação ao sulfazotrim (9,1%). Já no grupo dos aminoglicosídeos, a maior taxa de resistência dos *Staphylococcus* spp. foi demonstrada em relação à neomicina (15,7%); enquanto que 7,6% dos isolados foram resistentes à gentamicina.

A dinâmica do comportamento da resistência dos isolados para cada antimicrobiano em relação ao período avaliado pode ser visualizada na Figura 1. A probabilidade e os coeficientes de determinação dos efeitos linear, quadrático e cúbico encontrados para avaliação da dinâmica de resistência de *Staphylococcus* spp. frente aos antimicrobianos em função do período analisado estão apresentados no Quadro 2.

No decorrer dos 20 anos observou-se uma redução da resistência dos *Staphylococcus* spp. em relação à penicilina e à ampicilina. Entretanto, frente à oxacilina pode-se constatar um decréscimo da resistência durante a primeira década seguido de um aumento no segundo período (Fig.1A). Em relação à cefalexina (Fig.1A), norfloxacin (Fig.1B) e tetraciclina (Fig.1C) não foi possível observar qualquer padrão de evolução da resistência dos isolados ao longo do tempo. Contudo, para o antimicrobiano sulfazotrim verificou-se uma tendência a diminuição da resistência dos isolados no período avaliado (Fig.1D). Em relação à classe dos aminoglicosídeos, a análise de regressão demonstrou um declínio da resistência dos *Staphylococcus* spp. à neomicina no decorrer da primeira década, seguido de um aumento de resistência nos anos seguintes. Para gentamicina, no entanto, não foi possível observar qualquer tendência (Fig.1E).

DISCUSSÃO

A resistência bacteriana aos antimicrobianos tem sido tema de diversos estudos, sendo considerada atualmente, o principal risco global para saúde (Spellberg et al. 2013). Neste sentido, o conhecimento da dinâmica da resistência de micro-organismos frente aos antimicrobianos, além de auxiliar no direcionamento do emprego de fármacos mais eficazes para debelar o agente etiológico em casos de infecções (Guardabassi et al 2010), também gera dados que possibilitam buscar intervenções na tentativa de retardar o surgimento e/ou a propagação da resistência em populações.

A maior resistência dos isolados às penicilinas, observada no presente estudo era esperada e está de acordo com diversos autores (Cunha et al. 2006, Machado et al. 2008, Medeiros et al. 2009), uma vez que os betalactâmicos são amplamente empregados na terapêutica de mastite, bem como de outras doenças infecciosas em bovinos (Zafalon et al. 2008, Medeiros et al. 2009). A menor resistência dos isolados de *Staphylococcus* spp. frente ao betalactâmico cefalexina pode ser atribuída ao seu uso em medicina veterinária relativamente recente e ao fato das cefalosporinas serem estáveis às β -lactamases (Spinosa et al. 2002) Além disso, existe uma menor disponibilidade de formulações medicamentosas

de uso veterinário contendo este fármaco (SINDAN 2013), aliado ao alto custo destes produtos.

Embora a resistência de *Staphylococcus* spp. à classe dos betalactâmicos esteja bem documentada (Brito et al. 2001, Machado et al. 2008, Sahebkhthiari et al. 2011), a regressão dos percentuais de isolados resistentes à penicilina e ampicilina ao longo dos 20 anos demonstrada no presente estudo confirma uma tendência observada em estudos anteriores. Erskine et al. (2002) e Makovec & Ruegg (2003) constataram resistência decrescente em bactérias Gram-positivas isoladas de vacas com mastite em relação aos betalactâmicos. Aarestrup & Schawarz (2006) verificaram alterações nos protocolos terapêuticos ao longo dos anos, com a maior disponibilidade de agentes antimicrobianos de diversas classes para uso veterinário, possivelmente, diminuindo o uso dos betalactâmicos. Isto poderia explicar, pelo menos em parte, a diminuição da resistência de *S.aureus*, observada em relação à penicilina em países com histórico de elevados índices de resistência.

A preservação da suscetibilidade a essas drogas é de fundamental importância, já que as formulações disponíveis para tratamento de mastite no período seco são constituídas predominantemente por betalactâmicos e aminoglicosídeos (SINDAN 2013). Em rebanhos onde a mastite contagiosa é bem controlada e onde há maior probabilidade de desenvolver mastites ambientais é importante que estes fármacos mantenham eficácia sobre os agentes causadores desta forma de mastite. Santos & Fonseca (2007) estimaram que a taxa de novas infecções intramamárias, causadas por coliformes seja cerca de quatro vezes superior durante o período seco em comparação com a fase de lactação.

Freitas et al. (2005) constataram um alto nível de resistência de *Staphylococcus* spp. à gentamicina, atribuindo este fato ao uso indiscriminado da droga. No entanto, no presente estudo, a média de resistência foi relativamente baixa, corroborando com relatos de outras regiões do Brasil em que isolados de casos de mastite apresentaram altos índices de sensibilidade a este antimicrobiano (Brito et al. 2001, Medeiros et al. 2009). Dentre os aminoglicosídeos, a maior ocorrência de isolados resistentes foi verificada frente à neomicina, desde os primeiros anos do período avaliado, provavelmente sugerindo um maior emprego desse agente antimicrobiano na espécie bovina.

A análise de regressão não demonstrou tendência em relação à dinâmica da resistência dos isolados frente à tetraciclina. O fato deste fármaco responder por uma das menores taxas de sensibilidade verificadas no presente estudo reflete uma pressão seletiva para microorganismos resistentes em rebanhos. Tetraciclinas, de maneira geral, possuem amplo espectro de ação, sendo largamente utilizadas em medicina veterinária desde a década de 50 não só na

terapia de mastites, mas também para tratar doenças respiratórias e outras enfermidades bovinas (Schwarz et al. 2006, Medeiros et al. 2009). Além disso, as formulações com estas drogas são relativamente baratas e de baixa toxicidade, o que favorece seu emprego na terapia das infecções (Shlaes 2006). Entretanto, seu uso deve ser cauteloso, uma vez que a resistência a essa droga é mediada principalmente por plasmídeos (Pereira et al. 2004), sendo facilmente disseminada, inclusive para diferentes gêneros bacterianos (Spinosa et al. 2002).

A tendência à diminuição da resistência de *Staphylococcus* spp. em relação ao sulfazotrim havia sido sugerida por Makovec & Ruegg (2003), os quais verificaram significativa redução do percentual de *Staphylococcus* spp. resistentes tanto para a classe das sulfonamidas como em associação com trimetoprim.

O índice de resistência encontrado para a oxacilina reforçado pela evolução da resistência entre os isolados na última década do estudo deve ser motivo de atenção, uma vez que este antimicrobiano também é um marcador da resistência de *S. aureus* à meticilina (MRSA) (NCCLS 2004). MRSA é uma importante causa de infecções em humanos e destaca-se pela sua multirresistência aos diferentes antimicrobianos (Enright et al. 2002). A transmissão de MRSA a partir de bovinos, apesar de pouco provável, tem sido sugerida (Lee 2003, Juha'sz-Kaszanyitzky et al. 2007), reforçando seu potencial risco à saúde pública.

Embora os testes de sensibilidade *in vitro* tenham sido solicitados em razão da ocorrência de mastite, não foi possível determinar a forma de apresentação da enfermidade para a maioria das amostras, tampouco o histórico de tratamentos com o uso de antimicrobianos nos animais. Entretanto, a oscilação dos perfis de resistência observados, sugere a ocorrência de diferentes graus de pressão de seleção entre os antimicrobianos ao longo dos anos, sobre linhagens de *Staphylococcus* spp., oriundos de populações heterogêneas.

A redução da resistência é um fenômeno de ocorrência em alguns micro-organismos e deve-se a substituição de cepas resistentes por cepas sensíveis, quando a pressão de seleção em determinada população é removida (Phillips et al. 2004). Erskine et al. (2002) atribuíram a conservação da suscetibilidade de patógenos isolados de casos de mastite a uma maior prudência na utilização de antimicrobianos em explorações leiteiras. No entanto, Duarte & Sá (2011) conferiram o aumento da sensibilidade antimicrobiana de *S. aureus* isolados de humanos à melhoria da constituição bioquímica dos fármacos.

A profissionalização da produção leiteira no decorrer dos 20 anos avaliados, assim como a implantação de medidas que regulamentam o controle e a vigilância de resíduos de medicamentos veterinários em produtos de origem animal (Brasil 1999, 2003) podem ter

contribuído para a redução do percentual de resistência observada da primeira década deste período em relação à segunda. Programas de controle de mastite bovina como o tratamento de casos de mastite subclínica apenas no período seco, e a terapia seletiva de vacas secas, estratégia que restringe o tratamento às vacas infectadas ou ainda, aos quartos infectados têm sido métodos cada vez mais atraentes para diminuir a rotina de tratamentos antimicrobianos na atividade leiteira. A adoção desta medida auxilia na redução da probabilidade de seleção de cepas resistentes entre populações bacterianas (Santos & Fonseca 2007, Guardabassi et al. 2010, Oliver & Murinda 2012).

O estabelecimento de comparações com padrões de resistência de estudos anteriores deve ser cauteloso, devido às diferenças regionais entre populações de patógenos e critérios de amostragem, além de diferenças entre protocolos laboratoriais e diretrizes de interpretação (Aarestrup & Schwarz 2006). No entanto, assim como observado em avaliações de larga escala, sobre a evolução da resistência antimicrobiana de agentes causadores de mastite em outros países (Erskine et al. 2002, Makovec & Ruegg 2003, Lollai et al. 2008), os resultados demonstrados no presente estudo sugerem que antimicrobianos comumente utilizados há décadas em medicina veterinária, ainda podem ser eficientes no tratamento de mastite.

CONCLUSÃO

Os resultados não indicaram tendência de aumento da resistência de isolados de *Staphylococcus* spp. oriundos de casos de mastite bovina para a maioria dos antimicrobianos testados, exceto para oxacilina e neomicina. A resistência antimicrobiana representa um dos principais entraves no controle da mastite sugerindo que os perfis de resistência dos antimicrobianos empregados na terapia de vacas leiteiras sejam constantemente monitorados, a fim de que seja preservada a eficácia dos fármacos, além de garantir uma reserva terapêutica.

REFERÊNCIAS

- Aarestrup F.M. & Schwarz S. 2006. Antimicrobial Resistance in Staphylococci and Streptococci of Animal Origin, p.187-212. In: Aarestrup F.M. Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin. American Society for Microbiology, Washington. 442p.
- Bandeira F.S., Picoli T., Zani J.L., da Silva W.P. & Fischer G. 2013. Frequência de *Staphylococcus aureus* em casos de mastite bovina subclínica, na região sul do Rio Grande do Sul. Arq. Inst. Biol., São Paulo. 80(1):1-6.
- Barlow J. 2011. Mastitis Therapy and Antimicrobial Susceptibility: a Multispecies Review with a Focus on Antibiotic Treatment of Mastitis in Dairy Cattle. J Mammary Gland. Biol. Neoplasia. 16(4):383-407.
- Bauer A.W., Kirby W.M., Sherris J.C. & Turck M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am. J. Clin. Pathol. 45:493-496.
- Brasil. 1999. Instrução Normativa MA nº 42, de 20 de dezembro de 1999. Altera o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal, PNCR, e os Programas de Controle de Resíduos em Carne - PCRC, Mel - PCRM, Leite - PCRL e Pescado – PCRP. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Ministério da Agricultura e do Abastecimento (MAPA), Brasília.
- Brasil. 2003. Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo 2004/2005. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Brasília.
- Brito M.A.V.P., Brito J.R.F., Silva M.A.S. & Carmo R.A. 2001. Concentração mínima inibitória de dez antimicrobianos para amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de infecção intramamária bovina. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 53(5):10-17.
- Carvalho L.B., Amaral F.R., Brito M.A.V.P., Lange C.C., Brito J.R.F. & Leite R.C. 2007. Contagem de células somáticas e isolamento de agentes causadores de mastite em búfalas (*Bubalus bubalis*). Arq. Bras. de Med. Vet. e Zoot. 59(1):242-245.
- Cunha A.P., Silva L.B.G., Pinheiro Jr. J.W., Silva D.R., Oliveira A.A. da F., Silva K.P.C. & Mota R.A. 2006. Perfil de sensibilidade antimicrobiana de agentes contagiosos e ambientais isolados de mastite clínica e subclínica de búfalas. Arq. Inst. Biol. 73(1):17-21.
- Drescher G., Mattiello S.P., Peixoto R.M., Vargas A.C., Maciel M.N. & Costa M.M. 2010. Caracterização bioquímica e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de agentes bacterianos isolados de mastite subclínica ovina na região oeste de Santa Catarina. Ciênc. Anim. Bras. 11(1):188-193.
- Duarte D.A. & Sá A.L.B. 2011. Resistência e sensibilidade de cepas do *Staphylococcus aureus* a antibióticos β -lactâmicos isolados de unidades hospitalares. Revisão bibliográfica sistemática metanalítica dos últimos dez anos. Revista Eletrônica Acervo Saúde 1:108-121.
- Enright M.C., Robinson A., Randle G., Feil E., Grundmann H. & Spratt, B. 2002. The evolutionary history of methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA). Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 99(11):7687-7698.
- Erskine R.J., Walker R.D., Bolin C.A., Bartlett P.C. & White G. 2002. Trends in Antibacterial Susceptibility of Mastitis Pathogens During a Seven-Year Period. J. Dairy Sci. 85:1111-1118.
- Fonseca L.F.L. & Santos M.V. 2000. Qualidade do leite e controle de mastite. Lemos Editorial, São Paulo. 175p.
- Freitas M.F.L., Pinheiro Jr J.W., Stamford T.L.M., Rabelo S.S.A., Silva D.R., Silveira Filho V.M.S., Santos F.G.B., Sena M.J. & Mota R.A. 2005. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus coagulase* positivos isolados de leite de vacas

- com mastite no agreste do estado de Pernambuco. *Arq. Inst. Biol., São Paulo* 72(2):171-177.
- Getahun K., Kelay B., Bekana M. & Lobago F. 2008. Bovine mastitis and antibiotic resistance patterns in Selalle smallholder dairy farms, central Ethiopia. *Trop. Anim. Health Prod.* 40(4):261–268.
- Guardabassi L., Jensen L.B. & Kruse H. 2010. Guia de antimicrobianos em veterinária. Artmed, Porto Alegre. 268p.
- Gyles C.L., Prescott J.F., Songer G. & Thoen C.O. 2010. Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. 4 ed. Blackwell, Iowa. 643p.
- Juhász-Kaszanyitzky E., Jánosi S., Somogyi P., Dán A., Bloois L.G., Duijkeren E. & Wagenaar J.A. 2007. MRSA transmission between cows and humans. *Emerg. Infect. Dis.* 13(4):630–632.
- Kumar R., Yadav B.R. & Singh R.S. 2009. Genetic determinants of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from milk of mastitic crossbred cattle. *Curr. Microbiol.* 60:379–386.
- Langoni H., Silva A.V., Cabral K.G. & Domingues P.F. 1998. Aspectos etiológicos na mastite bovina: flora bacteriana aeróbica. *Rev. Bras. Med. Vet.* 20(5):204-209.
- Lee J.H. 2003. Methicillin (Oxacillin)-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Major Food Animals and Their Potential Transmission to Humans. *Applied and environmental microbiology*, 69(11):6489-6494.
- Lollai S.A., Ziccheddu M., Di Mauro C., Manunta D., Nudda A. & Leori G. 2008. Profile and evolution of antimicrobial resistance of ovine mastitis pathogens (1995–2004). *Small Ruminant Research* 74:249–254.
- Machado, T.R.O., Correa M.G. & Marin J.M. 2008. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative Staphylococci isolated from mastitic cattle in Brazil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 60(1):278-282.
- Makovec J.A. & Ruegg P.L. 2003. Antimicrobial resistance of bacteria isolated from dairy cow milk samples submitted for bacterial culture: 8,905 samples (1994-2001). *JAVMA.* 222(11):1582-1589.
- Martins R.P. Marques M.R.H. & Neto A.C. 2006. Etiologia da mastite subclínica em vacas do rebanho de uma queijaria em Nossa Senhora do Livramento, MT. *Rev. Hig. Alimentar.* 20(13):104-110.
- Medeiros E.S., Mota R.A., Santos M.V., Freitas M.F.L., Pinheiro Jr J.W. & Teles J.A.A. 2009. Perfil de sensibilidade microbiana in vitro de linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de vacas com mastite subclínica. *Pesq. Vet. Bras.* 29(7):569-574.
- Medeiros E.S., França C.A., Krewer C.C., Peixoto R.M., Souza Jr. A.F., Cavalcante M.B., Costa M.M. & Mota R.A. 2011. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. isolates from cases of mastitis in buffalo in Brazil. *J. Vet. Diagn. Invest.* 23(4):793–796.
- Moroni P., Pisoni G., Antonini M., Villa R., Boettcher P. & Carli S. 2006. Short Communication: Antimicrobial Drug Susceptibility of *Staphylococcus aureus* from Subclinical Bovine Mastitis in Italy. *J. Dairy Sci.* 89(8):2973–2976.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). 2004. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Fourteenth Informational Supplement M100-S14. NCCLS, Wayne, PA, USA.
- Oliver S.P., Murinda S.E. & Jayarao B.M. 2011. Impact of antibiotic use in adult dairy cows on antimicrobial resistance of veterinary and human pathogens: a comprehensive review. *Foodborne Pathog. Dis.* 8(3):337–355.
- Oliver S.P. & Murinda S.E. 2012. Antimicrobial Resistance of Mastitis Pathogens. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 28(2):165–185.

- Omoe K., Ishikawa M., Shimoda Y. Hu D., Ueda S. & Shinagawa K. 2002. Detection of *seg*, *she*, and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *Staphylococcus aureus* isolates harborin *seg*, *seh*, or *sei* genes. J. Clin. Microbiol. 40(3):857-862.
- Pereira M.S.V., Siqueira Júnior J.P. & Takaki G.M.C. 2004. Eliminação de resistência a drogas por fluorquinolonas em *Staphylococcus aureus* de origem bovina. Pesq. Vet. Bras. 24(1):11-14.
- Phillips I., Casewell M., Cox T., Groot B.D., Friis C., Jones R, Nightingale C., Preston R. & Waddell J. 2004. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. J. Antimicrob. Chemother. 53(1):28–52.
- Quinn P.J., Carter M.E., Markey B. & Carter G.R. 1994. Clinical Veterinary Microbiology. Wolf, Europa. 648p.
- Ribeiro M.E.R., Petrini L.A., Aita M.F., Balbinotti M.; Stumpf Jr W., Gomes J.F., Schramm R.C., Martins P.R. & Barbosa R.S. 2003. Relação entre a mastite clínica, subclínica infecciosa e não infecciosa em unidades de produção leiteiras na região sul do Rio Grande do Sul. Revista Brasileira de Agrociência, 9(3): 287-290.
- Sá M.E.P., Cunha M.L.R.S., Elias A.O., Victória C. & Langoni H. 2004. Importância do *Staphylococcus aureus* nas mastites subclínicas: pesquisa de enterotoxinas e toxina do choque tóxico, e a relação com a contagem de células somáticas. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. 41(5):320-326.
- Sahebkhitiari N., Nochi Z., Eslampour M.A., Dabiri H., Bolfion M., Taherikalani M., Khoramian B., Zali M.R. & Emaneini M. 2011. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw milk of bovine subclinical mastitis in Tehran and Mashhad. Acta Microbiol Immunol Hung. 58:113–121.
- Santos M.V. & Fonseca L.F.L. 2007. Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite. Manole, São Paulo. 314p.
- Saran A. & Chaffer M. 2000. Mastitis y Calidad de leche. Editorial Inter-Médica. Buenos Aires, Argentina. 196p.
- Schwarz S., Cloeckert A. & Roberts M.C. 2006. Mechanisms and Spread of Bacterial Resistance to Antimicrobial Agents, p.73 – 98. In: Aarestrup F.M. Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin. American Society for Microbiology, Washington. 442p.
- Shlaes D.M. 2006. An update on tetracyclines. Current Opinion in Investigational Drugs, 7:167-171.
- Spellberg B., Bartlett J.G. & Gilbert D.N. 2013. The Future of Antibiotics and Resistance. The New England Journal of Medicine, 368(4): 299-301.
- Statistical analysis system user's guide: statistics, version 8.2. (SAS). 2001. Statistical Analysis System Institute, Cary. 1686p.
- SINDAN 2013. Compêndio de Produtos Veterinários. Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal. Disponível em <<http://www.cpv.com.br/cpv/index.html>> Acesso em 10 de maio de 2013.
- Spinosa H.S., Górnica S.L. & Bernardi M.M. 2002. Farmacologia aplicada à medicina veterinária. 3ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 752p.
- Taponen S. & Pyörälä S. 2009. Coagulase-negative *Staphylococci* as cause of bovine mastitis—not so different from *Staphylococcus aureus*. Vet. Microbiol. 134(1-2):29–36.
- van den Bogaard A.E. & Stobberingh E.E. 2000. Epidemiology of resistance to antibiotics: links between animals and humans. Int. J. Antimicrobial Agents 14:327–335.
- Viçosa G.M., Moraes P.M., Yamazi A.K. & Nero L.A. 2010. Enumeration of coagulase and thermonuclease-positive *Staphylococcus* spp. in raw milk and fresh soft cheese: an

- evaluation of Baird-Parker agar, rabbit plasma fibrinogen agar and the Petrifilm™ Staph Express count system. *Food Microbiology* 27(4):447-452.
- Weese J.S. & Van Duijkeren E. 2010. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudointermedius* in veterinary medicine. *Vet. Microbiol.* 140 (3):418-429.
- Witte W. 2000. Ecological impact of antibiotic use in animals on different complex microflora: environment. *International Journal of Antimicrobial Agents* 14(4):321-325.
- Zafalon L.F., Arcaro J.R.P., Nader Filho A., Ferreria L.M., Castelani L., Benvenuto F. 2008. Investigação de perfis de resistência aos antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados na ordenha de vacas em lacta o. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 67(2):118-125.

QUADRO 1. Perfil de resistência antimicrobiana de isolados de *Staphylococcus* spp. oriundos de amostras de leite bovino (1992-2011)¹.

Ano Antimicrobiano	OXA	PEN	AMP	CEF	NOR	TET	SUT	GEN	NEO
1992	6/6 100%	6/6 100%	43/47 91,5%	NT	NT	17/45 37,8%	5/45 11,1%	3/47 6,4%	2/5 40%
1993	58/62 93,5%	40/63 63,5%	49/61 80,3%	NT	NT	8/30 26,7%	12/84 14,3%	3/63 4,7%	11/58 19%
1994	51/82 62,2%	61/83 73,5%	58/83 69,9%	NT	NT	NT	23/83 27,7%	6/81 7,4%	23/82 28%
1995	76/117 64,9%	67/127 52,7%	58/135 42,9%	NT	7/47 14,9%	11/28 39,3%	14/131 10,7%	7/135 5,2%	15/129 11,6%
1996	104/176 59,1%	81/171 47,4%	97/180 53,9%	NT	15/161 9,3%	27/73 37%	30/169 17,7%	9/180 5%	29/173 16,7%
1997	91/192 47,4%	75/164 45,7%	84/182 46,1%	5/99 5%	8/194 4,1%	53/192 27,6%	7/193 3,6%	17/197 8,6%	14/188 7,4%
1998	78/389 20%	252/419 60,1%	261/463 56,4%	70/423 16,5%	41/463 8,8%	146/469 31,1%	44/415 10,6%	36/387 9,3%	86/453 19%
1999	42/368 11,4%	180/364 49,4%	179/365 49%	18/360 5%	23/359 6,4%	76/361 21%	12/357 3,4%	14/372 3,7%	23/367 6,3%
2000	36/220 16,4%	117/222 52,7%	104/207 50,2%	11/163 6,7%	26/208 12,5%	60/221 27,1%	21/218 9,6%	21/154 13,6%	33/221 14,9%
2001	13/105 12,4%	41/107 38,3%	39/107 36,4%	5/107 4,7%	7/107 6,5%	25/107 23,4%	4/107 3,7%	3/107 2,8%	7/106 6,6%
2002	22/73 30,1%	22/73 30,1%	22/73 30,1%	2/73 2,7%	1/73 1,4%	13/73 17,9%	8/73 11%	8/73 11%	20/73 27,4%
2003	11/61 18%	19/61 31,1%	15/61 24,6%	1/61 1,6%	5/61 8,2%	13/61 21,3%	13/61 4,9%	4/61 6,6%	11/61 18%
2004	4/43 9,3%	14/43 32,6%	11/43 25,6%	1/43 2,3%	1/43 2,3%	9/43 20,9%	2/43 4,6%	2/43 4,6%	3/43 7%
2005	10/43 23,2%	17/43 39,5%	14/43 32,6%	3/43 7%	6/43 13,9%	14/43 32,6%	1/43 2,3%	2/43 4,6%	6/43 13,9%
2006	5/54 9,3%	12/54 22,2%	10/54 18,5%	1/54 1,8%	0/54 0%	14/54 25,9%	2/54 3,7%	2/54 3,7%	1/54 1,8%
2007	12/49 24,5%	15/49 30,6%	9/49 18,4%	2/49 4,1%	2/49 4,1%	7/49 14,3%	6/49 12,2%	3/49 6,1%	3/49 6,1%
2008	14/50 28%	14/50 28%	18/50 36%	7/50 14%	10/50 20%	22/50 44%	5/50 10%	7/50 14%	6/50 12%
2009	9/32 28,1%	22/69 31,9%	18/67 26,9%	4/69 5,8%	12/68 17,6%	17/68 25%	1/69 1,4%	1/69 1,4%	3/69 4,3%
2010	5/26 19,2%	12/20 60%	12/27 44,4%	3/35 8,6%	4/48 8,3%	12/39 30,8%	4/39 10,3%	5/35 14,3%	7/33 21,2%
2011	5/30 16,7%	11/31 35,5%	14/31 45,2%	0/31 0%	2/31 6,4%	9/31 29%	3/31 9,7%	6/31 19,3%	10/31 32,3%

¹ = número de isolados resistentes (zona de inibição inferior aos padrões de NCCLS); OXA= oxacilina; PEN= penicilina; AMP= ampicilina; CEF= cefalexina; NOR= norfloxacina; TET= tetraciclina; SUT= sulfazotrim; GEN= gentamicina; NEO=neomicina; NT= não testado.

Quadro 2. Resistência dos antimicrobianos modelada para os anos de 1992 a 2011 (coeficiente de determinação (%) e probabilidade dos efeitos linear, quadrático e cúbico)

Antimicrobiano		L	Q	C
Oxacilina	R ²	50,84	82,72	83,76
	P	0,0004	<0,0001	0,3247
Penicilina	R ²	50,38	72,57	73,78
	P	0,0005	0,0017	0,4044
Ampicilina	R ²	53,65	77,55	80,96
	P	0,0002	0,0005	0,1098
Cefalexina	R ²	19,93	35,89	43,77
	P	0,0830	0,0953	0,2190
Norfloxacin	R ²	0,01	14,63	14,63
	P	0,9685	0,1438	0,9948
Tetraciclina	R ²	5,53	25,63	28,56
	P	0,3325	0,0540	0,4456
Sulfazotrim	R ²	18,80	33,06	35,10
	P	0,0561	0,0741	0,4886
Gentamicina	R ²	5,54	9,82	21,51
	P	0,3180	0,3815	0,1422
Neomicina	R ²	9,53	30,43	30,71
	P	0,1854	0,0372	0,8024

L= linear; Q= quadrático; C= cúbico; R²= coeficiente de determinação; P= probabilidade.

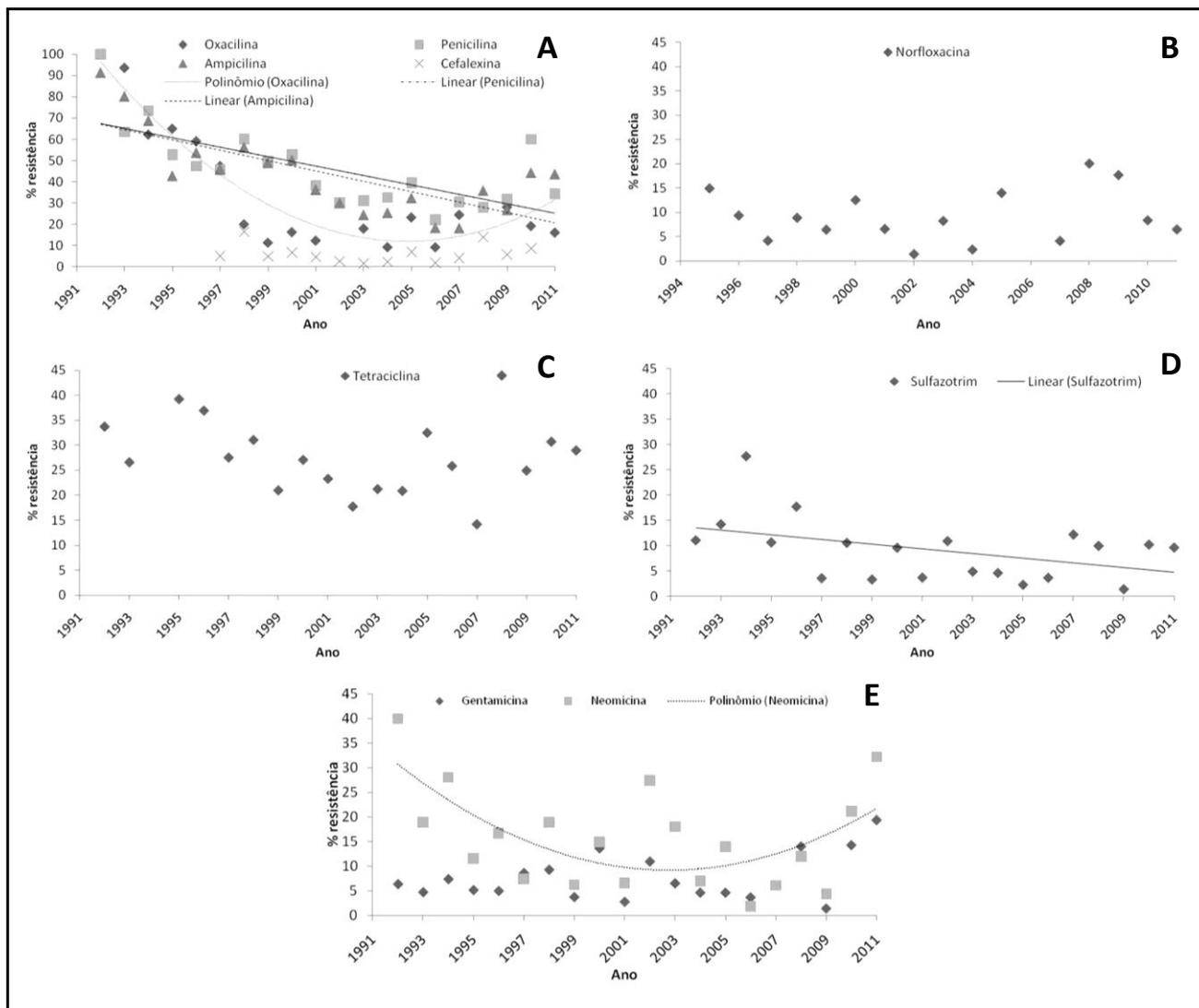


Fig.1 Evolução da resistência de *Staphylococcus* spp. isolados de leite bovino frente aos antimicrobianos testados no período de 1992 a 2011. (A) Betalactâmicos (oxacilina – regressão quadrática; penicilina e ampicilina – regressão linear; cefalexina – sem regressão). (B) Norfloxacin – sem regressão. (C) Tetraciclina – sem regressão. (D) Sulfazotrim- tendência de regressão linear (E) Aminoglicosídeos (neomicina – regressão quadrática; gentamicina – sem regressão).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Programas de monitoramento da ocorrência de resistência de patógenos causadores de mastite à agentes antimicrobianos são fortemente desejáveis e devem ser contínuos para que possíveis tendências subsequentes sejam identificadas. O acompanhamento individual de rebanhos em relação às mudanças no perfil de suscetibilidade antimicrobiana, considerando espécies bacterianas e o histórico de exposição à antimicrobianos das populações, identificando diferenças de pressão de seleção possibilitaria uma visualização mais acurada da evolução da resistência desses agentes frente às drogas antimicrobianas mais utilizadas.

Destaca-se a necessidade de implantação de diretrizes compulsórias quanto ao uso prudente de antimicrobianos na medicina veterinária, amparadas pela legislação nacional, a fim de se reduzir a utilização dos mesmos e prolongar a eficácia terapêutica dos fármacos disponíveis.

O Programa de Residência em Área Profissional da Saúde em Medicina Veterinária, subárea de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) possibilitou um aprofundamento da formação acadêmica, a partir do conhecimento e treinamento nos serviços prestados pelos laboratórios vinculados ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da UFSM. As vivências proporcionadas pela interface com a área da saúde, a partir de uma concepção ampliada de saúde humana e animal vivenciadas na comunidade local, contribuem para a capacitação e consolidação de Médicos Veterinários como profissionais da área da saúde.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARESTRUP F.A. Veterinary Drug Usage and Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology** , v.96, n.4, p.271–281, 2005.

AARESTRUP, F. M.; SCHWARZ, S. Antimicrobial Resistance in Staphylococci and Streptococci of Animal Origin. In: AARESTRUP, F. M. **Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin**. Washington: American Society for Microbiology, 2006. p. 187-212.

ABRAHAM, E. P., CHAIN, E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. 1940. **Rev. Infect. Dis**, v. 10, n.4, p. 677-678,1988.

ANAYA-LÓPEZ, J. L. et al. Invasive potential of bacterial isolates associated with subclinical bovine mastitis. **Research in Veterinary Science**, v. 81, n. 3, p.358-361, 2006.

ARIAS, M.V.B.; CARRILHO, C. M. D. M. Resistência antimicrobiana nos animais e no ser humano. Há motivo para preocupação? **Semina: Ciências Agrárias**, v.33, n.2, p.775-790, 2012.

BECERRA, G. et al. Mecanismo de resistencia a antimicrobianos en bacterias. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología**, v. 29, n. 2, p. 70-76, 2009.

BERGER-BACHI, B.; McCALLUM, N. State of the knowledge of bacterial resistance. **International Journal of the Care of the Injured**, v.37, p.20-25, 2006.

BERRY, E. A.; HILLERTON, J. E. The effect of selective dry cow treatment on new intramammary infections. **Journal of Dairy Science**, v.85, n.1, p. 112-121, 2002.

BRASIL. Levantamento sistemático da produção agrícola – Ano de 2010. **Instituto Brasileiro de Pesquisa e Estatística (IBGE)**. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=74&z=t&o=24&i=P>>. Acesso em: 02 maio 2013.

BRITO, M. A.V.P. et al. Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n. 2, p. 129-135, 1999.

BRITO, M. A.V.P. et al. Concentração mínima inibitória de dez antimicrobianos para amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de infecção intramamária bovina. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Juiz de Fora, v. 53, n.5, p.531-537, 2001.

BRITO, M. A.V. P.; BRITO, J. R. F.; PORTUGAL, J. A. B. Identificação de contaminantes bacterianos no leite cru de tanques de refrigeração. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 57, n. 327, p. 83-88, 2002.

CARLTON, W. W.; McGAVIN, M. D. **Patologia Veterinária Especial**. 2 ed. Porto Alegre: ArtMed, 1998. 672p.

CARVALHO, L. B. et al. Contagem de células somáticas e isolamento de agentes causadores de mastite em búfalas (*Bubalus bubalis*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 1, p. 242-245, 2007.

CUNHA, A. P. Perfil de sensibilidade antimicrobiana de agentes contagiosos e ambientais isolados de mastite clínica e subclínica de búfalas. **Arq. Inst. Biol.**, v. 73, n.1, p.17-21, 2006.

DIAS, R. V. C. Principais Métodos de Diagnóstico e Controle da Mastite Bovina. **Acta Veterinaria Brasília**, v.1, n.1, p.23-27, 2007.

DINGWELL, R. T.; KELTON, D. F.; LESLIE, K. E. Management of the dry cow in control of peripartum disease and mastitis. **The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 19, n.1, p.235-265, 2003.

DRESCHER G. et al. Caracterização bioquímica e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de agentes bacterianos isolados de mastite subclínica ovina na região oeste de Santa Catarina. **Ciência Animal Brasileira**, v.11, n.1, p.188-193, 2010.

DUQUE, P. V. T.; BORGES, K. E.; PICCININ, A. Mastite Bovina: Descrição da doença e seus impactos na economia brasileira. In: II SIMPÓSIO DE PATOLOGIA VETERINÁRIA DO CENTRO-OESTE PAULISTA, 2005, Garça. **Anais eletrônicos...** Garça, FAMED, 2005. Disponível em: <<http://www.revista.inf.br/veterinaria05/anais/artigo20.pdf>>. Acesso em 02 maio 2013.

ERSKINE, R. J. et al. Advances in the therapy of mastitis. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.9, n.3, p.499-517, 1993.

ERSKINE, R. J. et al. Trends in Antibacterial Susceptibility of Mastitis Pathogens During a Seven-Year Period. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 1111-1118, 2002.

ERSKINE, R.J.; WAGNER, S.; DE GRAVES, F.J. Mastitis therapy and pharmacology. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.19, n.1, p.109– 138, 2003.

ERSKINE, R. J, et al. Bovine mastitis pathogens and trends in resistance to antibacterial drugs. National Mastitis Council Annual Meeting, 43, 2004, Charlotte NC. **Proceedings...**Charlotte: NMC, 2004. p. 400-414.

FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C.A.F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p. 1315-1320, 2004.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. **Qualidade do leite e controle de mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. 175p.

FREITAS, M. F. L. et al. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus coagulase positivos* isolados de leite de vacas com mastite no agreste do estado de Pernambuco. **Arq. Inst. Biol., São Paulo**, v.72, n.2, p.171-177, 2005.

GIAMMARINARO, P. et al. Development of a new oligonucleotide array to identify staphylococcal strains at species level. **Journal Clinical Microbiology**, v.43, n.8, p. 3673-80, 2005.

GRAVE, K.; WEGENER, H.C. Comment on: veterinarians' profit on drug dispensing. **Preventive Veterinary Medicine**, v.77, n.3, p.306-308, 2006.

GUARDABASSI L.; COURVALIN P. Modes of Antimicrobial Action and Mechanisms of Bacterial Resistance. In: AARESTRUP F.M. **Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin**. Washington: American Society for Microbiology, 2006. p. 1-18.

GUARDABASSI, L.; JENSEN, L. B.; KRUSE, H. **Guia de antimicrobianos em veterinária**. Porto Alegre: Artmed, 2010. 268 p.

GYLES, C. L. et al. **Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals**. 4 ed. Iowa: Blackwell, 2010. 643p.

HILLERTON, J. E.; BERRY, E. A. Treating mastitis in the cow: a tradition or an archaism. **Journal Applied Microbiology**, v. 98, n. 6, p.1250–1255, 2005.

HOLANDA Jr., E. V. et al. Impacto econômico da mastite em seis fazendas de Araxá – Minas Gerais. **Archivos Latinoamericano de Produção Animal**, v. 13, n. 2, p. 63-69, 2005

KONEMAN, E. W. et al. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 1465 p.

KORB, A. et al. Riscos para a saúde humana do uso de antibióticos na cadeia produtiva leiteira. **Rev. Saúde Públ. Santa Cat.**, v. 4, n. 1. p. 21-36, 2011.

KUMAR, R.; YADAV, B. R.; SINGH, R. S. Genetic determinants of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from milk of mastitic crossbred cattle. **Current Microbiology**, v.60, p. 379–386, 2009.

LANGONI, H. Complexidade etiológica na mastite bovina. In: ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITES, 3., 1999. Botucatu, SP. **Anais...** Botucatu, 1999. p.3-18.

MACHADO, T. R. O.; CORREA, M. G.; MARIN, J. M. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative Staphylococci isolated from mastitic cattle in Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.1, p. 278-282, 2008.

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

MAPA (**Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**), [2011]. Disponível em: <[http://www.sindilat.com.br/gomanager/arquivos/IN62_2011\(2\).pdf](http://www.sindilat.com.br/gomanager/arquivos/IN62_2011(2).pdf)>. Acesso em: 05 maio 2013.

MARTINEZ, J. L. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. **Environmental Pollution**, v. 157, n. 11, p. 2893-2902, 2009.

MATEU, E.; MARTIN, M. Why is anti-microbial resistance a veterinary problem as well? **Journal of Veterinary Medicine Series B-Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, v. 48, n. 8, p. 569-581, 2001.

MEDEIROS, E. S. et al. Perfil de sensibilidade microbiana *in vitro* de linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de vacas com mastite subclínica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n.7, p. 569-574, 2009a.

MEDEIROS, E. S. et al. Avaliação *in vitro* da eficácia de desinfetantes comerciais utilizados no pré e pós-*dipping* frente amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas de mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 1, p. 71-75, 2009b.

MOTA, R. A. et al. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 42, n. 6, p. 465-470, 2005.

MÜLLER, E.E. Qualidade do leite, células somáticas e prevenção da mastite. In: SUL-LEITE: SIMPÓSIO SOBRE SUSTENTABILIDADE DA PECUÁRIA LEITEIRA NA REGIÃO SUL DO BRASIL, 2002, Maringá. **Anais...** Maringá: 2002. p. 206-217.

MUNGATANA, N. K. et al. Effect of experimental *Staphylococcus aureus* mastitis on compositional quality of goat milk. **International Journal of Dairy Technology**, v. 64, n.3, p. 360-364, 2011.

NASCIF JR., I.A. **Diagnóstico da mastite subclínica bovina pela condutividade elétrica do leite, cmt e contagem de células somáticas: influência das estações do ano, fases da lactação e ordenhas da manhã e da tarde**. 2001. 47f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)-Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2001.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARD (NCCLS document M7-A4). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically**. Vollanova: Approved standard. 1997. 414 p.

NEVES, M. C. et al. Detecção de genes de resistência antimicrobiana em cromossomos e plasmídeos de *Staphylococcus* spp. **Arquivo do Instituto Biológico**, v.74, n.3, p.207-213, 2007.

OLIVEIRA, A. A. F. et al. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* frente a amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas de mastite subclínica bovina, no agreste meridional de Pernambuco. **A Hora Veterinária**, v. 22, n. 127, p. 8-10, 2002.

OLIVEIRA, L. et al. Enterotoxin production, enterotoxin gene distribution, and genetic diversity of *Staphylococcus aureus* recovered from milk of cows with subclinical mastitis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 72, n. 10, p. 1361-1368, 2011.

OLIVER, S. P.; MURINDA, S. E. Antimicrobial Resistance of Mastitis Pathogens. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 28, n. 2, p.165–185, 2012.

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

PEDRINI, S. C. B.; MARGATHO, L. F. F. Sensibilidade de microorganismos patogênicos isolados de casos de mastite clínica em bovinos frente a diferentes tipos de desinfetantes. **Arq. Inst. Biol., São Paulo**, v.70, n.4, p.391-395, 2003.

PHILLIPS I. et al. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, n. 1, p. 28–52, 2004.

PINTO, T. R. **Mastite**: Revisão. 2009. 30f. Dissertação (Pós-graduação *lato sensu* em higiene e inspeção de produtos de origem animal) - Universidade Castelo Branco, Rio de Janeiro, 2009.

QUINN, P. J. et al. **Clinical Veterinary Microbiology**. UK: Wolf, 1994. 648p.

QUINN, P. J. et al. **Veterinary Microbiology and Microbial Disease**. 2 ed. UK: Wiley-Blackwell, 2011. 928p.

RADOSTITS, O. M. et al. **Clínica veterinária**: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 1737p.

REBHUN, W.C. **Doenças do Gado Leiteiro**. São Paulo: Roca, 2000. 642p.

REIS, S.R.; SILVA, N.; BRESCIA, M.V. Antibioticoterapia para controle da mastite subclínica de vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, n.6, p.651-658, 2003.

RIBAS, N.P. Análise do Leite. **Revista Gado Holandês**, v.2, n.18, p. 26-31, 2004.

RIBEIRO, M. E. R. et al. Relação entre a mastite clínica, subclínica infecciosa e não infecciosa em unidades de produção leiteiras na região sul do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.9, n.3, p. 287-290, 2003.

RUEGG, P. L. Manejo durante o período seco visando a melhoria da qualidade do leite. In: CURSO DE NOVOS ENFOQUES NA PRODUÇÃO E REPRODUÇÃO DE BOVINOS, 7., 2004, Uberlândia. **Anais...Uberlândia**: 2004, p.263-271.

SÁ, M. E. P. et al. Importância do *Staphylococcus aureus* nas mastites subclínicas: pesquisa de enterotoxinas e toxina do choque tóxico, e a relação com a contagem de células somáticas.

Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, v. 41, n.5, p. 320-326, 2004.

SÁNCHEZ, A. et al. Influence of sampling time on bacteriological diagnosis of goat intramammary infection. **Veterinary Microbiology**, v.98, n. 3-4, p.329-332, 2004.

SANTOS M. V.; FONSECA L. F. L. **Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite**. São Paulo: Manole, 2007. 314p.

SARAN, A.; CHAFFER, M. **Mastitis y Calidad de leche**. Editorial Inter-Médica: Buenos Aires, Argentina. 2000. 196p.

SILVA, N. Doença da glândula mamária: mamite/mastite. In: MARQUES, D. C. **Criação de bovinos**. 7. ed. Belo Horizonte: Consultoria Veterinária e Publicações, 2003. p. 435 - 451.

SOARES, L. C. et al. Caracterização fenotípica da resistência a antimicrobianos e detecção do gene *mecA* em *Staphylococcus* spp. coagulase- negativos isolados de amostras animais e humanas. **Ciência Rural**, v.38, n.5, p.1346-1350, 2008.

SPANAMBERG, A. et al. Mastite micótica em ruminantes causada por leveduras. **Ciência Rural**, v.39, n.1, p.282-290, 2009.

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

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

TENOVER, F.C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **The American Journal of Medicine**, v. 119, n. 6, p. 3-10, 2006.

TIMONEY, J. F.; et al. **Hagan and Bruner's microbiology and infectious diseases of domestic animals**. 8 ed. Ithaca: Comstock Publishing Associates, 1988. 951p.

UDO, E. E. et al. Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococci in restaurant workers from Kuwait City may be a potential cause of food poisoning. **Journal Medical Microbiology**, v.48, n.9, p.819-823, 1999.

VAN DEN BOGAARD A. E.; STOBBERINGH E.E. Epidemiology of resistance to antibiotics: links between animals and humans. **International Journal of Antimicrobial Agents** , v.14, p. 327–335, 2000.

VIÇOSA, G.M. et al. Enumeration of coagulase and thermonuclease-positive *Staphylococcus* spp. in raw milk and fresh soft cheese: an evaluation of Baird-Parker agar, rabbit plasma fibrinogen agar and the Petrifilm™ Staph Express count system. **Food Microbiology**, v.27, n.4, p. 447- 452, 2010.

VIEIRA, L. S.; CAVALCANTE, A. C. R.; XIMENES, L. F. **Epidemiologia e controle das principais parasitoses de caprinos nas regiões semi – áridas do Nordeste do Brasil**. Embrapa Caprinos: Sobral, CE, 1998. 50p.

VILELA, D.; LEITE, J.L.B.; RESENDE, J.C. Políticas para o leite no Brasil: passado, presente e futuro. In: SUL-LEITE: SIMPÓSIO SOBRE SUSTENTABILIDADE DA PECUÁRIA LEITEIRA NA REGIÃO SUL DO BRASIL, 2002, Maringá. **Anais...** Maringá: 2002. p. 1-26.

WRIGHT, G. D. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.57, p.1451-1470, 2005.

ZAFALON, L. F. et al. Mastite subclínica causada por *Staphylococcus aureus*: custo-benefício da antibioticoterapia de vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.3, p.577-585, 2007.

ZOCCAL, R.; STOCK, L. A. Estrutura da produção de leite no Brasil. In: STOCK, L.A. et al. **Competitividade do Agronegócio do Leite Brasileiro**. Embrapa Informação Tecnológica: Brasília, 2011. 326p.