

# Aspectos das condições higiênico-sanitárias em unidades leiteiras em municípios do estado do Rio de Janeiro, Brasil e análise dos agentes bacterianos envolvidos na etiologia das mastites\*

Tatiani Abreu de Alencar<sup>1</sup>, Elaine da Conceição Liporage de Mendonça<sup>2</sup>, Viviane Figueira Marques<sup>3</sup>, Dayanne Araujo de Melo<sup>4</sup>, Anna Carolina Marins Rojas<sup>4</sup>, Cássia Couto da Motta<sup>4</sup>, Gabrielli Stefaninni Santiago<sup>4</sup>, Felipe Carlos Dubenczuk<sup>5</sup>, Pedro Trivisol de Castro Medeiros<sup>6</sup>, Shana de Mattos de Oliveira Coelho<sup>7</sup> e Miliane Moreira Soares de Souza<sup>8+</sup>

**ABSTRACT.** de Alencar T.A., de Mendonça E. da C.L., Marques V.F., de Melo D.A., Rojas A.C.M., da Motta C.C., Santiago G.S., Dubenczuk F.C., Medeiros P.T. de C., Coelho S. de M. de O. & de Souza M.M.S. [Features of hygienic-sanitary conditions at dairy units in the Municipalities from the State of Rio de Janeiro, Brazil and bacteriological analysis involved in the mastitis etiology.] Aspectos das condições higiênico-sanitárias em unidades leiteiras em municípios do estado do Rio de Janeiro, Brasil e análise dos agentes bacterianos envolvidos na etiologia das mastites. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 36(2):199-208, 2014. Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465, Km 7, Seropédica, RJ 23890-000, Brasil. E-mail: miliane@ufrj.br

Dairy industry performs a very social important activity that yielded more than three million jobs in the last decade. Mastitis, inflammation of the mammary gland that can be caused by several microorganisms, is one of the most important economic losses causes and the incorporation of adequate hygienic procedures to daily handling is considered the most efficient way to control it. Otherwise the indiscriminate use of antimicrobials is a negative feature in this control, raising the positive pressure selection and favoring the spread of resistance genes. The present study performed an epidemiologic inquiry and a bacteriological survey in five dairy farms located at South Fluminense Dairy Belt in the State of Rio de Janeiro. The obtained data showed that 80% of studied dairy properties presented unsatisfactory hygienic conditions in milking line and water supply. After bacteriological analysis a total of 201 isolates was obtained from milk samples being 85,07% (171/201) of *Staphylococcus* spp.

---

\*Recebido em 20 de agosto de 2012.

Aceito para publicação em 14 de janeiro de 2014.

<sup>1</sup> Economista-doméstica, Programa de Pós-Graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação Agropecuária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465, Km 7, Seropédica, RJ 23890-000, Brasil. E-mail: tatianimedvet@yahoo.com.br - bolsista Capes.

<sup>2</sup> Médica-veterinária. MSc. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465, Km 7, Seropédica, RJ 23890-000. E-mail: elaineliporage@yahoo.com.br

<sup>3</sup> Bióloga, MSc. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465, Km 7, Seropédica, RJ 23890-000. E-mail: vivifigueira@yahoo.com.br

<sup>4</sup> Médica-veterinária, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465, Km 7, Seropédica, RJ 23890-000. E-mails: daymelo@gmail.com, ca.damotta@hotmail.com, acacmar@gmail.com, gabrielliss@hotmail.com - bolsistas Capes.

<sup>5</sup> Curso de Graduação em Medicina Veterinária, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465, Km 7, Seropédica, RJ 23890-000. E-mail: felipe\_c\_d@hotmail.com - bolsista PIBIC (CNPq/UFRJ).

<sup>6</sup> Curso de Graduação em Medicina Veterinária, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465, Km 7, Seropédica, RJ 23890-000. E-mail: pedrotrivisol@hotmail.com

<sup>7</sup> Bióloga, DSc. Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465, Km 7, Seropédica, RJ 23890-000. E-mail: shana@ufrj.br

<sup>8</sup> Médica-veterinária, *PhD*. Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465, Km 7, Seropédica, RJ 23890-000. + Autora para correspondência, E-mail: miliane@ufrj.br - bolsista CNPq.

and 14,93% of Gram-negative rods (30/201). From milking line samples it was obtained 70 isolates being 80% (56/70) *Staphylococcus* spp. and 20% (14/70) Gram-negative rods. Antimicrobial resistance assays revealed high rates of beta-lactamic resistance in *Staphylococcus* spp. and azithromycin, tetracycline and doxycycline resistance in Gram-negative rods.

KEY WORDS. Mastitis, antimicrobial resistance, sanitary handling.

**RESUMO.** O sistema agroindustrial do leite tem grande importância social tendo gerado na última década acima de três milhões de empregos. A mastite, inflamação da glândula mamária que pode ser causada por diversos microrganismos, é uma das principais causas de prejuízos econômicos do setor, e a incorporação de procedimentos adequados de higiene incorporados a rotina de manejo é a mais eficiente forma de controle da mastite. Por outro lado, o uso indiscriminado de antibióticos nas matrizes é um dos aspectos negativos no controle da mastite, aumentando a pressão positiva de seleção e favorecendo a dispersão de genes envolvidos nos mecanismos de resistência antimicrobiana. O presente estudo realizou uma investigação epidemiológica e uma pesquisa bacteriológica em cinco unidades produtoras de leite localizadas na bacia leiteira sulfluminense do estado do Rio de Janeiro. Dados obtidos mostraram que 80% das propriedades apresentavam condições insatisfatórias de higiene na linha de ordenha e no abastecimento de água abaixo dos parâmetros de potabilidade. Foram obtidos 201 isolados do leite, sendo 85,07% (171/201) pertencentes ao gênero *Staphylococcus* spp. e 14,93% bastonetes Gram-negativos (30/201) e da linha de ordenha foram obtidos 70, sendo 80% (56/70) Os ensaios de resistência antimicrobiana revelaram altos níveis de resistência aos beta-lactâmicos entre os isolados de *Staphylococcus* spp. e à azitromicina, tetraciclina e doxiciclina nos bastonetes Gram-negativos.

PALAVRAS-CHAVE. Mastite, resistência antimicrobiana, manejo sanitário.

## INTRODUÇÃO

Dentre as diversas cadeias produtivas que representam a base de produção do país, a cadeia produtiva do leite pode ser considerada uma das mais complexas e representativas do agronegócio brasileiro, pois gerou na última década, acima de três milhões de empregos e agregou mais de seis bilhões á agropecuária nacional (Santini et al. 2009, Carvalho et al. 2009). O consumo de leite anual no Estado do Rio de Janeiro é de 3,2 bilhões de litros de leite por dia (FAERJ/SEBRAE 2010). Consi-

derando este cenário e as exigências feitas pelas indústrias beneficiadoras de um produto de boa qualidade sanitária, é preciso identificar os pontos críticos do processo produtivo, a fim de implementar medidas que visem garantir a qualidade do leite.

Nesse contexto, destaca-se a mastite, inflamação da glândula mamária, que pode ser causada por diversos microrganismos, e que, em resposta, desencadeia o aumento de proteínas plasmáticas e células leucocitárias sanguíneas mobilizadas do sangue para o tecido mamário. O aumento das células somáticas no leite provoca danos nos tecidos glandulares e conseqüentemente a diminuição da secreção do leite acarretando prejuízos econômicos para o produtor (Aires 2010).

A mastite infecciosa pode ser de origem contagiosa ou ambiental. A mastite contagiosa é causada por patógenos cujo *habitat* preferencial é o interior da glândula mamária e a superfície da pele das tetas, caracterizando-se por baixa incidência de casos clínicos e alta incidência de casos subclínicos, acompanhado de alta contagem de células somáticas (CCS), sendo a ordenha, o principal momento de sua transmissão. As espécies do gênero *Staphylococcus* spp. destacam-se em sua etiologia e podem produzir fatores de virulência que facilitam a colonização e a infecção da glândula mamária permitindo o escape das células de defesa do sistema imune (Coelho et al. 2011). De igual modo, apresentam mecanismos de resistência que podem neutralizar a ação de antibióticos dificultando sua eliminação. Dentre os fatores que contribuem para a disseminação desses agentes no rebanho, o elemento humano é o mais importante, pois o homem alberga *S. aureus* em suas mucosas nasais e faríngeas, nas mãos e na pele, e pode transmitir estes agentes aos animais, utensílios e equipamentos de ordenha.

A mastite ambiental é associada a agentes que estão presentes predominantemente no *habitat* normal dos animais, em locais que apresentam esterco, urina, barro e camas orgânicas. Esse tipo de mastite caracteriza-se pela alta incidência de casos clínicos, de curta duração, frequentemente com a manifestação aguda e com maior ocorrência nos momen-

tos de pré e pós-parto. A porta de entrada para a bactéria é o esfíncter do teto, por isso a integridade desta estrutura é um dos fatores importantes para evitar a contaminação (Carneiro 2009). A contaminação do teto pode ocorrer através das instalações, através das mãos do ordenhador ou através das teteiras da ordenhadeira mecânica entre outros.

A mais eficiente forma de controle da mastite é a adoção de práticas adequadas de higiene, através de atividades simples incorporadas ao manejo rotineiro da fazenda leiteira (Santos et al. 2003). No entanto, a implementação de práticas higiênico-sanitárias eficazes é um desafio constante, que implica em mudanças na forma de manejo e confronta hábitos culturais, sociais e econômicos. Vários cuidados devem ser observados: a manutenção e limpeza do ambiente em que as vacas ficam alojadas, a condução dos animais para linha de ordenha de forma calma e ordenada, a separação dos animais com mastite clínica e subclínica para evitar a disseminação dos patógenos circulantes, o preparo do úbere para ordenha através do *pré-dipping*, a higienização das teteiras na ordenha mecânica e das mãos, na manual, a calibração dos equipamentos e o tempo de ordenha, a realização do *pós-dipping* e a manutenção dos animais em estação após a ordenha, são medidas que evitam a disseminação de microrganismos no rebanho e previnem a mastite (Wattiaux 2000, Hachem 2005).

Um dos aspectos negativos no controle da mastite é o uso indiscriminado de antibióticos nas matrizes, aumentando a pressão positiva de seleção e favorecendo a dispersão de genes envolvidos nos mecanismos de resistência antimicrobiana. Isso ocorre porque vários fatores impedem ou dificultam a implementação de uma rotina diagnóstica nas propriedades leiteiras, entre eles, distância dos centros de diagnóstico, custo dos exames laboratoriais, dificuldade na compreensão da importância deste monitoramento por parte do pessoal envolvido no processo de produção (Pereira et al. 2010). Assim, rotineiramente, a escolha do medicamento anti-mastítico tem sido feita de forma empírica, baseada apenas no quadro clínico da enfermidade, ou ainda na chamada terapia profilática. Embora o uso profilático de antimicrobianos por via intramamária no final do período de lactação seja considerado um componente importante dos programas de controle de mastite (Erskine et al. 2002), outros modos de uso, como por exemplo, a utilização de antibióticos como aditivos alimentares na produção animal, com liberação de resíduos nos produtos de-

rivados, é considerada um risco crescente para a saúde humana, devido a uma possível contribuição na geração de cepas resistentes de microrganismos que podem ser transmitidas ao ser humano pela ingestão de produtos de origem animal.

O objetivo do presente trabalho foi reconhecer a realidade do sistema de produção em cada propriedade estudada, com a avaliação das condições de ordenha e identificação de agentes bacterianos no leite e na cadeia produtiva, e o conhecimento de seus perfis de resistência de modo a servir de subsídio para o desenvolvimento apropriado de programas de prevenção e de terapias bem sucedidas, uma vez que o manejo positivo resultará em benefícios produtivos, sem elevação dos custos, podendo contribuir para o aumento da rentabilidade, melhoria do bem estar dos animais e das pessoas envolvidas na atividade.

## MATERIAL E MÉTODOS

Quatro unidades produtoras de leite bovino no município de Rio Claro, RJ e uma em Piraí, RJ foram avaliadas através de um instrumento diagnóstico contendo informações relativas ao manejo nutricional, higiênico e sanitário, bem como enfermidades, tratamento, evolução, mortalidade, formas de identificação, prevenção e tratamento de mastite entre outras. Também foram avaliadas as condições de higiene ambiental, com ênfase à sala/área de ordenha, vasilhames, ordenhadeira mecânica e do próprio ordenhador.

Imediatamente antes da ordenha, foi realizado o *California Mastitis Test* (CMT) de todos os animais em lactação e 20% destes considerados positivos foram segregados para coleta. Os jatos de leite foram coletados diretamente em frascos estéreis, e juntamente com *swabs* contendo amostras das cavidades nasais, das mãos dos ordenhadores e dos utensílios utilizados durante a ordenha. Também foram coletados, em frascos estéreis, 1L de água proveniente direto dos pontos de saída utilizados nas salas de ordenha, e todos os materiais foram encaminhados ao Laboratório de Bacteriologia Veterinária, Instituto de Veterinária/UFRRJ.

As amostras foram submetidas à rotina de identificação que consistiu em inoculação em ágar Müeller Hinton (MH) contendo 5% sangue desfibrinado de carneiro (AS), incubação a 37°C por 24 horas, em anaero e aerobiose, e análise das características coloniais e morfotintórias. De acordo com as características encontradas os isolados foram processados para melhor identificação segundo protocolos estabelecidos na literatura (Kone-man et al. 2008).

Os isolados de *Staphylococcus* spp. também foram caracterizados genotipicamente. A extração do DNA bacteriano foi realizado segundo protocolo adaptado pelo LABAC-VET/UFRRJ (Mendonça et al. 2012). Inicialmente foi realizada uma PCR multiplex para os genes

Quadro 1. Iniciadores e ciclos empregados para amplificação dos genes de identificação das espécies de *Staphylococcus* spp. coagulase-positivos.

Gene	Espécie	Primer (5' - 3')	Ciclo <sup>a</sup>
<i>Staph</i> (756 pb)	<i>Staphylococcus</i> spp.	AAC TCT GTT ATT AGG GAA GAA CA CCA CCT TCC TCC GGT TTG TCA CC	1
<i>DNAr</i> (930 pb)	<i>S. aureus</i>	ACG GAG TTA CAA AGG ACG AC AGC TCA GCC TTA ACG AGT AC	1
<i>Coa</i> (v) <sup>b</sup>	<i>Staphylococcus</i> coagulase-positivos	ATA GAG ATG CTG GTA CAG G GCT TCC GAT TGT TCG ATG C	2
<i>nuc 3 e 4</i> (431 pb)	<i>S. intermedius</i>	GCC CCT GCA ATG AGA GG CGG ACC ACT TTC CGT C	3
<i>pta</i> (320pb)	Grupo SIG	AAA GAC AAA CTT TCA GGT AA GCA TAA ACA AGC ATT GTA CCG	4

<sup>a</sup> 1. 94°C 5min. (94°C 1min, 55°C 1 min., 72°C 1 min) x 30 e 72°C 10min; 2. 94°C 4min. (94°C 1min, 60°C 1 min., 72°C 1 min) x 30 e 72°C 5min; 3. (95°C 50s., 42°C 2 min., 72°C 4 min) x 40 e 72°C 1 min; 4. 95°C 2min. (95°C 1min, 53°C 1 min., 72°C 1 min) x 30 e 72°C 7min. b. v: fragmento variável

característicos de *Staph* (*Staphylococcus* spp.) (Zhang et al. 2004) e *S. aureus* (*DNAr*) (Straub et al. 1999), e adicionalmente foi realizada a detecção do gene *coa* (Karahana & Cetinkaya 2006). Após essa etapa, foram realizadas amplificações dos genes espécie-específicos, *S. intermedius* (*nuc 3 e 4*) (Silva et al. 2003) e SIG (*pta*) (Bannoehr et al. 2007) para outras espécies de estafilococos coagulase positivos (ECP) (Quadro 1).

Os isolados foram suspensos em caldo BHL, incubados durante 24 horas a uma temperatura de 37°C e diluídos na concentração do tubo 0,5 da escala de McFarland, equivalente a  $1,5 \times 10^6$  células/mL. Tal concentração foi ajustada através do espectrofotômetro de absorvância, onde a densidade correta de turbidez variou de 0,08 a 0,1 utilizando comprimento de onda de 625nm. Para comparação e controle dos testes foram utilizadas cepas padrão ATCC 43300 *S. aureus* e ATCC 25922 *E. coli* obtidas junto ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade/INCQS/FIOCRUZ.

Ensaio de Difusão em disco simples foram realizados conforme o preconizado pelo CLSI veterinário (2008) e humano (2012). A escolha dos antibióticos foi feita a partir de informações dos fármacos mais utilizados nas propriedades para o tratamento da mastite e algumas classes de interesse. Foram testados: Tetraciclina (30µg), Gentamicina (10µg), Enrofloxacinina (10µg), Cefalotina (30µg), Ampicilina (10µg), Penicilina (10UI), Sulfametoxazol-trimetropim (25µg) para os cocos Gram positivos e Ciprofloxacina (5µg), Neomicina (30µg), Azitromicina (15µg), Doxiciclina (30µg) e Norfloxacina (15µg), Tetraciclina (30µg), Gentamicina (10µg) e Sulfametoxazol-trimetropim (25µg) para os bastonetes Gram negativos.

## RESULTADOS

As características das propriedades visitadas, bem como os resultados do instrumento diagnóstico aplicados, estão dispostos nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

Das 140 amostras de leite foram obtidos 201 isolados, sendo 85,07% (171/201) pertencentes ao gê-

nero *Staphylococcus* spp. e 14,93% bastonetes Gram negativos (30/201).

A identificação fenogenotípica dos *Staphylococcus* spp. revelou 59% (101/171) de *Staphylococcus* spp. coagulase negativos e 41% (70/171) de *Staphylococcus* spp. coagulase positivos, através da amplificação dos genes *Staph* e *coa*. Dentre as espécies coagulase-positivas identificadas obteve-se 24,28% (17/70) de *S. aureus*, 8,57% de *S. intermedius* (6/70) e 5,71% (4/70) de *Staphylococcus* spp. coagulase positivos do grupo SIG, de acordo com o perfil bioquímico e a amplificação dos genes específicos de caracterização. Os demais 61,42% (43/70) isolados foram fenotipicamente caracterizados como estafilococos coagulase-positivos, no entanto não amplificaram qualquer dos genes de caracterização específica utilizados: *DNAr* de *S. aureus*, *nuc3*, *nuc4* e *pta*. Desse modo, eles serão referenciados aqui como ECP.

Quanto às espécies de bastonetes Gram negativos, 30% (9/30) foram identificados como *Proteus mirabilis*, 20% (6/30) como *Proteus vulgaris*, 6,66% (2/30) *Serratia liquefaciens*, 3,33% (1/30) *Serratia rubidaeeae*, 1,49% (3/201) *E.coli*, 3,33% (1/30) de *Morganella morganii*, 3,33% (1/30) *Klebsiella pneumoniae*, 10% (3/300) de *Citrobacter freundii*, 3,33% (1/30) de *Citrobacter diversus* e 3,33% (1/30) de *Hafnia alvei*.

O isolamento bacteriano a partir da linha de ordenha produziu um total de 70 isolados, sendo 80% (56/70) de *Staphylococcus* spp. e 20% (14/70) de bastonetes Gram negativos. Dentre os *Staphylococcus* spp., 65,71% (46/56) foram identificados como ECN, 12,5% (7/56) como ECP, 3,57% (2/56) *S. intermedius* e 1,78% (1/56) *S. aureus*. Dentre as espécies de bastonetes Gram negativos, obteve-se 42,85% *S. rubidaeeae* (6/14), 50% (7/14) *C. diversus* e 7,14% (1/14) *E. coli*.

Tabela 1. Caracterização geral das fazendas da Bacia Leiteira Sulfluminense, RJ.

Fazenda	Características gerais das propriedades							
	Local <sup>a</sup>	Total de Vacas em lactação	Tipo de rebanho	Vol. de leite diário	Tipo de ordenha	% mastite clínica	% CMT positivo	
A	P	200	115	holandês	1700	mecânica	7,82%	80%
B	RC	52	25	Mestiço	105	manual	16%	66,66%
C	RC	200	127	girolando	2000	mecânica	3,14%	68,50%
D	RC	50	25	girolando	100	manual	0%	60%
E	RC	50	46	girolando	130	manual	0%	20%

<sup>a</sup> P: Pirai, RC: Rio Claro.

Tabela 2. Resultados do instrumento diagnóstico em comparação ao CMT detectado em cada fazenda.

Fazendas	Parâmetros	Satisfatórias	Insatisfatórias
A (80% CMT positivo)	Condições dos animais	63%	37%
	Linha de ordenha	90%	10%
	Higiene pessoal	40%	60%
B (66,66% CMT positivo)	Condições dos animais	33%	77%
	Linha de ordenha	0	100%
	Higiene pessoal	16%	84%
C (68,50% CMT positivo)	Condições dos animais	11%	89%
	Linha de ordenha	33%	77%
	Higiene pessoal	60%	40%
D (60% CMT positivo)	Condições dos animais	44%	56%
	Linha de ordenha	33%	77%
	Higiene pessoal	20%	80%
E (20% CMT positivo)	Condições dos animais	33%	77%
	Linha de ordenha	0	100%
	Higiene pessoal	40%	60%

As análises realizadas a partir das amostras de água, demonstraram que das 5 propriedades avaliadas, quatro delas apresentaram resultados fora dos padrões de potabilidade estipulados pelo Ministério da Saúde (Brasil, 2004). Após análise do total de bactérias identificadas, tanto isoladas a partir do leite quanto da linha de ordenha, as espécies prevalentes foram destacadas de acordo com seu sítio de coleta em cada propriedade avaliada, conforme demonstra a Tabela 3.

Após a realização do teste de difusão em disco para os 171 *Staphylococcus* spp. isolados de amostras de leite e 70 isolados da cadeia produtiva, foi possível detectar um elevado percentual de resistência à penicilina (80% e 90%, respectivamente) e ampicilina (70% e 80%, respectivamente). Já frente à enrofloxacina e gentamicina os percentuais de resistência foram inferiores a 30%. Os isolados a partir da linha de ordenha apresentaram níveis de resistência maiores do que os obtidos a partir do leite, conforme expresso na Figura 1.

Os bastonetes Gram negativos, isolados tanto a partir do leite (n=30) quanto da cadeia produtiva (n=14), apresentaram níveis elevados de resistência à azitromicina (80% e 90%, respectivamente) e tetraciclina (80% em ambos). A ciprofloxacina foi o antibiótico mais eficaz frente aos isolados a partir

da linha de ordenha (0% de resistência) e, em adição a associação de sulfametoxazol+trimetopim e norfloxacina apresentou maior eficácia do que os demais antibióticos. Já frente aos isolados obtidos a partir do leite a ciprofloxacina junto com a neomicina e a gentamicina foram os antibióticos mais eficazes, uma vez que os bastonetes apresentaram níveis de resistência inferiores a 30%, conforme apresentado na Figura 2.

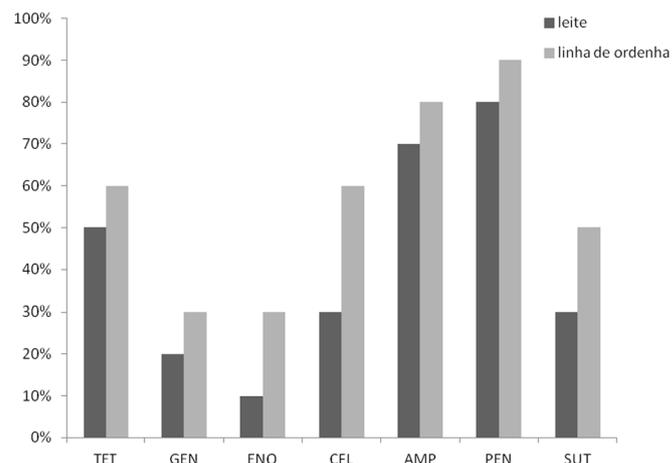
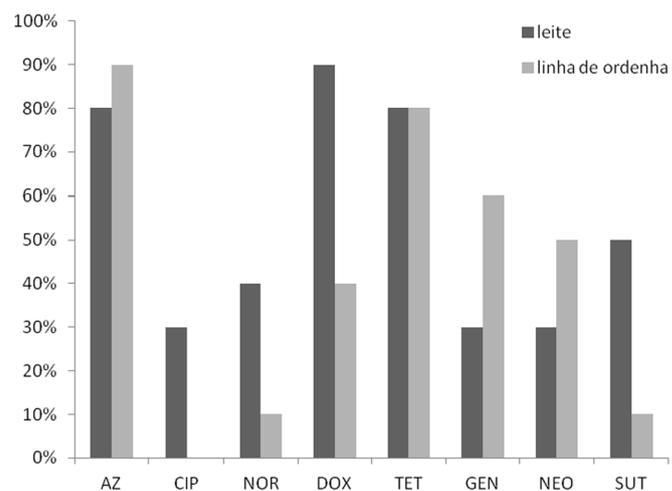
Figura 1. Percentuais de resistência dos *Staphylococcus* spp. obtidos a partir do leite e da cadeia produtiva aos antimicrobianos testados.

Figura 2. Percentuais de resistência dos bastonetes Gram negativos isolados do leite e da cadeia produtiva aos antibióticos testados.

Tabela 3. Frequência das espécies bacterianas nas propriedades avaliadas.

Fazendas	Amostras				Água <sup>b</sup>	
	Leite	Mão	Mucosa nasal	Ordenhadeira	Col. TT (NMP/100mL)	Col. TM (NMP/100mL)
A	ECN	ECN		ECN		
	(23/70)	(1/2)		(3/5)		
	ECP	ECP		ECP		
	(10/70)	(1/2)	NHC <sup>a</sup>	(2/5)	< 2	< 2
	<i>P. mirabilis</i>			<i>S. intermedius</i>		
	(4/70)			(1/5)		
B	-	-	NHC	-	13	2
	ECN	ECN	ECP	ECN		
	(52/99)	(8/19)	(1/3)	(13/18)		
	ECP	<i>C. diversus</i>	<i>C. diversus</i>	ECP		
C	(16/99)	(6/19)	(1/3)	(3/18)	90	9
	<i>P. mirabilis</i>		<i>S. rubiadaea</i>	<i>S. rubidae</i>		
	(5/99)		(1/3)	(2/2)		
	<i>P. vulgaris</i>					
	(5/99)					
D	ECN	ECN	ECN	-		
	(12/23)	(5/5)	(2/2)		33	27
	ECP					
	(6/23)					
E	ECN	ECN		ECN	13	2
	(11/26)	(2/2)	-	(1/1)		
	ECP					
	(8/26)					

a: Não houve coleta de material devido à recusa dos ordenhadores. b: Col. TT: coliformes totais, Col. TM: coliformes termotolerantes.

## DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Em quatro dos cinco rebanhos avaliados, a frequência de animais CMT positivos foi superior a 50%. Foi observado que embora as fazendas A e C assemelhem-se no que diz respeito à estrutura da propriedade, número de animais, volume de leite ordenhado e tipo de ordenha e atenderem às exigências estipuladas pela legislação vigente no que concerne as instalações, equipamentos e infraestrutura da sala de ordenha, em ambas foi detectado um elevado percentual de animais CMT positivos semelhante ao encontrado nas fazendas B e D que são propriedades que praticam produção familiar e ordenha manual. Estes fatores desmistificam a associação do cenário tecnológico aos parâmetros como qualidade do leite e sanidade do rebanho, apontando para a importância da capacitação da mão de obra atuante na linha de ordenha vinculada a hábitos sistemáticos de higiene, independente da realidade tecnológica da propriedade.

Ao analisar os dados do diagnóstico das condições higiênico-sanitárias associadas aos animais, ambiente de ordenha e a equipe atuante na linha de ordenha e comparar ao CMT detectado (Tabela 2), observa-se que embora a fazenda A tenha apresentado os resultados mais satisfatórios quanto às variáveis associadas às condições dos animais e linha de ordenha, foi detectado um elevado percentual

de vacas CMT positivo. Este resultado pode estar relacionado à insuficiência nos parâmetros relacionados a higiene pessoal, aspecto comum em todas as propriedades, o que pode ser aferido pelo crescimento microbiano a partir do isolamento utilizando amostras de leite e das mãos dos ordenhadores conforme a tabela 3. Outro importante aspecto a ser considerado é a questão genético-racial, pois os animais desta propriedade eram da raça holandesa, que embora apresentem características genéticas que lhe conferem maior produção de leite, possuem tetos pendulares mais próximos ao chão e musculatura mais flácida. Coentrão et al. (2008), relataram que a profundidade do úbere é um fator de risco importante, onde os animais que apresentam a base do úbere baixo ou próximo ao jarrete apresentam 1,73% vezes mais chances de terem a CCS acima de 200.000 células/mL, do que os animais com a base acima do jarrete. Oliveira et al. (2012), em estudo que avaliou os fatores de riscos da mastite, observaram uma menor frequência de positividade pelo exame microbiológico, em animais mestiços em relação a raça holandesa.

Em contrapartida, a fazenda E que obteve menor percentual de animais CMT positivos, apresentou resultados insatisfatórios nos aspectos relacionados aos cuidados com a higiene do animal, entre outros procedimentos inadequados como a

realização incorreta do pré e pós-*dipping*, péssimo estado de limpeza do curral de espera e bebedouros. No entanto, foi observada a permanência dos bezerros com as mães durante, e alguns minutos após a ordenha. Este procedimento contribui para a retirada do leite residual, prevenindo o desenvolvimento de microrganismos causadores de mastite. Oliveira et al. (2011), ao avaliarem a prevalência da mastite bovina no estado do Pará, detectaram que mesmo com a falta de higiene durante a ordenha, o número de animais acometidos foi considerado baixo, provavelmente pela baixa produção de leite e a permanência do bezerro ao pé após a ordenha.

Ao avaliar o aspecto higiene pessoal foi possível observar o cumprimento de algumas ações elencadas no instrumento diagnóstico, no entanto, a qualidade dessas ações não correspondeu em eficácia com o resultado final. Nas propriedades A e C havia desvio de função na equipe técnica onde pessoas responsáveis por funções como limpeza do curral, sala de espera e encaminhamento dos animais até a linha de ordenha entravam no fosso e manipulavam os equipamentos e utensílios de ordenha, não procedendo à higiene adequada para tais atividades, também foi observado que os animais da propriedade C não apresentavam boas condições de higiene. Segundo McFarland et al. (2000) o treinamento de pessoal, principalmente dos ordenhadores, considerando os princípios de higiene, fisiologia da lactação, funcionamento e manutenção do equipamento de ordenha é essencial para obtenção de resultados eficazes no programas de prevenção da mastite.

A prevalência de *Staphylococcus* spp. justifica-se pelo fato destas bactérias fazerem parte da microbiota saprófita da pele, da mucosa oral e nasal de humanos e animais, além de estarem amplamente distribuídos no ambiente. Embora medidas preventivas que visam o controle da mastite possam ser praticadas, as infecções da glândula mamária causadas por estes patógenos ainda são muito frequentes (Freitas 2005). Por isso, estes microrganismos tem sido apontados como os principais causadores de mastite de origem contagiosa estando relacionados principalmente à mastite subclínica, corroborando com os resultados encontrados no presente trabalho.

Dentre o gênero *Staphylococcus* spp., o grupo prevalente foi o de *Staphylococcus* coagulase-negativos (ECN), que tem sido considerado agente patogênico emergente da mastite bovina (Pyorala et al. 2009). São caracterizados por serem microrganismos essencialmente oportunistas, que apro-

veitam inúmeras situações orgânicas para produzir graves infecções, colonizando o canal do teto e penetrando até aos tecidos secretores, no caso da mastite (Cunha et al. 2002). A frequência de isolamento dos *Staphylococcus* coagulase-negativos a partir de mastites clínicas e subclínicas em vacas e novilhas de todo o mundo tem aumentado consideravelmente, tornando-os agentes emergentes na mastite bovina (Freitas et al. 2005, Soares et al. 2009). Tem sido relatado que, de modo geral, ECN tende a estar implicado em casos de mastite subclínica, causando uma infecção leve, que pode evoluir para cura espontânea ou se agravar, causando alterações na CCS e apresentando os sinais clínicos clássicos de mastite clínica (Amaral et al. 2003). No presente trabalho, foi possível observar que a maior frequência de isolamentos dos ECNs se deu a partir das amostras de leite de vacas que apresentavam CMT + ou ++, mesmo em apenas um dos tetos, tendo menor frequência em amostras de animais que apresentavam CMT +++.

A espécie *S. aureus* foi encontrada em 8,45% (17/201) das amostras de leite. Essa bactéria é conhecida mundialmente como um patógeno em homens e animais, sendo um dos agentes etiológicos mais comuns da mastite clínica e subclínica. Esta espécie pode apresentar diversos fatores de virulência que visam contribuir para sua persistência no tecido mamário (Yang et al. 2012). De acordo com Freitas et al. (2005), além de *S. aureus*, outros coagulase-positivos também podem ser implicados nesta etiologia.

No presente trabalho, houve um significativo percentual de *Staphylococcus* coagulase-positivos cuja identificação em nível de espécie não pode ser concluída através da metodologia padronizada, sendo referenciados como ECP. Tal fato requer uma abordagem metodológica diferenciada que possibilite a identificação destes agentes e a melhor compreensão de seu envolvimento com os casos de mastite estudados. *Staphylococcus intermedius* e *Staphylococcus* do grupo SIG foram isolados em menor proporção. Em estudo desenvolvido por Moroni et al. (2006), verificou-se que *S. intermedius* foi isolado em 12,20%, das 82 amostras de leite avaliadas. Recentemente, um grupo de pesquisa conseguiu realizar o sequenciamento de locus dessa espécie demonstrando que esta era implicada de modo equivocado na etiologia de muitas enfermidades em animais (Bannoehr et al. 2009). A análise genotípica revelou as espécies *S. intermedius*, *Staphylococcus pseudintermedius* e *S. delphini*, as quais eram classificadas fenotipicamente como *S. intermedius*,

assim surgiu o grupo *S. intermedius* (SIG) (Bannoehr et al. 2007, Devriese et al. 2008). Assim também foi descoberto que *S. pseudintermedius*, e não *S. intermedius*, é o patógeno de muitas doenças animais e que *S. delphini* foi isolado a partir de várias espécies animais, podendo ser mais importante clinicamente do que se pensava (Devriese et al. 2008). O recém-identificado *S. pseudintermedius* (Devriese et al. 2005) é ocasionalmente isolado de infecções humanas graves, e a emergência e propagação de cepas de *S. pseudintermedius* resistentes à metilicina são os principais problemas de saúde veterinária e pública (Descloux et al. 2008).

Foram isoladas espécies diversificadas de bastonetes Gram negativos a partir do leite e da linha de ordenha. Estes microrganismos são frequentemente encontrados no solo, fezes, urina e nos materiais utilizados na cama desses animais, sendo responsáveis por causar mastite de origem ambiental e associados a casos severos de mastite clínica com tendência a evolução hiperaguda e ocasionalmente fatal (Hirsh et al. 2003). Logo, a manutenção das condições de higiene da linha de ordenha e outras instalações utilizadas pelos animais é preponderante, pois visa prevenir a veiculação destes microrganismos para os utensílios e equipamentos de ordenha utilizados (Aires 2010). Estas medidas também são fundamentais para qualidade sanitária e físico-química do leite que uma vez contaminado por bactérias, pode estar suscetível à degradação de proteínas, gorduras e minerais importantes para o seu beneficiamento. O isolamento de bastonetes Gram negativos da ordenhadeira mecânica na propriedade C reforça o nível crítico da higiene na linha de ordenha apontado na Tabela 3.

Quanto a análise da qualidade microbiológica da água, Lacerda et al. (2009) em estudos realizados na região de Minas Gerais constatou que 90% da água utilizada nos processos de ordenha estavam fora dos padrões estipulados e adequados para o consumo humano. Apenas a propriedade A apresentou resultados das análises para coliformes totais e termotolerantes dentro dos parâmetros de potabilidade estipulados. Este fato pode estar associado ao aquecimento do sistema de água para abastecimento da sala de ordenha, contribuindo para as satisfatórias condições de higiene associadas à linha de ordenha (Tabela 2). No entanto, foi a propriedade que apresentou maior percentual de positividade ao CMT, corroborando com texto anterior, estes resultados podem estar relacionados à realização inadequada do pré-dipping e da higienização das mãos dos ordenhadores. Entre as demais,

a propriedade C apresentou maiores valores tanto para coliformes totais quanto para termotolerantes, sendo 90NMP/100mL e 9NMP/ mL, respectivamente, e maior grau de contaminação bacteriana tanto no leite quanto na linha de ordenha.

Foi detectada uma elevada resistência aos beta-lactâmicos entre os isolados de *Staphylococcus* spp. Coelho (2008), em estudos realizados na mesma região detectou um percentual de 64% de resistência à penicilina em 150 isolados de *Staphylococcus* spp. isolados de leite mastítico. A utilização indiscriminada destes princípios ativos nas propriedades visitadas foi evidenciada através do inquérito epidemiológico realizado durante as visitas, onde foi possível constatar que a penicilina é um dos antibióticos mais escolhidos para o tratamento empírico dos casos de mastite e outras doenças bacterianas de bovinos. A resistência à tetraciclina detectada também é preocupante pelo fato deste antimicrobiano ser amplamente utilizado no tratamento da mastite. Brito et al. (2001) no Brasil detectaram 91% de resistência à tetraciclina em isolados de mastite bovina. O aumento da resistência a este antimicrobiano pode estar relacionado a associação da neomicina à bacitracina e tetraciclina, que tem sido utilizada no tratamento da mastite bovina, com a intenção de potencializar a ação dos mesmos. Os dados do presente trabalho corroboram estudos de campo que consideram a gentamicina como um antibiótico ainda eficaz no tratamento das mastites bovinas de origem estafilocócica (Langoni et al. 2000).

A enrofloxacin é uma quinolona de uso veterinário, não muito difundida em ambientes de produção leiteira, restrita ao tratamento de mastites clínicas. Langoni et al. (2000) encontraram 28% (n=55) de resistência a este antibiótico em isolados de *Staphylococcus* spp. provenientes de quadros de mastite. Da mesma forma, Marinho et al. (2002), ao avaliarem *S. aureus* e *Staphylococcus* spp. isolados de leite mastítico, detectaram níveis de resistência de 28,37% e 26,04%, respectivamente, à ação da enrofloxacin na região de Botucatu, SP. O fato deste medicamento ser de uso restrito ao tratamento animal contribui para a baixa resistência detectada. É importante destacar que em isolados das mãos dos ordenhadores foi detectado um percentual de resistência à enrofloxacin de 57% (12/21), a relevância desse dado deve ser avaliada quanto à circulação dessa resistência.

Estudos que avaliaram a resistência à sulfametoxazol+trimetropim em isolados de *Staphylococcus* spp. de leite mastítico reportaram dis-

tintos níveis de resistência. Machado et al. (2008) reportaram 47,8% (n=57), e em controvérsia, Zafalon et al. (2007) observaram apenas 2,7% de resistência e Oliveira et al. (2011) detectaram 0% de resistência a esse fármaco. A cefalotina é uma cefalosporina de primeira geração indicada no tratamento da mastite subclínica e de vacas secas (Leiter 2000). Oliveira et al. (2011) encontraram 13% de resistência a este fármaco em *Staphylococcus* spp. isolados mastite bovina no Estado do Pará.

Foi observada uma grande variação quanto ao perfil da resistência antimicrobiana dos *Staphylococcus* spp. envolvidos na etiologia da mastite bovina em rebanhos brasileiros. De acordo com Sol et al. (2000) e Zafalon et al. (2007), a possibilidade de cura depende da estirpe bacteriana ou do animal. Algumas amostras de *S. aureus* parecem ser mais sensíveis ao tratamento do que outras e, também, algumas vacas se recuperam melhor, tratadas ou não. Assim, vários fatores podem interferir na cura bacteriológica quando se utiliza a terapia antimicrobiana, seja em razão do estágio da ocorrência da infecção, como da presença de bactérias em abscessos, além do estado imunitário do animal (Zafalon et al. 2007).

Ao avaliar o perfil de resistência dos bastonetes Gram-negativos foi encontrado um elevado percentual de resistência à azitromicina, tetraciclina e doxiciclina tanto das amostras de leite quanto da cadeia produtiva. Segundo Nascimento et al. (2001), as tetraciclinas e os macrolídeos estão entre as principais classes de antimicrobianos utilizados nas terapias de tratamento da mastite. Matoso (2006) detectou um percentual de resistência de 65% as tetraciclinas de bastonetes Gram negativos isolados de leite. A utilização abusiva de antimicrobianos na medicina humana e animal e o seu uso durante algum tempo na agropecuária tem favorecido a emergência e disseminação de enterobactérias resistentes a antibióticos (Gonçalves 2010). Além disso, uma das características mais importantes da resistência bacteriana dos bastonetes Gram-negativos é a variedade natural de mecanismos de resistência, sendo que *E.coli* e *Klebsiella* spp. são as espécies que mais se apresentam resistentes aos antimicrobianos (Falagas et al. 2009).

Os percentuais de resistência observados tanto nos isolados do leite quanto da linha de ordenha apontam para importância da aplicação de medidas que previnam a disseminação destes patógenos nas propriedades rurais, considerando suas características estruturais que lhe conferem maior facilidade de deslocamento entre os fômites presentes na propriedade.

**Agradecimentos.** À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pelo apoio financeiro por meio dos processos E-26/103.076/2008, E-26/111.147/2010 e E-26/110.526/2011.

## REFERÊNCIAS

- Aires T.A.C.P. Mastites em Bovinos: caracterização etiológica, padrões de sensibilidade e implementação de programas de qualidade do leite em explorações do Entre-Douro e Minho. Dissertação. Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa, 2010. 77 p. (Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10400.5/2373>>)
- Amaral L.A., Rossi Júnior O.D., Nader Filho A., Ferreira F.L.A. & Barros L.S.S. Incidence of *Staphylococcus* sp. in the water used by dairy farms in the State of São Paulo. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 55:1-9, 2003.
- Bannoher J., Ben Zakour N.L., Waller A.S., Guardabassi L., Thoday K.L., Van Den Broek A.H. & Fitzgerald J.R. Population genetic structure of the *Staphylococcus intermedius* group: insights into agr diversification and the emergence of methicillin-resistant strains. *J. Bacteriol.*, 189:8685-8692, 2007.
- Bannoehr J., Franco A., Iurescia M., Battisti A. & Fitzgerald J.R. 2009. Molecular Diagnostic Identification of *Staphylococcus pseudintermedius*. *J. Clin. Microbiol.*, 47:469-471.
- Brito M.A.V.P., Brito J.R.F., Silva M.A.S. & Carmo R.A. Concentração mínima inibitória de dez antimicrobianos para amostras de *S. aureus* isoladas de infecção intramamária bovina. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 53:10-17, 2001.
- Carvalho L.A. Embrapa gado de leite: sistema de produção. Disponível em: <[www.cnpqgl.embrapa.br/sistema/cerrado.html](http://www.cnpqgl.embrapa.br/sistema/cerrado.html)>. Acesso em: 16 jun 2012.
- Carneiro D.M.V.F., Domingos P.F. & Vaz A.K. Imunidade inata da glândula mamária bovina: resposta à infecção. *Cienc. Rur.*, 39:1934-1943, 2009.
- Coelho S.M.O., Menezes R.A., Soares L.C., Pereira I.A., Gomes L.P. & Souza M.M.S. Mapeamento do Perfil de Resistência e Detecção do gene *mecA* em *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus intermedius* oxacilina-resistentes isolados de espécies humanas e animais. *Cienc. Rur.*, 37:195-200, 2008.
- Coelho S.M.O., Reinoso E., Pereira I.A., Soares L.C., Demo M., Bogno C. & Souza M.M.S. Virulence factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Rio de Janeiro. *Pesq. Vet. Bras.*, 29:369-374, 2011.
- Coentão C.M., Souza G.N., Brito J.R.F., Brito M.A.V.P. & Lilenbaum W. Fatores de risco para mastite subclínica em vacas leiteiras. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 60:283-288, 2008.
- Cunha A.P., Silva L.B.G., Pinheiro J.W., Silva D.R., Oliveira A.A., Silva K.P.C. & Mota R.A. Perfil de sensibilidade antimicrobiana de agentes contagiosos e ambientais isolados da mastite clínica e subclínica. *Inst. Biol.*, 73:17-21, 2002.
- CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From animals*; Approved Standard. 3<sup>th</sup>. M31-A3. 22(6), 2008. 116p.
- CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 22<sup>th</sup> Informational Supplement, M100-S21. 31(1), 2012.188p.
- Devriese L.A., Hermans K., Baele M. & Haesebrouck F. 2008. *Staphylococcus pseudintermedius* versus *Staphylococcus intermedius*. *Vet. Microbiol.*, 133:206-207, 2008.
- Descloux S., Rossano A. & Perreten V. Characterization of new staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) and topoisomerase genes in fluoroquinolone- and methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *J. Clin. Microbiol.*, 46:1818-1823, 2008.
- Erskine R.J., Walker R.D., Bolin C.A., Bartlett P.C. & White D.G. Trends in antibacterial susceptibility of mastitis pathogens during a sevenyear period. *J. Dairy Sci.*, 85:1111-1118, 2002.

- FAERJ/SEBRAE. *Diagnóstico da cadeia produtiva do leite do estado do Rio de Janeiro*. Rio de Janeiro, FAERJ: SEBRAE-RJ, 2010.
- Falagas M.E. & Karageorgopoulos D.E. Extended-spectrum beta-lactamase-producing organisms. *J. Hosp. Infect.*, 73: 345-354, 2009.
- Freitas M.F.L., Pinheiro J.W., Stamford T.L.M., Rabelo S.S.A. Silva D.R. Silveira V.M., Santos F.G.B., Sena M.J. & Mota R.A. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus coagulase* positivos isolados de leite de vacas com mastite no agreste do Estado de Pernambuco. *Arq. Inst. Biol.*, 72:171-177, 2005.
- Hirsh D.C. & Zee Y.C. *Microbiologia Veterinária*, 3ed, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2003. 446p.
- Koneman E.W., Allen S.D., Janda W.M., Schreckenberger P.C. & Winn J.R. *Diagnóstico Microbiológico*. 6.ed. Rio de Janeiro, Editora MEDS, 2008.1565p.
- Lacerda L.M., Mota R.A. & Sena N.J. Qualidade microbiológica da água utilizada em fazendas leiteiras para limpeza das tetas das vacas e equipamentos leiteiros em três municípios do Estado do Maranhão. *Arq. Inst. Biol.*, 76:569-575, 2009.
- Langoni H., Mendonça A.O. & Develley A. Avaliação do uso da associação da bromexina com gentamicina no tratamento da mastite subclínica bovina. *Napgamma*, 1:4-7, 2000.
- Leiter, T. Cephalosporins. 2000. Disponível em: <<http://www.fhsu.edu/nursing/otitis/cephalosporins.html>> Acesso em: jun 2012
- Marinho M., Baldine S., Silva A. V., Listoni F. J. P. & Langoni H. Ação *in vitro* da enrofloxacin em microorganismos isolados de leite mastítico da região de Botucatu-SP. *Ars Vet.*, 18: 120-124, 2002.
- Machado T.R.O., Correa M.G. & Marins J.M. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative Staphylococci isolated from mastitic cattle in Brazil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 60:278-282, 2008.
- Mendonça E.C.L., Marques, V.F., Melo D.A., Alencar T.A., Coelho S.M.O. & Souza M.M.S. Caracterização fenotípica da resistência antimicrobiana em *Staphylococcus* spp. isolados de mastite bovina. *Pesq. Vet. Bras.*, 2012. [no prelo]
- McFarland M., Holcombe D., King, D., Allen J. & Redelman D. Quantification of subclinical mastitis in sheep. University of Nevada, 2000. Disponível em: <<http://www.ag.unr.edu/AB/Extension/Cattleman/Cattleman2000/16.html>> Acesso em: jul 2012.
- Nader Filho A., Schocken-Iturrino R.P., Rossi Junior O.D. & Amaral L.A. Sensibilidade dos *Staphylococcus aureus* isolados em casos de mastite bovina, à ação de antibióticos e quimioterápicos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 38:581-588, 2000.
- Neves M.C., Rossi O.D.J., Alves E.C.C. & Lemos M.V.F. Detecção de genes de resistência antimicrobiana em cromossomos e plasmídeos de *Staphylococcus* spp. *Arq. Inst. Biol.*, 74:207-213, 2007.
- Oliveira C.M.C., Sousa M.G.S., Silva N.S., Mendonça C.L., Silveira J.A.S., Oaigen R. P., Andrade S.J.T. & Barbosa J. D. Prevalência e etiologia da mastite bovina na bacia leiteira de Rondon do Pará, estado do Pará. *Pesq. Vet. Bras.*, 31:104-110, 2011.
- Oliveira A.A., Melo C.B. & Azevedo H.C. Diagnóstico e determinação microbiológica da mastite em rebanhos bovinos leiteiros nos Tabuleiros Costeiros de Sergipe. *Cienc. Anim. Bras.*, 10: 226-230, 2011.
- Oliveira M.T. Ambigüidade da extensão rural universitária e as acusações de técnicos. *Rev. Econ. Sociol. Rur.*, 31:103-24, 2001.
- Pereira I.A. *Processos infecciosos de animais de companhia: uma abordagem sobre fatores de virulência em Staphylococcus spp. e resistência à azitromicina e oxacilina como modelo de estudo*. Tese. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, 2010. 166p. (Disponível em: [http://www.bdt.ufrj.br/tde\\_arquivos/3/TDE-2012-05-18T082409Z-1098/Publico/Ingrid%20Annes%20Pereira.pdf](http://www.bdt.ufrj.br/tde_arquivos/3/TDE-2012-05-18T082409Z-1098/Publico/Ingrid%20Annes%20Pereira.pdf))
- Pyoral S. & Taponen S. Coagulase-negative staphylococci: Emerging mastitis pathogens. *Vet. Microbiol.*, 134:3-8, 2009.
- Santini G.A., Pedra D.F.B.M. & Pigatto G. Internacionalização do Setor Lácteo: A Busca pela Consolidação. Anais do 47º Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural. Disponível em: <<http://www.sober.org.br/palestra/13/831.pdf>> Acesso em: 6 jul 2012.
- Santos C.D.M., Leal G.S. & Rossi D.A. Frequência e suscetibilidade a antimicrobianos de *Staphylococcus* spp isolados de leite de vacas com mastites recorrentes de rebanhos da região de Uberlândia - MG. *Vet. Nots*, 12: 83-88, 2006.
- Silva W.P., Silva A.J., Macedo M.R.P., Araújo M.R., Mata M.M. & Gandra E.A. 2003. Identification of *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius* and *S. hyicus* by Pcr amplification of *coa* and *nuc* genes. *Braz. J. Microbiol.*, 34 (Suppl.1):125-127.
- Soares L.C., Pereira I.A., Coelho S.M.O., Cunha C.M.M., Oliveira D.F.B., Miranda A.F. & Souza M.M.S. Caracterização fenotípica da resistência a antimicrobianos e detecção do gene *mecA* em *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos isolados de amostras animais e humanas. *Cienc. Rur.*, 38:1346-1350, 2009.
- Sol J. Factors associated with cure after therapy of clinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus*. *Journal of Dairy Science*. 83 (2): 278-284, 2000.
- Straub, J.A.; Hertel, C.; Hammes & W.P. 1999. A 23S RNAr-targeted polymerase chain reaction-based system for detection of *Staphylococcus aureus* in meat started cultures and dairy products. *J. Food Protec.*, 62:1150-1156.
- Zafalon L.F. Mastite subclínica causada por *Staphylococcus aureus*: custo-benefício da antibioticoterapia de vacas em lactação. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 59:577-585, 2007.
- Wattiaux M.A. Development The Babcock Institute for International Dairy Research. 2000. Disponível em: <<http://babcock.cals.wisc.edu>> acesso em: jun 2012.