



Universidad de Río Cuarto

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA, TECNOLOGIA E
INOVAÇÃO EM AGROPECUÁRIA**

**ASPECTOS DAS CONDIÇÕES HIGIÊNICO-SANITÁRIAS EM
UNIDADES PRODUTORAS DE LEITE EM MUNICÍPIOS DO RIO DE
JANEIRO E UTILIZAÇÃO DE FERRAMENTAS MOLECULARES
PARA CARACTERIZAÇÃO DOS PRINCIPAIS AGENTES
BACTERIANOS ENVOLVIDOS NA MASTITE.**

TATIANI ABREU DE ALENCAR

Sob a Orientação da Professora

Miliane Moreira Soares de Souza

e Co-orientação das Professoras

Shana de Mattos de Oliveira Coelho e

Elina Beatriz Reinoso

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária, Área de Concentração Patobiologia Animal.

Seropédica, RJ
Março, 2014

636.2089819
A368a
T

Alencar, Tatiani Abreu de, 1979-

Aspectos das condições higiênico-sanitárias em unidades leiteiras em municípios do Rio de Janeiro e utilização de ferramentas moleculares para caracterização dos principais agentes bacterianos envolvidos na etiologia das mastites / Tatiani Abreu de Alencar – 2014.

96 f.: il.

Orientador: Miliane Moreira Soares de Souza.

Tese (doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação Agropecuária, 2014.

Bibliografia: f. 61-86.

1. Bovino de leite - Doenças - Teses. 2. Mastite - Teses. 3. Bactérias - Análise – Teses. 4. Ordenha – Aspectos da saúde – Rio de Janeiro (Estado) – Teses. 5. Drogas – Resistência em microorganismos – Teses. 6. Higiene veterinária – Teses. I. Souza, Miliane Moreira Soares de, 1970- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação Agropecuária. III. Título.

É permitida a cópia parcial ou total desta Tese, desde que citada a fonte.

“Não há saber mais ou saber menos: Há saberes diferentes”.

(Paulo Freire)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente e sempre a Deus, por presentear minha vida sempre com o melhor, por me capacitar e me honrar diante das diversidades.

Ao meu esposo Marcelo Carvalho Gomes, por seu companheirismo na alegria e na tristeza, pelo incentivo e fazer dos meus sonhos os seus. Te amo!!

Às minhas filhas Victória A. Gomes, Maria Eduarda A. Gomes e Valentina A. Gomes, pelo amor incondicional, por abdicarem de minha presença em muitos momentos. Saibam que todas as vezes que penso em vocês, encontro forças e motivos para continuar.

Aos meus pais, José Carlos de Alencar e Sonia Abreu de Alencar e meu irmão Carlos Magno de Alencar, por me encorajar e acreditarem em mim.

À minha orientadora Miliane Moreira Soares de Souza, pela credibilidade, por compartilhar seus conhecimentos científicos, pelas palavras de incentivo, pela seriedade e exemplo de integridade.

À minha co-orientadora Shana de Mattos de Oliveira Coelho, por não medir esforços em me atender, por ser exemplo de seriedade, competência e dedicação.

À professora Irene da Silva Coelho, por seu carinho e prontidão em elucidar minhas dúvidas. Obrigada Florzinha!!

À professora Elina Reinoso, pela orientação e acolhimento na UNRC- Rio Cuarto-Argentina.

Às amigas, Bianca Soares, Dayanne Araújo e Elaine Liporage, pelo auxílio na realização deste trabalho, pelo grande companheirismo e amizade. Contem sempre comigo. Amo vocês!

Ao estagiário, Felipe C. Dubenczuk, pelo comprometimento e dedicação.

A todos os integrantes da equipe do LABACVET, por todo apoio e auxílio.

Ao Curso de Pós-Graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária da UFRRJ, pela oportunidade de aprendizado e formação.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos.

À Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pelo apoio e projetos que nos foram contemplados.

BIOGRAFIA

Tatiani Abreu de Alencar, filha de José Carlos de Alencar e Sonia Abreu de Alencar, nascida em 20 de dezembro de 1979, no bairro de Campo Grande, município Rio do Janeiro-RJ. cursou o primário, ensino fundamental, parte do ensino médio no Colégio Fernando Costa Seropédica RJ. E o último ano do 2º grau no Colégio Cenecista Paracambi no município de Paracambi RJ. No ano de 2006 ingressou no Curso de Economia Doméstica da universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica – RJ, diplomando-se em dezembro de 2009. Durante a graduação, foi bolsista de iniciação científica do CNPq no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da UFRRJ (2008-2009), sob a orientação do Dr. Pedro Paulo de Oliveira. Estagiou no Laboratório de Bacteriologia Veterinária, do período de 2009 a 2010, realizando projetos na área de mastite bovina, sob a orientação da Dra. Miliane Moreira Soares de Souza. Em 2010, foi aprovada no processo de seleção para discente do Programa de Pós Graduação em Ciência Tecnologia e Inovação em Agropecuária– PPGCTIA/UFRRJ, nível Doutorado, na área de Patobiologia animal, sob a orientação da Dra. Miliane Moreira Soares de Souza. Foi bolsista CAPES- Demanda Social durante o período de 2010 a fevereiro de 2014.

RESUMO

ALENCAR, Tatiani Abreu. **Aspectos das condições higiênico-sanitárias em unidades leiteiras em municípios do Rio de Janeiro e utilização de ferramentas moleculares para caracterização dos principais agentes bacterianos envolvidos na etiologia das mastites.** 2014. 113p. Tese (Doutorado em Ciência, Tecnologia e Inovação Agropecuária). Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ: UFRRJ, 2014

O sistema agroindustrial do leite tem grande importância social por se tratar de uma atividade praticada em todo o território nacional. Uma das principais causas de prejuízos econômicos deste setor, é a inflamação da glândula mamária, que pode ser causada por diversos microrganismos. Estes patógenos podem produzir fatores de virulência que permitem a colonização, infecção e escape das células de defesa. Os fatores de resistência aos antimicrobianos permitem que as células bacterianas neutralizem a ação dos antibióticos, dificultando sua eliminação. A adoção de práticas adequadas de higiene incorporadas ao manejo é a forma mais eficiente de controle da mastite. Desta forma, é importante conhecer a realidade de diferentes propriedades, identificar a diversidade bacteriana envolvida na etiologia dos quadros de mastite e estabelecer o perfil de resistência e virulência, de modo a permitir que o conhecimento epidemiológico dos isolados bacterianos subsidie o monitoramento dos pontos críticos de controle dentro do ambiente de ordenha. O presente estudo realizou uma investigação epidemiológica em oito unidades produtoras de leite, localizadas na mesorregião Sul Fluminense do Estado do Rio de Janeiro. Através da aplicação de um instrumento diagnóstico foi detectado que 87,5% das propriedades apresentavam condições insatisfatórias de higiene na linha de ordenha e no abastecimento de água, abaixo dos parâmetros de potabilidade. Foram obtidos 389 isolados do leite, sendo 90% (350/389) pertencentes ao gênero *Staphylococcus* spp. e 10% de bastonetes Gram-negativos (39/389). Da linha de ordenha foram obtidos 101 isolados, sendo 80,2% (81/101) de *Staphylococcus* spp. e 19,8% (20/101) de bastonetes Gram-negativos. Foi detectado a presença dos genes *icaA* e *icaD* em 15,2% (38/250) e 21,6% (54/250) dos isolados do leite e 11% (11/100) e 20% (20/100) dos isolados da linha de ordenha respectivamente. O percentual de resistência à oxacilina, dos isolados de *Staphylococcus* spp., foi de 39,14% (137/350) e 83,16% (84/101), considerando-se o leite e a linha de ordenha, respectivamente. Dentre os isolados da linha de ordenha, 23% foram positivos para o gene *mecA*. Ao avaliar diversidade genética através da técnica de PFGE foi observado que as cepas de *Staphylococcus* spp. oriundas do leite apresentaram maior distância genética quando comparadas as cepas isoladas da linha de ordenha. Estes resultados apontam que a constante investigação dos patógenos circulantes nos ambientes de produção leiteira da região é imprescindível para elaboração de novas medidas de controle para mastite bovina.

Palavras-chaves: Mastite. Manejo sanitário. Resistência antimicrobiana. Virulência.

ABSTRACT

ALENCAR, Tatiani Abreu. **Aspects of hygienic and sanitary conditions in dairy units in Rio de Janeiro counties and use of molecular tools to characterize the major bacterial agents involved in the etiology of mastitis.** 2014. 113p. Thesis (Doctorate in Science, Technology and Agricultural Innovation). Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2014.

The dairy agribusiness has great social significance as it is practiced in a nation wide scale. A major cause of economic losses in this sector is the inflammation of the mammary gland, which can be caused by various microorganisms. These pathogens can produce virulence factors that allow colonization, infection and evasion from immune cells. On the other hand, resistance factors allow bacterial cells to neutralize the effects of antibiotics, making them difficult to eliminate. The introduction of appropriate hygiene practices in the dairy herd management is the most efficient way to control mastitis. Thus, it is important to know the conditions of different properties, to identify the bacterial diversity involved in the etiology of mastitis and to establish their resistance and virulence profiles. This will allow the gain in epidemiological knowledge to assist the monitoring of critical control points within the milking environment. This study performed an epidemiological investigation in eight dairy farms, located in the Southern Fluminense Region of Rio de Janeiro State. Through the use of a diagnostic instrument, it was detected that 87.5% of the properties had unsatisfactory hygiene conditions in the milking line and in the water supply, which were below potability parameters. In total, 389 isolates were obtained from milk samples, 90% (350/389) of them belonged to the *Staphylococcus* spp. genus, and 10% were identified as Gram-negative (39/389) rods. From the milking line samples 101 isolates were obtained, of which 80.2% (81/101) were identified as *Staphylococcus* spp. and 19.8% (20/101) were classified as Gram-negative rods. The *icaA* and *icaD* genes were detected in 15.2% (38/250) and 21.6% (54/250) of isolates from milk samples, and also in 11% (11/100) and 20% (20/100) of isolates from the milking line, respectively. The percentage of oxacillin resistance, in *Staphylococcus* spp. isolates was of 39.14% (137/350) and 83.16% (84/101), considering milk and milking line samples, respectively. Among the isolates from the milking line, 23% were positive for the *mecA* gene. Evaluation of genetic diversity by the PFGE technique evidenced that *Staphylococcus* spp. strains from milk samples showed higher genetic distance when compared to strains isolated from the milking line. These results show that the constant monitoring of pathogens in the environment of dairy production in the region is essential for the development of new control measures of bovine mastitis.

Keywords: Mastitis. Health dairy management. Antimicrobial resistance. Virulence.

RESUMEN AMPLIADO

ALENCAR, Tatiani Abreu. **Aspectos de las condiciones sanitarias en tambos lecheros ubicados en los municipios de Río de Janeiro y el uso de herramientas moleculares para caracterizar los principales agentes bacterianos asociados a la mastitis.** 2014. 113p. Tesis (Doctorado en Ciencia, Tecnología e Innovación Agropecuaria). Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal Rural Rio de Janeiro. Seropédica, RJ: UFRRJ, 2014.

1 Introducción

Entre las diversas cadenas productivas que representan la base de la producción del país, la cadena de producción de leche puede ser considerada una de las más complejas y uno de los agentes más importantes del agro-negocio brasileño. Una causa importante de pérdidas económicas en este sector, es la inflamación de la glándula mamaria, que puede ser causada por diversos microorganismos. Estos patógenos pueden producir factores de virulencia que permiten la colonización y la infección. Los factores de resistencia a los antibióticos permiten que las células bacterianas neutralicen la acción de los antimicrobianos, lo que dificulta su eliminación. La adopción de prácticas de higiene adecuadas es la forma más eficaz para controlar la mastitis. La mayor parte del comercio de productos lácteos en el Mercosur se da entre Brasil y Argentina. Por lo tanto, este mercado ha crecido en importancia en los últimos tiempos. El Mercosur, ha impulsado a los productores de leche de Brasil a adoptar el uso de las nuevas tecnologías, con el fin de aumentar la productividad y enfrentar el mercado competitivo. Argentina es uno de los principales países del Mercosur como un exportador de leche. En los últimos años, las exportaciones a Brasil representaron el 70% del total exportado por Argentina (GOMES, 2010). En este contexto, el presente estudio tiene como objetivo describir la realidad del sistema de producción en cada tambo lechero estudiado mediante la evaluación de las condiciones de ordeño y la identificación de posibles agentes bacterianos en la leche y su cadena de suministro, mediante el estudio de perfiles de resistencia y virulencia y la relación clonal entre los aislamientos por electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE). Estos datos permiten el conocimiento de los perfiles genéticos de los agentes causantes de mastitis, y permitirán la comprensión de la diversidad de los clones que circulan en el área de estudio con el fin de mejorar las estrategias de prevención y encontrar una terapia adecuada para el desarrollo de programas exitosos.

2 Materiales y Métodos

Ocho tambos lecheros (4 ubicados en Río Claro-RJ, 1 en Pirai RJ- y 2 en la ciudad de Paracambi y 1 en el municipio de Seropédica) fueron seleccionados para su estudio. Se realizó la evaluación de las condiciones sanitarias de la línea de ordeño con una herramienta de diagnóstico que contempla las condiciones relacionadas a la limpieza, a la higiene de los animales y las variables del recinto de ordeño. Para la identificación y selección de animales con mastitis clínica y subclínica, se empleó el "California Mastitis Test" (CMT) en vacas en lactancia para la identificación de la mastitis subclínica y el examen físico de la glándula mamaria para la identificación de la mastitis clínica. En cada tambo, se seleccionó el 20% de los animales positivos al test. La leche se recolectó en viales estériles a partir del ordeño manual e individual. Las muestras de la máquina de ordeño, de tanque, de equipos y de manos de los ordeñadores fueron recolectadas utilizando hisopos estériles. Asimismo, se recolectaron

1.000 ml de agua obtenida de grifos y mangueras del recinto de la sala de ordeño de todos los tambos visitados. Todas las muestras se colocaron en conservadoras refrigeradas con hielo y fueron enviadas al laboratorio de Bacteriología Veterinaria de la Universidad Federal Rural de Río de Janeiro. Para determinar la presencia de coliformes totales y fecales, se empleó el método del número más probable (NMP), teniendo en cuenta las normas microbiológicas reglamentadas para el agua potable de consumo humano según la Ordenanza N ° 518 del 25 de marzo 2004, de la Secretaría de Salud (Brasil, 2004). La identificación de los microorganismos se realizó de acuerdo con los protocolos establecidos en la literatura (Koneman et al, 2008). Luego del aislamiento y de la identificación de las cepas, se realizaron las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana según el CLSI (2012). La detección de la resistencia a oxacilina en *Staphylococcus spp.* y la producción de beta-lactamasas en enterobacterias, se realizó de acuerdo con las normas establecidas por el CLSI (2008, 2012). La producción fenotípica de biofilm fue evaluada cualitativamente en microplacas utilizando la metodología propuesta por Cucarella et al., 2001. La extracción de ADN bacteriano se realizó de acuerdo al protocolo optimizado en el Laboratorio de Bacteriología Veterinaria de la Universidad Federal Rural de Río de Janeiro. Una reacción de PCR múltiple se realizó para determinar genes característicos del género estafilococo (*Staphylococcus spp.*) (Zhang et al. 2004) y de la especie *S. aureus* (ADNr) (Straub et al. 1999). Posteriormente, se realizó la detección del gen *coa* (Karahán y CETINKAYA, 2006). Luego, se realizó la amplificación de los genes específicos de la especie *S. intermedius* (*nuc* 03:04) según Silva et al., 2003 y GIS (PTY), y posterior digestión enzimática con la enzima *MboI* para identificar otras especies de estafilococos coagulasa positiva (ECP) (BANNOEHR et al., 2007). El estudio de los genes de resistencia a beta-lactámicos (*mecA*) en *Staphylococcus spp.* se realizó de acuerdo a Coelho et al. (2007). Para la amplificación de los genes implicados en la producción de biofilm, *icaA* e *icaD* en *Staphylococcus spp.* se empleó el protocolo descrito por Vasudevan y col. 2003. La técnica de electroforesis en campo pulsado se realizó de acuerdo con el protocolo descrito por Saulnier et al (1993) con algunas modificaciones optimizadas en el laboratorio de la Orientación Genética Microbiana de la UNRC.

3 Resultados y Discusión

Se encontró que el 87,5% de los tambos tenían condiciones poco satisfactorias de higiene en la línea de ordeño y en el abastecimiento de agua, cuyos parámetros de potabilidad fueron bajos. De los 407 vacas estudiadas, fue posible recolectar 272 muestras de leche, que correspondió a aproximadamente el 20% de los animales positivos al CMT. A partir de las muestras de leche, se obtuvieron 389 aislamientos, de los cuales el 90% (350/389) perteneció al género *Staphylococcus spp.* y el 10% restante a bacterias Gram-negativas (39/389). De la línea de ordeño se obtuvieron 101 aislamientos, siendo el 80,2% (81/101) *Staphylococcus spp.* y el 19,8% (20/101) bacilos Gram-negativos. Los ensayos de resistencia a antibióticos fueron realizados mediante pruebas de difusión en disco en las 350 cepas de *Staphylococcus spp.*, revelando una mayor resistencia antimicrobiana en las cepas aisladas de la línea de ordeño. Se encontró el 80% (200/250) de las cepas resistentes a penicilina en leche y el 89% (89/100) en los aislados de la línea de ordeño, mientras que se obtuvo un 64% y el 54% de resistencia a tetraciclina en *Staphylococcus* aislados de leche y de línea de ordeño, respectivamente. Los datos mostraron que el 67,2% (168/250) y el 56% (56/100) de los estafilococos aislados de la línea de leche y de ordeño, respectivamente, presentan fenotipo cefoxitina en las pruebas de resistencia de difusión en disco, sin embargo, éstos cepas fueron negativas para la detección del gen *mecA*. Por otro lado, un 23% de los aislados positivos al gen *mecA* (23/100), no mostraron resistencia fenotípica a la cefoxitina. Estos resultados indican que puede haber

otros mecanismos implicados en la expresión de la resistencia a beta-lactamasas y a la producción de otras PBP (SAKOULAS et al. 2001).

Los 39 aislados Gram - negativos (BGN), derivados de leche fueron ensayados para la prueba de la producción de beta-lactamasas. La misma reveló que el 51,3% (20/39) de los aislados fueron resistentes a las cefalosporinas de segunda generación, el 41% (16/39) y 38,5% (15/39) a ceftazidima y a ceftriaxona (cefalosporinas de tercera generación), respectivamente. Asimismo, el 38,5% (15/39) mostró resistencia a las cefalosporinas de cuarta generación. La resistencia a la amoxicilina + clavulánico fue del 84,6% (33/39), mientras que la resistencia a la penicilina y ampicilina fue 79,5% (31/39) y 100% (39/39), respectivamente.

Los aislados resistentes a cefotaxima y ceftazidima y sensibles a ácido clavulánico (12,9% -5/39), fueron sospechosos de producir beta lactamasas (BLEE 2be) de amplio espectro. Pero ningún aislado se caracterizó por ser un productor de la enzima a través de las prueba de concentración mínima inhibitoria (E-Test) ni de la prueba de extracto tridimensional de disco. Un total de 53% (21/39) de las cepas mostraron resistencia a la cefoxitina y fueron sospechosas de producir β -lactamasas de tipo AmpC.

La producción de biofilm se detectó en el 84,8% (212/250) y en el 95% (95/100) de las cepas de *Staphylococcus spp.* aisladas de muestras de leche como de línea de ordeño, respectivamente, al ser evaluadas por la técnica de microplaca. Sin embargo, la detección de los genes *icaD* e *icaA* fue significativamente menor, detectando el 15,2% (38/250) y el 21,6% (54/250) de los genes *icaD* e *icaA*, respectivamente, en los aislados de leche, y el 11% (11 / 100) y 20% (20/100) en los aislados de línea de ordeño, respectivamente. La baja correlación entre los resultados fenotípicos y genotípicos ha sido discutido en la literatura, y entre las posibles explicaciones surge la dificultad en reproducir las condiciones *in vivo* para la producción de biofilm, las cuales pueden influir en la expresión fenotípica de aislamientos positivos, así como la ausencia de ambos genes en otras cepas productoras de implicadas en la producción de biofilm, incluyendo la posibilidad de la regulación por diversas vías (SIMOJOKI et al. 2012). Un total de 36 cepas de *S. aureus* se tipificaron mediante la técnica de PFGE. Los aislados de leche generaron 9 perfiles representativos, mientras que las cepas de *Staphylococcus spp.* de la línea de ordeño generaron 3 perfiles. El análisis de los perfiles mostró una mayor distancia genética en las cepas de *Staphylococcus spp.* aisladas de leche comparadas con las aisladas de la línea de ordeño. Estos resultados indican que la investigación constante de los patógenos que circulan en el ambiente de la producción lechera en la región es esencial para el desarrollo de nuevas medidas de control de la mastitis bovina.

4 Conclusión

El control eficiente de la mastitis bovina sólo puede lograrse con la asociación entre la adopción de buenas prácticas de gestión y seguimiento de los agentes patógenos que circulan en el etomo de producción.

Palabras claves: Mastitis. Estrategias de control. Resistencia a antimicrobianos. Virulencia.

LISTA DE FIGURAS

	Págs
Figura 1. Mapa de localização dos municípios do Estado do Rio de Janeiro.....	17
Figura 2. Armazenamento inadequado dos utensílios utilizados na linha de ordenha.....	29
Figura 3. Animais presentes na linha de ordenha sujos de lama.....	32
Figura 4. Animais deitados sobre matéria orgânica.....	33
Figura 5. Distribuição da prevalência de mastite clínica e subclínica.....	34
Figura 6. Gráfico representando os percentuais das diferentes espécies de <i>Staphylococcus</i> spp.....	39
Figura 7. Eletroforese em gel de agarose dos Genes <i>Staph.e DNAr de Staphylococcus</i>	39
Figura 8. Gráfico representando os percentuais das diferentes espécies de bastonetes Gram negativos.....	43
Figura 9. Método de difusão em disco.....	44
Figura 10. Gráfico dos percentuais de susceptibilidade dos <i>Staphylococcus</i> spp.....	45
Figura 11. Indução da resistência pela presença do disco de imipenem pela “Zona D”.....	51
Figura 12. Eletroforese em gel de agarose dos produtos do multiplex-PCR para os genes <i>DNAr Staphy</i> (756 pb) e <i>mecA</i> (513 pb).....	53
Figura 13. Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR dos Genes <i>icaA</i> (1315pb) e <i>icaD</i> (381pb) em <i>Staphylococcus</i> spp. isolados de mastite bovina em gel de agarose.....	54
Figura 14. Dendrograma de similaridade dos isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. da linha de ordenha.....	57
Figura 15. Dendrograma de similaridade dos isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> oriundos de amostras de leite.....	59

LISTA DE TABELAS

		Págs
Tabela 1.	Zonas de inibição avaliadas pelo diâmetro dos antimicrobianos utilizados.....	21
Tabela 2.	Zonas de inibição avaliadas pelo diâmetro dos antimicrobianos utilizados.....	22
Tabela 3.	Classificação da produção de “slime” pelo método da microplaca...	23
Tabela 4.	Iniciadores e ciclos empregados para amplificação dos genes de identificação das espécies de <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-positivos.....	25
Tabela 5.	Iniciadores e ciclos empregados para amplificação dos genes <i>bla</i> de <i>Staphylococcus</i> spp.....	25
Tabela 6.	Iniciadores e ciclos empregados para amplificação dos genes de virulência de <i>Staphylococcus</i> spp.....	25
Tabela 7.	Caracterização geral das fazendas.....	27
Tabela 8.	Resultados do instrumento diagnóstico de cada propriedade visitada.....	30
Tabela 9.	Probabilidade de semelhança de fatores de risco para Mastite bovina entre as propriedades.....	35
Tabela 10.	Relação das propriedades, das cidades, números de amostra com seus respectivos sítios de coleta e número de vacas.....	36
Tabela 11.	Resultados das pesquisas de coliformes totais e fecais em amostras de águas das 8 propriedades estudadas.....	37
Tabela 12.	Distribuição dos isolados bacterianos por sítio de coleta.....	38
Tabela 13.	Percentuais de resistência encontrados para os antimicrobianos testados em isolados de <i>Staphylococcus</i> spp.....	45
Tabela 14.	Distribuição dos antibiótipos predominantes.....	48
Tabela 15.	Distribuição dos perfis de resistência dos bastonetes Gram negativos.....	50
Tabela 16.	Distribuição dos perfis dos <i>Staphylococcus</i> spp. detectados nos testes de resistência à oxacilina.....	52
Tabela 17.	Perfis fenogenotípicos relacionado a produção de <i>slime</i> nos <i>Staphylococcus</i> spp.....	55
Tabela 18.	Distribuição da produção de <i>slime</i> em microplaca dos <i>Staphylococcus</i> spp.....	56
Tabela 19.	Origens e grupamentos dos isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. da linha de ordenha pela técnica de PFGE.....	58
Tabela 20.	Origens e grupamentos dos isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> do leite pela técnica de PFGE.....	61

LISTA DE ANEXOS

	Págs
Anexo 1. Instrumento diagnóstico dos principais fatores de risco rínsecos para mastite bovina.....	87
Anexo 2. Antibiotipos de resistência aos antimicrobianos dos <i>Staphylococcus</i> spp. isolados da linha de ordenha.....	88
Anexo 3. Percentuais das espécies isoladas do leite de vacas com mastite clínica e subclínica.....	89
Anexo 4. Padrões eletroforético do DNA cromossômico de <i>S.aureus</i> do leite clivado com <i>SmaI</i> em gel de agarose 0,8% após eletroforese em campo pulsado.....	89
Anexo 5. Padrões eletroforético do DNA cromossômico de <i>Staphylococcus</i> spp. da linha de ordenha clivado com <i>SmaI</i> em gel de agarose 0,8% após eletroforese em campo pulsado.	90
Anexo 6. Mini manual de bolso contendo orientações sobre práticas adequadas de manejo de ordenha.....	91
Anexo 7. Carta de aceite do artigo “Aspectos das condições higiênico- sanitárias em unidades leiteiras em municípios do Rio de Janeiro e análise dos agentes bacterianos envolvidos na etiologia das mastites.” na Revista Brasileira de Medicina Veterinária.”	95
Anexo 8. ALENCAR, T.A.; MENDONÇA, E.C.L.; MARQUES, V.F.; MELO, D.A.; ROJAS, A.C.M.; MOTTA, C.C.; SANTIAGO, G.S.; DUBENCZUK, F.C.; TRIVISOL, P.; COELHO, S.M.O.; SOUZA, M.M.S. Aspectos das condições higiênico- sanitárias em unidades leiteiras em municípios do Rio de Janeiro e análise dos agentes bacterianos envolvidos na etiologia das mastites. <i>Revista Brasileira de Medicina Veterinária</i> . [Aceito para publicação].....	96

LISTA DE ABREVIACÕES

APGF = Água Pepto-Glicofosfatada
ATCC = “American Type Culture Collection”
BHI = Infuso Cérebro Coração
Caldo VB = Caldo lactosado verde brilhante
CCS = Contagem de Células Somáticas
CIM = Concentração Inibitória Mínima
CLSI= “Clinical and Laboratory Standards Institute”
CMT = “California Mastitis Test”
DNA = ácido desoxirribonucleico
ECN=Estafilococos Coagulase Negativos
ECP= Estafilococos Coagulase Positivos
ELISA= “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”
EMB= Eosina Azul de Metileno
FDA= “Food and Drug Administration”
h = horas
H₂O₂ = peróxido de hidrogênio
KOH = hidróxido de potássio
MH = “Müeller-Hinton”
MAPA=Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do governo brasileiro.

mL = mililitros
mm = milímetros
mM = milimolar
MVF= Agar Manitol Vermelho de Fenol
MRSA = “Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*” - *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina
NaCl = cloreto de sódio
NCCLS: “National Committee for Clinical Laboratory Standards”
nm = nanômetro
NMP = Número mais provável
ORSA= *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina
pb = pares de base
PBP = “Penicillin Binding Protein” - Proteína Ligadora de Penicilina
pH = potencial hidrogeniônico
PCR = “Polymerase Chain Reaction” - reação em cadeia de polimerase
PFGE = *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*
rpm = rotação por minuto
SCC_{mec} = cassete cromossômico de *mec* estafilocócico
S.aureus = *Staphylococcus aureus*
U = unidades
UI= unidade internacional
V = volts
VP = “Vöges Proskauer”
µg = micrograma
µL= microlitro
°C = graus Celsius

SUMÁRIO

	Págs
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Panorama da Pecuária Leiteira nos Países do Mercosul.....	3
2.2. O Complexo Agroindustrial da Pecuária Leiteira no Estado do Rio de Janeiro.....	3
2.3. Mastite Bovina.....	4
2.3.1 Principais agentes bacterianos envolvidos na mastite bovina.....	5
2.3.2 Importância do monitoramento da resistência antimicrobiana em animais de produção.....	10
2.4 Higiene no Processo de Obtenção do Leite, Boas Práticas de Ordenha e suas Implicações para Saúde Pública.....	11
2.5 Técnicas de Tipagem Molecular como Ferramentas para o Desenvolvimento de Medidas Preventivas em Propriedades Leiteiras.....	13
2.5.1 PFGE (<i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis</i>).....	14
2.6 Instrução Normativa 62/2011.....	14
2.7 Importância dos Programas de Extensão Voltados para Capacitação Educacional dos Ordenhadores.....	15
3. METODOLOGIA	17
3.1. Área de Estudo.....	17
3.2. Seleção das Propriedades	17
3.3. Realização do Instrumento Diagnóstico.....	18
3.4. Seleção dos Animais.....	18
3.5. Coleta das Amostras de Leite.....	18
3.5.1 Amostras da Linha de Ordenha.....	18
3.6. Análises Bacteriológicas.....	19
3.6.1. Isolamento primário e identificação presuntiva.....	19
3.6.2. <i>Staphylococcus</i> spp.....	19
3.6.3. Enterobactérias.....	20
3.6.4. Análise microbiológica da água.....	20
3.7. Testes de Suscetibilidade Antimicrobiana.....	20
3.7.1. Preparo do inóculo.....	20
3.7.2. Difusão em disco simples.....	21
3.7.3. Ágar “screen” para pesquisa de <i>Staphylococcus</i> spp resistentes à oxacilina.....	21
3.7.4. Pesquisa de produção de betalactamases em enterobactérias.....	22
3.8. Detecção Fenotípica de <i>Slime</i> em <i>Staphylococcus</i> spp. Isolados de Amostras de Leite e da Linha de Ordenha.....	23
3.9. Técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) para a Amplificação dos Genes de Resistência e Virulência.....	23
3.9.1. Extração do DNA bacteriano.....	23
3.9.2 Amplificação dos genes através da técnica de PCR.....	24
3.10. Eletroforese de Campo Pulsado (<i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis</i> – PFGE).....	26
3.11. Análise Estatística.....	26

4.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
4.1. Caracterização das Propriedades.....	27
4.2. Resultados do Instrumento Diagnóstico.....	28
4.3. Análise Estatística.....	34
4.4. Origem das Amostras.....	35
4.5. Análises Bacteriológicas.....	36
4.5.1. Análise microbiológica da água.....	36
4.5.2. Identificação bacteriana a partir das amostras de leite e linha de ordenha.....	37
4.5.3. Distribuição dos isolados bacterianos e a caracterização da mastite bovina.....	41
4.5.4. Bastonetes Gram-negativos.....	42
4.5.5. Caracterização fenotípica de suscetibilidade dos <i>Staphylococcus</i> spp isolados do leite e da linha de ordenha.....	44
4.5.6. Caracterização fenotípica de suscetibilidade dos bastonetes Gram - negativos isolados do leite e da linha de ordenha.....	49
4.5.7. Perfil feno-genotípico da resistência dos <i>Staphylococcus</i> spp. à oxacilina.....	52
4.6 Produção de <i>Slime</i>	55
4.7 Tipagem Molecular Através da Técnica de Eletroforese em Campo Pulsado em <i>Staphylococcus</i> spp. Provenientes da Linha de Ordenha e Leite Mastítico.....	56
4.8 Percepção das Ações Extensionistas Realizadas.....	62
5. CONCLUSÕES.....	63
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	64
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
8. ANEXOS.....	87

1 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 (SANTINI et al., 2009). O sistema agroindustrial do leite tem grande importância social por se tratar de uma atividade praticada em todo o território nacional, em mais de um milhão de propriedades rurais que, somente na produção primária, gerou na última década, acima de três milhões de empregos e agregou mais de seis bilhões à agropecuária nacional (CARVALHO et al., 2009).

Dentre os alimentos de origem animal, o leite é considerado um dos alimentos mais completos para o ser humano e representa uma importante fonte de proteína para todos os grupos populacionais, independente da faixa etária. (GERMANO, 2008). Sua composição rica em proteína, carboidratos, sais minerais e vitaminas, proporcionam nutrientes e proteção imunológica. No entanto, a mesma composição que torna o leite um alimento rico e indicado para a alimentação humana, também o faz um excelente meio para o desenvolvimento de microrganismos (ZAFALO et al., 2008). Uma das causas de prejuízos econômicos para o produtor é a inflamação da glândula mamária, ou mastite, que pode ser causada por diversos patógenos. A mastite pode ser de origem ambiental ou contagiosa.

A mastite ambiental é associada aos agentes presentes no habitat normal dos animais, em locais que apresentam esterco, urina, barro e camas orgânicas, com destaque para a espécie *Escherichia coli*. Entre os agentes mais envolvidos na etiologia da mastite contagiosa, destacam-se *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*. (BRITO & BRITO, 2002). Estes patógenos 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 (CARNEIRO et al., 2009). De igual modo, os mecanismos de resistência desenvolvidos por alguns destes patógenos 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. 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 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). A atuação do ordenhador é fundamental para a implementação de práticas higiênico-sanitárias eficazes, na operação dos equipamentos da ordenha, latões de leite e tanques de resfriamento. A implantação de hábitos adequados de higiene, direcionados aos produtores de leite e, sobretudo, aos ordenhadores, é um desafio constante, que implica em mudanças na forma de manejo e confronta hábitos culturais, sociais e econômicos. 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.

O conhecimento epidemiológico dos isolados bacterianos permite um melhor monitoramento, pelo diagnóstico dos pontos críticos de controle dentro do ambiente de ordenha. Para tanto, é necessário conhecer a realidade das diferentes propriedades, identificar a microbiota envolvida na etiologia dos quadros de mastite clínica e subclínica e estabelecer o perfil de virulência e resistência dos patógenos prevalentes.

O advento das técnicas moleculares tem permitido conhecer os perfis genéticos destes agentes e cruzar tais informações para compreensão da diversidade dos clones circulantes na

região estudada, fator essencial para o desenvolvimento apropriado de programas de prevenção e de terapias bem sucedidas (GIANNEECHINI et al., 2002).

Neste contexto, o presente estudo visa traçar um quadro da realidade do sistema de produção em cada propriedade estudada, avaliando as condições de ordenha e identificando possíveis agentes bacterianos no leite e na sua cadeia produtiva, estudando seu perfil de resistência e virulência e a relação clonal entre os isolados através da técnica de *Pulsed FieldGel Electrophoresis*(PFGE). Estes dados possibilitarão o conhecimento dos perfis genéticos dos agentes causadores da mastite, e viabilizarão a compreensão da diversidade dos clones circulantes na região estudada, sendo preponderante para o desenvolvimento apropriado de programas de prevenção e de terapias bem sucedidas.

Do aspecto extensionista, este projeto visa a implantação de Boas Práticas de Ordenha para se obter incremento na produtividade leiteira, através do bem-estar, conforto e sanidade animal. 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.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Panorama da Pecuária Leiteira nos Países do Mercosul

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. As estatísticas mundiais do setor demonstram que o Brasil detém posições de destaque em todos os segmentos dessa cadeia produtiva (SANTINI et al., 2009). A maior parte do comércio de lácteos no Mercosul acontece entre Brasil e Argentina. Para ambos, esse mercado tem crescido em importância nos últimos tempos. O Mercosul tem impulsionado os produtores de leite brasileiros a adotar o uso de novas tecnologias, com o intuito de aumentar a produtividade e enfrentar o mercado competidor. A Argentina é um dos principais países do Mercosul como exportador de lácteos. Nos últimos anos, as exportações para o Brasil representaram 70% do total exportado pela Argentina (GOMES, 2010). É importante quantificar e qualificar os fatores que podem influenciar na cadeia produtiva do leite, no Brasil e na Argentina, buscando o desenvolvimento de pesquisas bem sucedidas e a contribuição com o fortalecimento da agropecuária leiteira destes países.

O Brasil ocupa o quarto lugar entre os maiores produtores de leite do mundo, com 30.715.500 toneladas de leite produzido (FAO,2012) e cresce a uma taxa anual de 4%, superior aos países que ocupam os primeiros lugares. Responde ainda a 66% do volume total de leite produzido,entreos países que compõem o Mercosul (EMBRAPA,2009). Segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO, 2008), os preços internacionais do leite dobraram e a demanda cresceu principalmente nos países em desenvolvimento. A FAO ainda considera que o consumo de leite e derivados se encontra em fase de crescimento até 2050, sendo que nos últimos três anos foram registrados aumentos de 3% ao ano no consumo.

2.2 O Complexo Agroindustrial da Pecuária de Leite no Estado do Rio de Janeiro.

As duas maiores regiões produtoras de leite do Estado do Rio de Janeiro são o Médio Vale do Paraíba e o Noroeste Fluminense. De 2006 a 2010, a produção estadual de leite subiu de 420 milhões para 570 milhões de litros/ano. Em 2011, a produção atingiu 600 milhões de litros. Com produção anual de 166 milhões de litros e cerca de 4.200 produtores, a Região Sul-Fluminense ocupa o primeiro lugar, respondendo por 34% da produção estadual. O consumo de leite anual, no Estado do Rio de Janeiro, é de 3,2 bilhões de litros por ano, e a produção anual na região fluminense é de 610 milhões de litros. Estão situadas nesta região, as maiores beneficiadoras de leite do país, como a Nestlé e LRB (Bom Gosto e Parmalat) e, atualmente, a mídia tem destacado a instalação de mais uma grande empresa de beneficiamento de leite, a Brasil Foods, responsável pelas marcas Batavo e Elegê na região (DIÁRIO DO VALE, 2011).

Com a intenção de aumentar o volume de produção na região, a Secretaria Estadual de Agricultura (Seapec), tem desenvolvido programas voltados para os pequenos produtores, como fertilização *in vitro*, inseminação artificial de tempo fixo, com sêmens de animais geneticamente selecionados para a produção leiteira (FAERJ/SEBRAE, 2010).

Este cenário destaca a importância que este setor representa na economia da região. Considerando que 80% do leite produzido é oriundo de produção familiar, deve-se identificar os principais pontos que afetam sua cadeia produtiva. Sousa e colaboradores

(2011), em estudos que caracterizavam pequenas propriedades produtoras de leite no Estado do Rio de Janeiro, identificaram grandes deficiências relacionadas à infra-estrutura, informações técnicas, controle da sanidade dos animais, ordenha higiênica e capacitação técnica dos ordenhadores.

Uma das exigências feitas pelas indústrias beneficiadoras do leite, para aquisição do leite de seus cooperativados, é que o produto apresente uma contagem padrão em placas inferior a $6,0 \times 10^5$ UFC/mL, e contagem de células somáticas inferior a $6,0 \times 10^5$, indicando uma boa qualidade microbiológica do produto (BRASIL, 2011). No entanto, para atingir este resultado, é preciso identificar os pontos críticos de cada propriedade, a fim de implementar medidas que visem garantir a qualidade do leite. Apesar disso, é perceptível que a maioria dos estabelecimentos rurais ainda precisa se ajustar aos parâmetros responsáveis de produção, visando amenizar os impactos nocivos ao ambiente, à população e ao bem estar dos animais. Dentre as doenças infecciosas que acometem os animais de produção, que acarretam grandes perdas econômicas para a pecuária leiteira, afetando diretamente a economia e a qualidade dos produtos lácteos, a mastite bovina ocupa lugar de destaque (OLIVEIRA, 2012).

2.3 Mastite Bovina

A mastite é o processo inflamatório da glândula mamária em resposta a agentes infecciosos, químicos e traumáticos, desencadeando o aumento de proteínas plasmáticas e células leucocitárias sanguíneas, mobilizadas do sangue para o tecido mamário. O aumento das células somáticas no leite expressa os danos nos tecidos glandulares e a consequente diminuição da secreção do leite (AIRES, 2010).

As mastites podem ser de origem ambiental ou contagiosa. 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). Neste caso, o principal momento de transmissão ocorre durante a ordenha dos animais. Já a 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 momentos 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 mastite pode se manifestar tanto de forma clínica quanto de forma subclínica. A forma clínica é caracterizada pela presença dos sinais evidentes de inflamação como edema, rubor, aumento de temperatura, endurecimento, dor e pus, além de alteração das características do leite como a presença de grumos (VIGUIER et al., 2009). A forma subclínica, ao contrário, não apresenta alterações visíveis no aspecto do leite ou do úbere (ARAÚJO et al., 2008), as alterações são percebidas na composição do leite, tais como aumento na contagem de células somáticas (CCS), dos teores de cloro e sódio, e dos teores de proteínas séricas; além da diminuição nos teores de caseína, lactose, gordura e cálcio do leite (GIANOLA et al., 2004), fazendo com que haja menor rendimento na produção de seus derivados, além de diminuir o tempo de prateleira do produto (BRADLEY et al., 2002).

O CMT (*California Mastitis Test*) é um teste indireto que detecta ácido desoxirribonucleico (DNA) proveniente de células nucleadas no leite. É o método mais comum na detecção de mastites subclínicas. O reagente do CMT é um detergente com indicador de pH que, quando misturado com o leite em partes iguais, dissolve as paredes celulares e nucleares

dos leucócitos presentes, libertando o material nuclear. O ADN livre forma uma massa gelatinosa que aumenta de consistência proporcionalmente com o número de leucócitos presentes no leite (MELLENBERGER, 2001). O grau de viscosidade formado entre o leite e o reagente pode ser lido de modo subjetivo.

Outro método ainda mais simples de diagnóstico é o do uso da caneca de fundo preto, que permite a observação de anormalidades no leite. (CLEMENTS, 2003).

2.3.1 Principais agentes bacterianos envolvidos na mastite bovina

A literatura descreve cerca de 137 espécies de microrganismos pertencentes a mais de 35 gêneros todos implicados em casos de mastite bovina, mas a predominância dos processos infecciosos da glândula mamária está relacionada as bactérias. Dentre as principais espécies bacterianas envolvidas na etiologia da mastite destacam-se os *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* coagulase negativo, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Corynebacterium bovis*, *E.coli*, *Klebsiella* sp. e *Enterobacter* sp. (YAMAMURA et al., 2008). A interação entre as bactérias, as vacas e o ambiente, somadas as práticas de manejo aplicadas pelo homem criam condições favoráveis à contaminação da glândula mamária (PEIXOTO et al., 2010).

a) *Staphylococcus* spp.

Os *Staphylococcus* spp. foram descobertos em 1880 pelo escocês cirurgião Sir Alexander Ogston e desde então vem sendo implicados em vários processos infecciosos de humanos e animais (RAZA, 2013). Em 1887 Nocard isolou *Staphylococcus* spp. de mastite em ovinos e em 1890 Guillebeau afirmou que este patógeno era o principal responsável pelos processos infecciosos da glândula mamária dos bovinos (JOSSON e WADSTORM, 1993)

De acordo com o *List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature* (2014), existem 49 espécies descritas pertencentes a este gênero e 26 subespécies, habitando diferentes ambientes e espécies animais. O gênero é subdividido em dois grandes grupos, com base na produção da enzima coagulase, cuja função é formar coágulos de fibrina no tecido do hospedeiro, dificultando seu reconhecimento e fagocitose por parte do sistema fagocitário mononuclear.

De modo geral, oito espécies de estafilococos coagulase-positivos (ECP) têm sido identificadas: *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius*, *S. delphini*, *S. pseudintermedius*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, *S. hyicus*, *S. lutrae*, e *S. agnetis* (TAPONEN et al., 2012; SASAKI et al., 2010; DEVRIESE et al., 2005; FRENEY et al., 1999;). As espécies de estafilococos tendem a apresentar especificidade quanto ao hospedeiro. Por exemplo, as espécies predominantes em ruminantes, suínos, cães e pombos são *S. aureus*, *S. hyicus*, *S. pseudintermedius*, e *S. intermedius*, respectivamente (SASAKI et al., 2010; FITZGERALD et al., 2008; SASAKI et al., 2007).

As bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. estão entre as espécies mais isoladas da mastite bovina, o *S.aureus* é um patógeno primário responsáveis por infecções clínicas e subclínicas, apresentando altas taxas de contagem de células somáticas no leite. Os sítios de localização dos *S.aureus* são os quartos mamários infectados, a pele do úbere e dos tetos, os bocais da ordenhadeira mecânica e as mãos dos ordenhadores, ressaltando a importância do manejo durante a ordenha na prevenção da sua transmissão (FERREIRA et al 2006). Os *S.aureus* fixam-se nas células do epitélio da glândula mamária e se internalizam, dificultando assim a ação das células fagocitárias e a ação dos antimicrobianos. As glândulas infectadas diminuem a produção de leite por destruição permanente do parênquima celular, desenvolvendo zonas de fibrose e abscessos na glândula mamária (EUZEBY, 2007). Além de

seus importantes fatores de virulência, esta espécie também apresenta diferentes mecanismos de resistência que favorecem sua persistência na glândula mamária.

Entre as cepas de *S.aureus*, aquelas que apresentam maior problema terapêutico são as cepas de *S.aureus* resistentes à meticilina (MRSA), pois apresentam resistência a uma variedade de antimicrobianos (FARIA et al., 2005). Recentemente, MRSA tem sido considerado um agente zoonótico. Segundo Stein (2009), cepas de MRSA de origem animal foram isoladas de pessoas que não tiveram contato direto com animais. Isto reforça a possibilidade de transmissão direta de uma pessoa para outra após a colonização e/ou infecção de uma delas a partir de animais.

A literatura descreve duas outras importantes espécies coagulase positivas causadores da mastite bovina o *S. hyicus* e *S.intermedius*, porém isoladas com menos frequência nos rebanhos leiteiros (LANGE et al 2011).

Os *Staphylococcus* coagulase negativos (SCN) são um grupo heterogêneo de diferentes espécies que incluem *S. simulans*, *S.chromogenes*, *S.xylosus* e *S.haemolyticus*, entre outros (THOBERGUER et al 2008). São considerados patógenos oportunistas, provocando leves alterações tanto na glândula mamária quanto no leite, mas podem causar grandes perdas em situações de elevada prevalência (WILSON et al., 2007, THORBERG, 2008). Estes microrganismos são tradicionalmente considerados patógenos menos significativos, quando comparados aos *S.aureus*, *Streptococcus spp.* e coliformes (TAPONEN & PYORALA, 2009). A principal razão para que isso ocorra está associado ao fato da mastite causada por SCN ser menos sintomática e frequentemente permanecer na sua forma subclínica (TAPONEN et al., 2006). No entanto, a significância dos SCN deve ser considerada, pois são portadores de fatores de virulência que conferem a eles grande potencial de patogenicidade (BANNERMAN & PEACOCK, 2007; CHU et al., 2008; DAVIS et al., 2013; AHER, 2014) . Além de Poder apresentar resistência a antibióticos e atuar na disseminação de genes de resistência antimicrobiana no ambiente de produção leiteira (TENHAGEN et al., 2006). Uma grande variedade de espécies de SCN tem sido isolada de canais dos tetos, pele e outros sítios extramamários de vacas, mas as espécies de SCN mais reportadas aos casos de mastite são *S. chromogenes* e *S. simulans* (TRINIDAD, NICKERSON & ALLEY, 1990; MATTHEWS, HARMON & LANGLOIS, 1992). Entretanto, cepas de *S. epidermidis* também são isoladas com frequência (THORBERG et al., 2006).

A natureza evolutiva dos *Staphylococcus spp.* contribuiu para o desenvolvimento de diferentes mecanismos de virulência que são capazes de burlar e neutralizar o sistema imune do hospedeiro (GARZONI et al 2009). Dentre estes fatores, a habilidade desenvolvida pelos *Staphylococcus spp.* em aderir ao epitélio da glândula mamária, é considerada como o primeiro ponto crítico na patogenia da mastite (ZAFALLON et al., 2008). Esta tem sido associada a produção de biofilme, que é um composto de multicamadas de células embebidas em uma matriz de exopolissacarídeos (SAUER et al., 2002, FLEMMING&WINGENDER, 2010). O *slime* é o principal componente do biofilme que auxilia na aderência e na colonização dos microrganismos no epitélio da glândula mamária e em superfícies (BASELGA et al., 1993; AGUILAR et al., 2001; SOUZA et al., 2012). Dhanawade e colaboradores (2010), relatam que a adesão microbiana ocorre devido à deposição de microrganismos em uma superfície de contato onde se fixam e iniciam o seu desenvolvimento. Essa multiplicação celular dá origem a colônias e, quando a massa celular é suficiente para agregar nutrientes, resíduos e outros microrganismos, estabelece-se o biofilme.

Um biofilme pode ser monoespécie quando sua formação diz respeito a apenas um tipo de microrganismo, ou multiespécie, quando é encontrada mais que uma espécie na comunidade. Os biofilmes monoespécies ocorrem mais em tecidos orgânicos, como válvulas cardíacas, como consequência de processos infectivos. Em se tratando de outras superfícies,

como aquelas empregadas em organizações do ramo alimentício, destacada atenção deve ser dada a biofilmes multiespécie (BOARI, 2008).

Este tipo de organização é extremamente vantajosa a todas as espécies de microrganismos, por fornecer proteção contra adversidades como desidratação, colonização por bacteriófagos e favorecer resistência a antimicrobianos e aos desinfetantes utilizados por indústrias processadoras de alimentos (HALL-STOODLEY & STOODLEY, 2009). Os biofilmes microbianos ocorrem naturalmente nos mais variados tipos de ambientes, sejam eles bióticos como tecidos animais, ou abióticos, como rochas, metais e polímeros diversos (BOARI, 2008).

Existem várias teorias propostas para formação de biofilmes. A primeira teoria foi descrita por Marshall, et al. (1971) resalta que a adesão é um processo que ocorre em duas fases, na primeira fase, o processo é ainda reversível, em função do processo de adesão do microrganismo na superfície ocorrer por forças de Van der Waals e atração eletrostática. Na segunda etapa, ocorre a interação física da célula com a superfície por meio de material extracelular de natureza polissacarídea ou proteica, produzida pela bactéria, que é denominada matriz de glicocálix, que suporta a formação de biofilmes (MELO, 2008). O glicocálix é produzido após o processo de adesão superficial, e vai fornecer condições de adesão do peptidoglicano das bactérias Gram positivas e a parte externa da membrana externa das Gram negativas (PARIZZI, 1998). Outra teoria sugere a formação de biofilmes em cinco etapas (APARNA & YADAV, 2008), que podem ser colocadas na seguinte ordem: I) adesão das células bacterianas a uma superfície através de componentes específicos presentes na célula, que podem ser induzidos por fatores ambientais. Neste estágio as células exibem crescimento característico da fase logarítmica e pode haver o desprendimento de algumas células. II) ocorre a ligação irreversível e, é iniciado minutos após o estágio I (COSTERTON, STEWART & GREENBERG, 1999). Em seguida, ocorre a proliferação de microcolônias e intercomunicação entre as células bacterianas através de sinais químicos liberados pelo mecanismo de *quórum sensing* (JACQUES, ARGON & TREMBLAY, 2010). III) os agregados celulares se dispõem em camadas com uma espessura maior 10 µm. Inicia-se o processo maturação e a produção da matriz polimérica extracelular que envolve e liga as células (JACQUES, ARGON & TREMBLAY, 2010). IV) os biofilmes atingem sua estrutura tridimensional, essa estrutura tridimensional pode ser plana ou em forma de cogumelo. A forma é influenciada pelas fontes de nutrientes e presença e/ou ausência de forças de cisalhamento que agem tangencialmente à superfície podendo culminar no desprendimento da estrutura (JOHN & DONALE, 2007).

O estágio V corresponde ao desprendimento e à dispersão das células que ao serem liberadas podem colonizar novas superfícies (JACQUES, ARGON & TREMBLAY, 2010).

O desprendimento de células bacterianas do biofilme é de fundamental importância. Biofilmes microbianos formados em equipamentos e instalações de indústrias alimentícias podem desprender-se e contaminar o alimento presente na superfície ou, então, colonizar e iniciar um novo biofilme em uma nova superfície, proporcionando uma nova fonte de contaminação (JAYARAMAN & WOOD, 2008; COSTERTON, 1999). A proliferação das células para aderir e formar biofilme é mediada pela produção do polissacarídeo intercelular adesina (PS/A), um antígeno capsular que faz com que a bactéria tenha aderência na superfície. De acordo com Ziebuhr et al. (1997) e Heilmann & Ciftci et al. (2009), após a aderência inicial a uma superfície, a bactéria prolifera e acumula-se agrupada em multicamadas.

A formação de multicamadas de células no biofilme está associada com a produção do outro polissacarídeo intercelular adesina (PIA). Tanto PIA e PS/A são estruturas similares com um carbono comum de β-1-6 poliglicosamina, mas diferem em substituição primária no grupamento amina (VASUDEVAN et al., 2003). A síntese do polissacarídeo capsular-PS/A é

mediada por um operon *ica* que uma vez ativado, um polissacarídeo de adesão intercelular-PIA é sintetizado (ARCIOLA et al., 2001; BERNARDI, 2005; GERKE et al., 1998; Mc KENNEY et al., 1998). O locus *ica* consiste nos genes *icaADB* e *C* que codificam proteínas mediante a síntese de PIA e PS/A em espécies de estafilococos. (Mc KENNEY et al., 1998; CRAMTON et al., 1999). Por meio dos genes *icaA* e *icaD* tem sido relatado um significativo papel na formação de biofilmes em *S. aureus* e *S. epidermidis* (ARCIOLA et al., 2001). O gene *icaD* tem sido apontado como fundamental na máxima expressão do N-acetilglicosamina transferase, conduzindo a expressão fenotípica do polissacarídeo capsular (DEGO et al., 2002; BERNARDI, et al., 2007). ARCIOLA et al. (2002) mostraram que técnicas moleculares para identificação dos genes *ica*, que codificam a síntese do *slime*, representam uma ferramenta muito importante para uma identificação acurada de estirpes virulentas formadoras de *slime*. Segundo SALUSTIANO, (2007), o procedimento de limpeza eficaz contra células em biofilmes deve ser capaz de interromper ou dissolver a matriz de substâncias poliméricas extracelulares, permitindo que os agentes desinfetantes possam ter acesso a células viáveis (JAYARAMAN & WOOD, 2008; SILVA et al., 2007)

Assim sendo, o mais vantajoso é a prevenção da adesão bacteriana em superfícies da sala de ordenha, equipamentos e utensílios. Deve ser conferida atenção maior às bactérias que se fixam na superfície dos equipamentos e resistem ao fluxo do alimento, pois são elas que irão apresentar maior resistência à remoção durante a higienização do equipamento (FIGUEIREDO, 2008). Um procedimento efetivo de higienização, em casos de biofilmes precisa solubilizar ou dissolver a matriz de exopolissacarídeo do biofilme, para que o agente sanitizante possa ter acesso às células viáveis (CHMIELEWSKI & FRANK, 2003).

Em relação ao leite e seus derivados, SILVA (2006) enfatiza a dificuldade remoção dos resíduos destes produtos, pois são resíduos bastante complexos, compostos de substâncias orgânicas (gorduras, proteínas e açúcares) e minerais e que aderem às superfícies dos equipamentos e utensílios de forma bastante resistente. A remoção desses resíduos deve ser realizada imediatamente após o término do uso de equipamentos e realização de operações, para evitar a formação de depósitos persistentes e de difícil remoção. A limpeza e higienização ineficientes das superfícies têm como consequência a precipitação dos resíduos minerais que formam incrustações (formação de pedras do leite). Os resíduos orgânicos resultantes da higienização inadequada, além de fornecerem nutrientes para o crescimento das bactérias, impedem a ação dos sanitizantes. Os resíduos também favorecem a formação de biofilme, que diminuem a eficiência dos equipamentos, além de serem uma grande fonte de contaminação microbiológica.

b) Enterobactérias

Dentre as bactérias ambientais mais comuns causadoras da mastite bovina de origem ambiental estão as enterobactérias e muitos fatores estão associados a sua ocorrência, como a estação do ano, limpeza do ambiente, nutrição, estado imunológico, raça, idade e período de lactação da vaca. Além disso, dois fatores de virulência auxiliam a multiplicação das enterobactérias na glândula mamária: a capacidade de sobreviver em condições de baixa tensão de oxigênio e sua habilidade de utilizar a lactose como fonte energética (KAIPAINEN et al., 2002; HOGAN & SMITH, 2003; RIBEIRO et al., 2006). As enterobactérias causam uma mastite que tende a se apresentar na forma clínica aguda e, algumas vezes na forma hiperaguda, em que se observa febre, perda de apetite, desidratação e, ocasionalmente, morte do animal (BRITO et al., 2009).

Segundo Miguel (2010), a carga microbiana inicial do leite está diretamente associada à qualidade da água utilizada para limpeza das teteiras mecânicas. Muitas propriedades não usam água tratada e historicamente, a incidência de contaminação das águas subterrâneas,

principalmente de poços profundos, tem sido considerada baixa. No entanto, nos últimos anos, as atividades agrícolas, com grandes operações de criação intensiva, têm criado condições ambientais que possibilitam a contaminação biológica das águas subterrâneas, em especial por coliformes (Centro de Vigilância Epidemiológica/CVE/SES-SP).

O esforço para resolver problemas associados à qualidade da água deve levar em conta os pontos de adequação e controle como as fontes de abastecimento, a realização de um levantamento das fontes e vulnerabilidade dos aquíferos, o conhecimento detalhado do sistema de captação, reserva e distribuição de água da propriedade bem como aplicação e mensuração correta de tratamento da água disponível na propriedade. Independente da avaliação que se faça dos sistemas de abastecimento, o processo de desinfecção nunca deve ser uma opção e sim uma obrigação que já é regulamentada pela Anvisa/MS Portaria 518 (Ministério da Saúde, 2005). Portanto, melhorar a qualidade física e microbiológica da água deve ser uma obrigação de todos os profissionais da pecuária envolvidos na produção (SANTOS, 2008).

As enterobactérias constituem o maior e mais heterogêneo grupo de microrganismos, são ubíquos e constituintes da microbiota intestinal normal da maioria dos animais (SANTOS, 2006). Os membros dessa família podem colonizar pessoas e animais, sendo os imunocomprometidos ou debilitados altamente suscetíveis às infecções. Os procedimentos invasivos e as mucosas traumatizadas e/ou cortadas são portas de entrada ao microrganismo (KONEMAN et al., 2008).

Essas bactérias pertencem à família Enterobacteriaceae, apresentam-se sob a forma de bacilos e são Gram-negativos, medindo em média 1 a 5 µm de comprimento. Esses microrganismos são móveis, dotados de flagelos peritríquios, ou imóveis, não formadores de esporos. As enterobactérias fermentam açúcares originando uma variedade de produtos finais, reduzem o nitrato, são catalase-positivas. Devido à ausência da atividade de citocromo-oxidase, as enterobactérias são oxidase-negativas, podendo diferenciá-las outros bacilos Gram-negativos fermentadores ou não fermentadores. As colônias dessa família apresentam características diferenciais em meio ágar EMB (Eosina Azul de Metileno) e ágar MacConkey (O'HARA, 2005; MADIGAN et al., 2010).

Os membros do gênero *Escherichia* habitam o intestino de animais de sangue quente, incluindo humanos, embora não sejam os organismos dominantes nesse habitat. Algumas linhagens são de grande importância para seus hospedeiros enquanto outras são patogênicas podendo causar doenças graves. *Escherichia coli*, um agente oportunista, é a espécie mais isolada em casos de mastite ambiental (SANTOS, 2006; MADIGAN et al., 2010).

Outro agente de importância nas mastites bovina é do gênero *Klebsiella*, em especial a espécie *Klebsiella pneumoniae*. Essa bactéria está presente no ambiente e também na pele do teto podendo colonizar o tecido causando infecção no teto (ZADOKS et al., 2011). O gênero *Proteus* caracteriza-se pela rápida motilidade e pela produção da enzima urease e, as espécies de *Serratia* e *Enterobacter* podem ser isoladas de água, esgoto, intestino de animais e humanos. Esses agentes também podem causar mastite em bovinos pela sua disseminação no ambiente (MADIGAN et al., 2010; ZADOKS et al., 2011). O grande número de espécies dentro da família das enterobactérias acarreta uma elevada variedade de padrões de sensibilidade natural (RISUEÑO et al., 2002; YOUSAF, 2009). O conhecimento da resistência intrínseca das diferentes espécies auxilia na escolha das estratégias de tratamento empírico (RIVERÓN et al., 2003; RICE & BONOMO, 2005; PELLEGRINO et al., 2010).

2.3.2 Importância do monitoramento da resistência antimicrobiana em ambientes de produção animal

O isolamento e identificação laboratorial e a análise *in vitro* da sensibilidade antimicrobiana são requisitos para melhor controle sanitário e adoção de terapêutica adequada. Entretanto, 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; FREITAS et al., 2005). 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.

O uso profilático de antimicrobianos por via intramamária no final do período de lactação é considerado um componente importante dos programas de controle de mastite. A aplicação ocorre, geralmente, dois meses antes do parto, quando se interrompe o processo de ordenha e se inicia a involução do úbere. Apesar do amplo uso da antibioticoterapia na secagem de vaca leiteira, não há evidências de resistência associada ao tratamento (ERSKINE et al., 2008).

Além da utilização terapêutica ou profilática, a utilização de antibióticos como aditivos alimentares na produção animal, com liberação de resíduos nos produtos derivados, 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. Estudos vem sendo conduzidos pela Organização Mundial de Saúde, pela Comunidade Europeia e pelos Ministérios da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e da Saúde no Brasil, no intuito de regulamentar a utilização dos antimicrobianos na produção animal. Esta é uma questão bastante controversa, uma vez que existem os defensores de que a restrição do uso de antimicrobianos pode resultar em um aumento do aparecimento de doenças infecciosas nos rebanhos, e como consequência, produtos de qualidade sanitária inferior. Por outro lado, a opinião do mercado europeu que tem gerado importantes embargos a produtos com resíduos de antimicrobianos é de que diversos fatores influenciam o aparecimento das doenças e seu impacto sobre a produção, e que em situação de manejo eficiente, a probabilidade de sucesso no tratamento das doenças pode ser aumentada (OIE/FAO, 2013; EUROPEAN COMMISSION, 1998). A presença de resíduos de antibióticos no leite, além da questão econômica, também implica em risco à saúde pública por poder ocasionar ao consumidor, problemas como a ocorrência de reações de hipersensibilidade e possível choque anafilático em indivíduos mais sensíveis, (MARQUES & NETO, 2006; NUNES & D' ANGELINO, 2007).

A resistência bacteriana pode ser transferida por diversos mecanismos, podendo estabelecer-se de modo intra e interespecífico, entre microrganismos saprófitas e patogênicos, como também da microbiota animal para humana e vice-versa (HARDY al., 2002; AARESTRUP et al., 2001).

Diversos estudos que abordaram a suscetibilidade a antimicrobianos de patógenos da mastite bovina no Brasil apontam para um aumento crescente no padrão de resistência (BRITO et al., 2001; COELHO et al., 2009, SOUZA et al., 2011). Logo, o conhecimento de padrões de resistência aos antimicrobianos é fundamental para o desenvolvimento de métodos preventivos efetivos para o controle da doença e para a elaboração de estratégias de tratamento quando necessário (SABOUR et al., 2004).

2.4 Higiene no Processo de Obtenção do Leite, Boas Práticas de Ordenha e suas Implicações para Saúde Pública.

O aumento da produção de alimentos devido à crescente expansão demográfica tem sido acompanhado pelo desenvolvimento de várias medidas que visam garantir condições higiênicas sanitárias satisfatórias e a conservação dos constituintes nutricionais dos mesmos (AIRES.,2010).

Em relação a pecuária leiteira no Brasil existem aproximadamente 5,2 milhões de estabelecimentos rurais e em 25% deles ocorre a produção de leite. O maior percentual de propriedades produtoras de leite em relação ao número total de estabelecimentos rurais ocorre nas Regiões Sul (41%), Centro-Oeste (39%) e Sudeste (33%). Nas regiões Norte (18%) e Nordeste (16%), esta correlação é bastante inferior. Devido a significativa produção do Estado de Minas Gerais, maior produtor do país, a região Sudeste destaca-se como a maior produtora, com 10,9 bilhões de litros em 2011 (EMBRAPA-Gado de Leite 2012).

O processo da ordenha é considerado a etapa mais crítica de todas as etapas que compõem a cadeia produtiva do leite. Isto se deve a presença de inúmeros fatores presentes na linha de ordenha que representam riscos de contaminação aos tetos dos animais podendo levar a infecção da glândula mamária acarretando perda da qualidade da matéria prima.

A contaminação do leite pode se iniciar na fazenda, durante e/ou após a ordenha. Diversos fatores são responsáveis pela perda da qualidade microbiológica. Nesta etapa, destaca-se a ineficiência da higienização de utensílios e equipamentos, como equipamentos de ordenha mecânica, latões e tanques de expansão. Segundo Oliver e colaboradores (2005), microrganismos podem se aderir aos equipamentos de processamento de leite que entram em contato direto com contaminantes do ambiente de propriedades leiteiras, como matéria fecal ou úbere de animais infectados além da água utilizada nas ordenhadeiras mecânicas. Diferentes autores mencionam que estes microrganismos podem formar biofilmes, difíceis de erradicar e que podem agir como abrigo e/ou substrato para microrganismos menos propensos à formação, aumentando a probabilidade de sobrevivência dos mesmos e a posterior disseminação durante o processamento de alimentos (LOMANDER et al., 2004; MØRETRØ & LANGSRUD, 2004; LEHNER et al., 2005 & LAPIDOT et al., 2006).

A qualidade da água também é outro fator preponderante para a higiene das operações de ordenha. A água de uso para a lavagem dos materiais e das ordenhadeiras devem ser cloradas e para lavagem do ambiente deve ser hiperclorada. Concentração de 3 a 15 ppm por litro de cloro residual e de água são as concentrações que promovem a atividade bactericida do íon cloro (CERQUEIRA et al., 2006). A qualidade da água dos bebedouros dos animais também deve apresentar boa qualidade microbiológica, uma vez que pode ser veículo para transmissão de doenças no rebanho (LACERDA et al., 2009).

Além disso, o fato dos indivíduos que atuam na linha de ordenha estarem com as mãos constantemente em contato com o ambiente ao redor onde a população bacteriana presente na pele das mãos pode ser transferida de uma superfície para outra ou das mãos para os tetos – também influencia na transmissão desses microrganismos (SANTOS.,2009). A presença de *Staphylococcus aureus* em alimentos é um indicativo de contaminação a partir da pele, da boca e das cavidades nasais dos manipuladores dos alimentos. Quando em grande quantidade apontam para a ineficiência dos processos de limpeza e desinfecção e da inadequação no controle de temperatura (ICMSF, 1996).

De acordo com Tirado & Schmidt (2001) em se tratando do cenário epidemiológico mundial, *S.aureus* são a terceira mais relevante causa de doenças transmitidas por alimentos (DTAs). A sua principal fonte de entrada na cadeia de leite é por meio da matéria-prima contaminada, visto que microrganismos desta espécie estão entre os agentes etiológicos mais isolados da mastite bovina (CREMONESI et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2007).

A higienização do ambiente, dos equipamentos e do manejo de ordenha (higienização adequada das mãos, dos tetos, dos equipamentos e utensílios utilizados na ordenha) são atividades desempenhadas pelos ordenhadores. No entanto, de modo geral, os mesmos apresentam grandes dificuldades na realização e manutenção destas atividades. Alguns autores atribuem estas dificuldades ao fato de muitos desses trabalhadores não terem acesso a informação, influência de crenças e a dificuldade de receberem capacitação adequada para sua função (TEDESCO, 2008).

A primeira evidência científica de que a higienização das mãos é uma ação fundamental na prevenção da transmissão de microrganismos é de Semmelweis no século XIX (SENNA, 2010). Atualmente, as medidas de controle de infecções hospitalares são fundamentadas na prática de higienização das mãos, que apesar de amplamente difundida entre os profissionais de saúde, ainda é negligenciada na prática (SENNA, 2010). Ao compararmos o nível de educação formal e capacidade de análise crítica do conhecimento entre os profissionais de saúde e os atuantes na linha de ordenha, podemos compreender a dificuldade de se implementar as práticas de higiene adequadas.

A compreensão da importância da adoção de práticas adequadas de higiene deve vir do responsável pela assistência técnica, passando pelo proprietário, até chegar ao ordenhador, como responsabilidade de todos os envolvidos no processo. Segundo Senna (2010), para que as práticas adequadas de higiene sejam inculcadas nos hábitos diários dos indivíduos, são necessários o monitoramento e o constante incentivo para o desempenho destas ações.

As boas práticas de ordenha consistem em conjunto de medidas voltadas para o manejo dos animais, para prevenir a introdução de agentes causadores de mastite ou para reduzir a disseminação dos mesmos. Antes de implementar o programa de boas práticas de ordenha, deve-se considerar os recursos que cada propriedade dispõe, em especial, a capacitação da mão-de-obra para implantar um plano de controle sem falhas (FONSECA & SANTOS, 2000).

Um dos cuidados que contribui para a redução dos riscos de contaminação dentro do rebanho está relacionado a manutenção e limpeza do ambiente em que as vacas ficam alojadas (VEIGA et al., 1993; HACHEM, 2005).

A condução dos animais para linha de ordenha é outro cuidado importante que resulta no bom funcionamento desse processo. Essa condução deve ocorrer de forma calma e ordenada, buscando evitar o estresse dos animais, inibindo o aumento do peristaltismo e a defecação na linha de ordenha. O estresse pode também resultar na retenção do leite, favorecendo a multiplicação de microrganismos no interior da glândula mamária (FONSECA & SANTOS, 2000; HACHEM, 2005).

A identificação dos animais com mastite clínica e subclínica permite a separação destes, evitando a disseminação dos patógenos circulantes. Para tanto, recomenda-se a realização do teste da caneca de fundo preto antes de cada ordenha e a realização do CMT a cada 15 dias (WATTIAUX, 2000; VAZ et al., 2001; HACHEM, 2005).

O preparo do úbere para ordenha consiste na limpeza dos tetos e desinfecção através do *pré-dipping*. Além destes procedimentos, na ordenha mecânica deve-se assegurar a higienização das teteiras, e na ordenha manual, a higienização adequada das mãos. A calibração dos equipamentos e o tempo de ordenha também devem ser monitorados.

Após a ordenha, a realização do *pós-dipping* evita a disseminação de microrganismos no rebanho e previne a mastite subclínica. O desinfetante deve ser aplicado imediatamente após a ordenha em todas as tetas do animal. O desinfetante é usado para remover os resíduos de leite deixados nas extremidades das tetas e inativar as bactérias. Para evitar a mastite ambiental, adiciona-se glicerina ao desinfetante de modo a selar o esfíncter do teto e permitir que o desinfetante permaneça sobre a pele da teta até a próxima ordenha. Cuidados especiais

devem ser tomados com relação à limpeza do recipiente e ao descarte diário das sobras de desinfetante (WATTIAUX, 2000; HACHEM, 2005).

É importante ainda que os animais permaneçam de pé após a ordenha para evitar a penetração de bactérias pelo canal do teto, que permanece aberto por um período variável entre 30 e 120 minutos. O fornecimento de ração no cocho na saída do local de ordenha também auxilia a que estes permaneçam em estação, por outro lado, deve-se evitar alimentar os animais durante a ordenha (FONSECA & SANTOS, 2000; HACHEM, 2005).

2.5 Técnicas de Tipagem Molecular como Ferramentas para o Desenvolvimento de Medidas Preventivas em Propriedades Leiteiras

O advento das técnicas moleculares tem permitido conhecer os perfis genéticos destes agentes e cruzar tais informações para compreensão da diversidade dos clones circulantes na região estudada, fator essencial para o desenvolvimento apropriado de programas de prevenção e de terapias bem sucedidas (GIANNECHINI et al., 2002).

A investigação epidemiológica da origem das principais bactérias envolvidas na etiologia da mastite bovina é imprescindível, para a detecção das vias de transmissão e fontes de infecção, pois permitem o monitoramento da disseminação de estirpes bacterianas entre populações animais (LANGE et al., 1999). A tipagem de microrganismos é importante para estudos epidemiológicos, na determinação de fontes de infecção, vias de transmissão de surtos das doenças e a presença de estirpes de diferentes fatores de virulência. Especificamente no caso de *S. aureus*, a sua considerável heterogeneidade genética, em populações naturais, permite uma apurada investigação da disseminação de estirpes de origens humana e animal (TENOVER et al., 1994; KAPUR et al., 1995; STRUELEN et al., 2009). Em relação a mastite bovina a caracterização da diversidade genética destes patógenos é fundamental para compreensão do padrão de dispersão no ambiente de produção leiteira. Diferentes métodos de tipagem são desenvolvidos para estudos epidemiológicos ou para a análise de características e relações genéticas e cada um possui vantagens e desvantagens. Portanto, é muito importante que a seleção de um método de tipagem seja ideal e sensível para cada finalidade (HATA et al., 2010). Os métodos de tipagem molecular devem cumprir todos os critérios exigidos para ser considerados ótimos, incluindo desempenho (reprodutibilidade, capacidade de tipificação, estabilidade e poder discriminatório) e conveniência (rapidez, fácil acessibilidade e facilidade de interpretação) (OLIVE & BEAN 1999).

A técnica de Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE) demonstra um elevado poder discriminatório e é considerada "padrão ouro" para a tipificação de isolados de *S. aureus* (BANNERMAN et al., 1995). Esta técnica é laboriosa e demorada, porém a reprodutibilidade dos protocolos entre laboratórios foi alcançada, o que permitiu o desenvolvimento de estudos multicêntricos de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) gerando redes de vigilância (VAN BELKUM et al., 1998; MCDOUGAL et al., 2003; MURCHAN et al., 2003). Técnicas tradicionais baseadas em PCR, em comparação com PFGE, são mais fáceis e mais rápidas, e cada vez menos caras de realizar-se. Porém também apresentam algumas limitações. Nos casos das técnicas de amplificação randômica de DNA polimórfico (RAPD) e da técnica de amplificação de sequências de elementos repetitivos (REP-PCR), a principal desvantagem é a padronização e a pouca reprodutibilidade entre laboratórios (DEPLANO et al., 2000; VAN BELKUM et al., 1998). O PCR baseado na análise do polimorfismo do tamanho de fragmento de restrição, previamente amplificados por PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), possui poder discriminatório limitado como demonstrado através da análise do gene da coagulase (CHIOU, et al., 2000). Para superar essa desvantagem, métodos mais reprodutíveis nos quais se realiza o sequenciamento dos fragmentos dos genes amplificados, tais como, a técnica de *Multilocus Sequence Typing* (MLST) que caracteriza isolados

bacterianos com base no polimorfismo de sequência dentro dos fragmentos internos de sete genes constitutivos de *Staphylococcus* spp. (ENRIGHT & SPRATT, 1999) e a técnica de amplificação e sequenciamento da região X da proteína A (gene *spa A*), que tornou-se um dos métodos principais para tipagem regional e programas nacionais de vigilância de MRSA (AIRES-DE-SOUSA, 2006; KOREEN et al., 2004).

2.5.1 PFGE (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*)

A técnica de *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE), conhecida como Eletroforese de Campo Pulsado ou, também, de Campo Pulsátil, foi desenvolvida em 1984 por Scharwartz & Cantor. Esta técnica é uma variação da eletroforese no gel de agarose, mas que apresenta alto poder de tipagem para inúmeros microrganismos, pois a alternância entre os sentidos do campo elétrico, ou pulsos, permite separar fragmentos que, convencionalmente, não seriam diferenciados em gel de agarose convencional que utilizam corrente elétrica constante (MASLOW & MULLIGAN, 1996).

A técnica de possui alta reprodutibilidade e é recomendada como método altamente discriminatório por detectar variações genéticas menores entre estirpes epidêmicas, também conhecidas como pulsotipos. No entanto, é um método laborioso e de alto custo devido, principalmente, à dificuldade de interpretação e ao preço do aparelho, pois necessita de programas especializados para analisar os resultados.

A técnica de PFGE tornou-se uma das técnicas mais utilizadas para análise epidemiológica da maioria das bactérias patogênicas (AARESTRUPET, 2006; RODRÍGUEZ-LÁZARO, 2007). Esta técnica possui alto poder discriminatório, sendo considerada como "padrão ouro" para a caracterização de isolados de *S. aureus* (BANNERMAN et al., 1995).

O PFGE é o método de escolha para a comparação dos isolados epidemiologicamente relacionadas. Por sua robustez tem sido usada em inquéritos microepidemiológicos (local ou de curto prazo) e para macroepidemiológicos (nacional, continental, ou de longo prazo) (HALLIN et al., 2007; MONTESINOS et al., 2002). O método tem sido aplicado especificamente para estudar o comportamento do *S. aureus* na mastite (ZADOKS et al, 2000; MIDDLETON et al, 2002), para determinadas estirpes que dão origem a mastite (ZADOKS et al, 2002), para avaliar o efeito a longo prazo da persistência de *S. aureus* em rebanhos leiteiros (ANDERSON & LYMAN, 2006), e para estudar o relacionamento genético das cepas de fatores de virulência aumentada (JØRGENSEN et al., 2005).

2.6 Instrução Normativa 62/2011

Do ponto de vista tecnológico, a qualidade da matéria prima é um dos maiores entraves ao desenvolvimento e consolidação da indústria de laticínios no Brasil (SILVA et al., 2013). Com o objetivo de garantir a evolução na qualidade do leite produzido, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), por intermédio do Departamento de Inspeção de Produtos de origem Animal (DIPOA), publicou a Instrução Normativa N°51 (IN 51) no Diário Oficial da União, em 18 de setembro de 2002 (BRASIL, 2002). Posteriormente, a IN 51 foi alterada e passou a vigorar a Instrução normativa N°62/2011 (IN 62) para a qualidade do leite cru produzido, com os novos limites para contagem bacteriana total (CBT) e CCS (BRASIL, 2011).

As mudanças alteram os prazos e limites da CBT e da CCS, as quais passaram a ter como limite máximo 600 mil/ml, ao invés de 750 mil/ml, para os produtores das regiões Sul,

Sudeste e Centro-Oeste a partir de 1 de janeiro de 2012, e para os do Norte e Nordeste em janeiro de 2013. Há um escalonamento de prazos e limites para a redução de CBT e CCS até 2016, para que se chegue a 100 mil/ml (CBT) e 400 mil/ml (CCS). Tais metas foram propostas pela IN 51 para 2011, e se mostraram inviáveis na prática devido à discrepância da realidade dos produtores brasileiros de leite.

O MAPA suprimiu também os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos leites tipos B e C. A IN 62 instituiu uma Comissão Técnica Consultiva pelo MAPA, que terá o papel de avaliar as ações voltadas para a melhoria da qualidade do leite no Brasil. A expectativa é que esta comissão seja capaz de discutir com as organizações do setor e com os outros órgãos responsáveis do governo federal, o desenvolvimento de políticas públicas que viabilize a realização desta lei. Estes pontos fundamentais que auxiliarão a implantação definitiva da Instrução Normativa: assistência técnica, extensão rural, crédito e melhoria de infraestrutura. No entanto, as ações desta comissão ainda não foram definidas. (SILVA, 2013).

2.7 Importância dos Programas de Extensão Voltados para Capacitação Educacional dos Ordenhadores

Ao considerar todas as interfaces implicadas na cadeia produtiva do leite, como as questões higiênicas, políticas e econômicas, deve-se compreender que a adoção de estratégias interdisciplinares torna-se essencial. A discussão de questões referentes à higiene e consequente disseminação de microrganismos deletérios para a sanidade animal e humana deve ser precedida da percepção do contexto em que o produtor está inserido para garantir a eficácia das ações propostas. De acordo com o inciso II artigo 4º da lei de terras estabelecida pela lei nº 4504 de 30 de novembro ano 2004, uma propriedade que apresenta a produção de cunho familiar consiste no trabalho desenvolvido pelo agricultor e sua família proporcionando-lhes subsistência social e econômica. Entre os agricultores familiares a pecuária de leite é uma das principais atividades desenvolvidas estando presentes em 36% dos estabelecimentos classificados como de produção familiar, além de responderem por 52% do valor bruto da produção total, oriundo do leite. Na região sudeste aproximadamente 44% das propriedades desenvolvem a atividade da pecuária leiteira (ZOCCA et al., 2009), sendo assim cadeia produtiva do leite uma das mais importantes para agricultura familiar, em detrimento do número de famílias envolvidas, e de sua capacidade de geração de renda. Os trabalhos de extensão ao produtor familiar são de suma importância no suporte ao produtor que não detém recursos financeiros para implementação de tecnologias em sua propriedade, tendo dificuldades em sobreviver desta atividade econômica. Ao estabelecer seus critérios, a legislação em vigor, concernente às práticas adequadas de higiene e infraestrutura para propriedades produtoras de leite, não considerou a realidade da produção familiar que dependem economicamente desta atividade, muitas vezes passada de geração a geração. No entanto, além das questões relacionadas à qualidade e higiene da produção leiteira, há também questões econômicas, sociais e culturais que devem ser consideradas (BASSO et al., 2005)

A criação de políticas públicas pautadas nas características das propriedades rurais são não só uma necessidade, como também um compromisso social que se deve ter com o produtor familiar. De acordo com Gomes (2009), o treinamento e a capacitação tecnológica dos produtores, cooperativas e laticínios, objetivando a sustentabilidade social, ambiental e econômica da bovinocultura leiteira é fundamental para que os produtores possam se manter no mercado competidor globalizado. O Brasil possui boas oportunidades de se tornar um grande exportador de lácteos, devido a sua própria competitividade (CLAUCK, 2009). Existe um grande mercado a ser conquistado, como a Ásia e África. No cenário mundial de integrações, e especialmente na integração com o Mercosul, a unidade produtiva brasileira,

por sua característica predominantemente familiar e de subsistência, foi o elo mais atingido e, conseqüentemente, incapacitado de reagir às exigências do mercado. Embora muitos produtores de leite estejam acompanhando estas modificações, pode-se perceber que houve a exclusão de um grande contingente deles, incapacitados de atender as exigências de um setor que entrou na era da competitividade e numa economia (ZOCCAL,2009). Segundo dados do IBGE, 64,4% dos produtores do Brasil vendem menos de 50 litros de leite por dia, o que corresponde a cerca de 800 mil pequenos produtores familiares, de um total de 1,3 milhão que vendem leite.

Assim, verifica-se que no processo de trabalho do produtor familiar ocorre a subordinação formal do trabalho ao capital à medida que o produtor, sendo proprietário dos meios de produção, tais como terra, animais e equipamentos, tem seu produto subjugado no momento de sua transformação em mercadoria.

Desta forma, para superá-las limitações é fundamental que a execução dos programas de extensão, conheça mais a fundo o público-alvo a quem os programas são dirigidos.

Os indivíduos que atuam na linha de ordenha devem ser continuamente capacitados, e para que sejam implementadas as necessárias modificações, suas crenças e hábitos de higiene devem ser estudados (COSTA et al., 2002).

Conforme assinalado por Da Ros (2012), o principal desafio das ações de extensão propostas no presente estudo é discutir alternativas capazes de promover mudanças nos processos sócio-produtivos no âmbito desta atividade e não somente analisar e problematizar a realidade da produção leiteira. Outro desafio é o de atender ao caráter interdisciplinar para poder atuar de modo coerente nos processos de mediação e intervenção, promovendo o acompanhamento constante da dinâmica dos processos, o conhecimento desta realidade social e a aproximação do nosso Grupo de Pesquisa à prática social dos produtores e suas comunidades. Visando, assim, contribuir para a formação de profissionais academicamente competentes, porém mais sensíveis aos problemas e demandas da sociedade, não analisando-a de modo distante, apenas como objeto de estudo.

3 METODOLOGIA

3.1 Área de Estudo

O Vale do Paraíba do Sul localiza-se na região Sudeste brasileira, abrangendo dois Estados da Federação – São Paulo e Rio de Janeiro. O nome da região faz referência ao fato de a mesma ser a parte inicial da Bacia Hidrográfica do rio Paraíba do Sul, que nasce na Serra da Bocaina, em São Paulo, e tem sua foz em Atafona, no Rio de Janeiro. Ocupando área de cerca de 57.000 km², a bacia de drenagem representa 6% do território da região Sudeste (Figura 1).

A porção fluminense do Vale do Paraíba abrange os municípios de Barra do Piraí, Rio das Flores, Valença, Barra Mansa, Itatiaia, Pinheiral, Piraí, Porto Real, Quatis, Resende, Rio Claro e Volta Redonda, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia Estatística (IBGE, 2004).

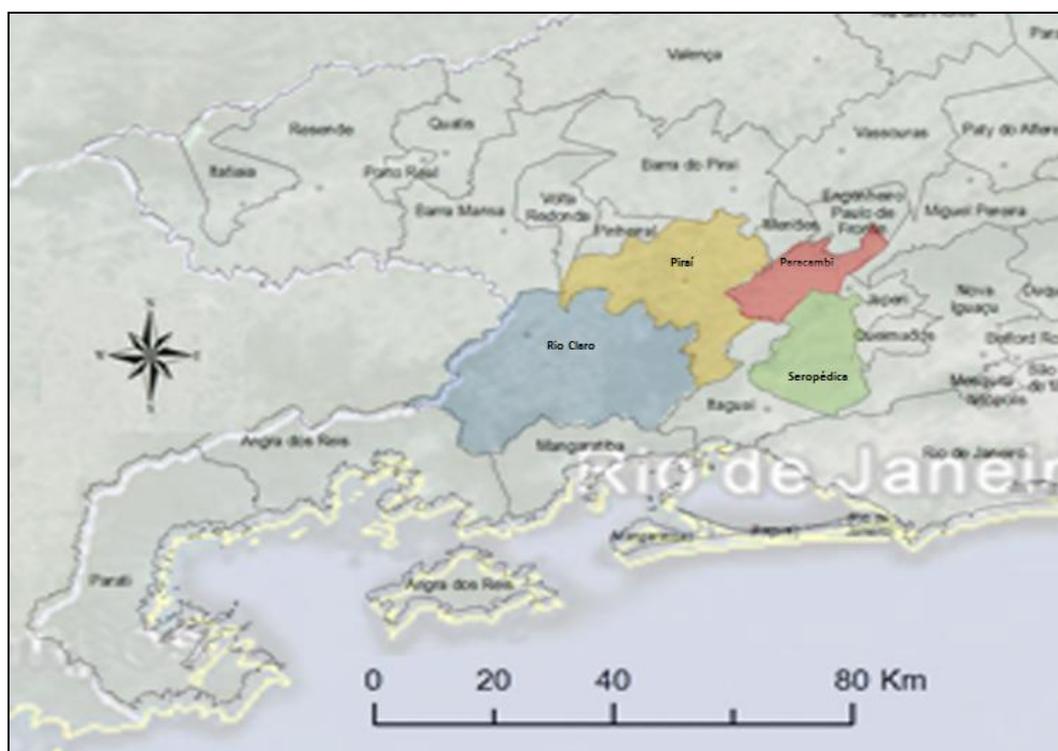


Figura 1. Mapa de localização dos municípios do Estado do Rio de Janeiro. Em destaque municípios estudados. Adaptado de: <http://www.mapasparacolorir.com.br/mapa/estado/rj/estado-rio-de-janeiro-municipios-nomes.png> e Googler earth. Acesso em: 02/02/2014.

3.2 Seleção das Propriedades

Foram selecionadas oito propriedades rurais produtoras de leite bovino, sendo quatro no município de Rio Claro-RJ, uma em Piraí- RJ, duas no município de Paracambi e uma no município de Seropédica, sendo estas propriedades assistidas por veterinários que mantêm cooperação com o grupo de pesquisa. Os critérios adotados para caracterização das

propriedades foram: a produção em larga ou pequena escala, o tipo de ordenha, o número de animais e o percentual de animais mastísticos.

3.3 Realização do Instrumento Diagnóstico

Durante as visitas as propriedades leiteiras foi aplicado um instrumento diagnóstico com o objetivo de identificar os principais fatores de riscos para mastite bovina. Foram observadas variáveis relacionadas às condições de limpeza e higiene do curral de espera dos animais e sala de ordenha. Aos ambientes foram atribuídos os graus 0, 1 e 2 quanto ao enquadramento nos aspectos de limpeza e higiene da seguinte forma: em conformidade com os parâmetros adequados (2), em conformidade parcial quando apenas parte dos parâmetros relacionados à higiene e limpeza foi observada (1) em não conformidade quando nenhum dos parâmetros foi observado (0) e quando não era possível realizar a avaliação de algum quesito, este era classificado como não aplicável (NA). Observou-se também o manejo dos animais na sala de ordenha, a rotina na preparação dos animais para ordenha e os principais parâmetros relacionados às práticas de higiene dos ordenhadores, como realização de lavagem e higienização das mãos, utilização de indumentárias adequada entre outros aspectos. Também foi averiguado se as propriedades realizavam a terapia da vaca seca, se realizavam antibioticoterapia para o tratamento da mastite mediante o laudo do antibiograma e se os animais mastísticos eram identificados e segregados em diferentes lotes na linha de ordenha.

3.4 Seleção dos animais

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 a coleta do leite. O CMT é usado mundialmente para o diagnóstico da mastite subclínica, tendo a vantagem de poder ser empregado no próprio rebanho, no momento em que os animais são ordenhados além de ser um método de fácil aplicação e baixo custo (BRITO et al., 2002).

Consiste na coleta de leite dos quartos mamários, individualmente, em uma bandeja apropriada, adicionando-se um detergente aniônico neutro, o qual atua rompendo a membrana dos leucócitos e liberando o material nucléico (DNA), que apresenta alta viscosidade. De acordo com a intensidade da reação classifica-se em: negativa (0), reação leve (+), moderada (++) e intensa (+++) (FONSECA; SANTOS, 2000; BRITO et al., 2002).

3.5 Coleta das Amostras de Leite

A coleta do leite foi realizada por meio de ordenha manual e individual, antecedida por lavagem das mãos e do teto do animal com água e sabão e álcool a 70%, com secagem dos mesmos com papel toalha. Os três primeiros jatos de leite foram despresados e em seguida os demais jatos foram colhidos diretamente em frascos estéreis, colocados em caixas isotérmicas refrigeradas e encaminhadas imediatamente ao Laboratório de Bacteriologia Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

3.5.1 Amostras da linha de ordenha

Foram coletadas amostras das mãos, da cavidade nasal dos ordenhadores, da ordenhadeira mecânica, latões de leite e da água utilizada nos procedimentos de limpeza da sala de ordenha e dos animais.

As coletas das amostras das mãos dos ordenhadores foram realizadas após a lavagem que antecede os procedimentos da ordenha. Foi utilizado um *swab* estéril para as duas mãos

de cada ordenhador, os *swab* foram passados nos espaços interdigitais, nos espaços subgueais e sobre as palmas das mãos dos ordenadores. A coleta das amostras da cavidade nasal dos ordenadores foi realizada através da introdução de *swab* estéreis individuais em movimentos circulares.

As amostras da ordenhadeira mecânica foram coletadas imediatamente após a higienização das mesmas, os *swab* estéreis foram friccionados na superfície interna das teteiras em 20 movimentos circulares para cima, a partir da borda da borracha insufladora e 20 movimentos circulares para baixo, em uma altura de 15 cm (OLIVEIRA; BRUGNERA; PICOLLI, 2007). As amostras dos latões de leite foram coletadas antes dos mesmos serem higienizados (contendo resíduos de leite). Os *swab* estéreis foram friccionados em 20 movimentos circulares em toda superfície da borda do latão até a parte interna. Após a coleta os *swab* foram acondicionados em tubos de ensaio contendo ágar transporte, identificados e colocados em refrigeração.

Foram coletadas ainda amostras de água das oito propriedades visitadas, para obtenção das amostras foi retirado 1000mL de água de torneiras e mangueiras da sala de ordenha em recipientes estéreis. As amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas refrigeradas até o laboratório de Bacteriologia Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro para a realização dos testes de identificação bacteriológica. O início do processamento das amostras foi realizado em tempo inferior a 2 horas após a coleta das amostras.

3.6 Análise Bacteriológica

3.6.1. Isolamento primário e identificação presuntiva

As amostras do leite e os *swab* foram submetidos à rotina de identificação que consistiu no isolamento em ágar Müeller Hinton (MH) contendo 5% sangue desfibrinado de carneiro (AS). As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas, em aero e anaerobiose, após a análise das características morfológicas das colônias, foi realizada a coloração de Gram para avaliação das características morfotintoriais e teste do KOH (3%) para confirmação das mesmas. De acordo com as características encontradas os isolados foram processados para melhor identificação segundo protocolos estabelecidos na literatura (KONEMAN et al, 2008).

3.6.2 *Staphylococcus* spp.

O isolamento primário foi feito em ágar sangue (AS) e depois as amostras foram repicadas em ágar seletivo manitol vermelho de fenol (MVF). Após a identificação presuntiva das colônias, elas foram submetidas ao método de Gram, para confirmar suas características morfotintoriais, à prova da catalase e ao teste do KOH a 3%, onde a não formação de gel viscoso indicou resultado negativo (KONEMAN et al., 2008). A prova da coagulase em tubo foi aplicada para diferenciar entre as espécies de *Staphylococcus*. Uma alíquota de 0,1 ml de cada amostra cultivada em caldo BHI (Infuso de Cérebro e Coração) foi adicionada a 0,5 ml de sangue total de carneiro, acrescido de etileno-diamina-tetra-acetato (EDTA-1%) e incubadas a 37°C por 6 horas para obter a visualização do coágulo. As amostras coagulase-positivas tiveram sua identificação comprovada através das provas de *Voges-Proskauer* (VP), fermentação da maltose e redução do nitrato (KONEMAN et al., 2008). As amostras coagulase-negativas foram submetidas à prova da resistência a bacitracina para diferenciação entre *Micrococcus* spp., sensíveis, e *Staphylococcus* spp. (KONEMAN et al., 2008).

3.6.3 Enterobactérias

Além do isolamento primário em A.S, as amostras também foram repicadas em meios seletivos como ágar Mac Conkey (MC) e Eosina Azul de Metileno (EMB). Após a identificação presuntiva das colônias, estas foram submetidas ao método de Gram, teste da catalase e prova do KOH a 3%, onde a formação de gel viscoso indicou resultado positivo. As seguintes provas de identificação foram realizadas: comportamento em ágar tríplice açúcar-ferro (TSI), motilidade em tubo, produção do indol, produção de ácidos a partir da glicose, fermentação de açúcares, redução do nitrato, produção de gelatinase, produção de urease, degradação do citrato e do malonato, e outros diferenciais de acordo com o microorganismo envolvido (KONEMAN et al., 2012).

3.6.4 Análise microbiológica da água.

Para a determinação da presença de coliformes totais e termotolerantes em 1000 mL de água, foi usada a técnica de ausência em 100mL de água, considerando os padrões microbiológicos de potabilidade de água de consumo humano da portaria nº 518 de 25 de Março de 2004 do Ministério da Saúde (Brasil,2004). Foram preparados 10 tubos de ensaio contendo tubos de Durhan invertidos, em Caldo Lauril Triptose Soja (TSA - Britania), em concentração dupla, a estes foi inoculado um volume de 10mL diretamente da amostra, também foram inoculados volumes de 1mL e 0,1 da amostra em 2 séries de cinco tubos contendo o mesmo caldo em concentrações simples. Em seguida os tubos foram incubados em estufa a 35°C por 24 horas.

Foram consideradas positivas para prova presuntiva de presença coliformes, as amostras que apresentaram formação de gás no interior dos tubos de Durhan.

Cada tubo considerado positivo na etapa anterior foi repicado para tubos contendo verde brilhante bile 2% lactose (caldo VB) e caldo *Escherichia coli* (caldo EC), os quais foram incubados por até 48 horas a 36 C° e 45 C° respectivamente. Os tubos com formação de gás em caldo VB confirmaram a presença de coliformes totais, e os tubos positivos contendo caldo EC confirmaram a presença de coliformes fecais.

De posse dos resultados quanto ao número de tubos positivos para coliformes totais e fecais em cada série de cinco tubos de NMP foi calculado utilizando-se a planilha do *software* Excel disponibilizada pelo FDA (BLODGETT, 2001). A técnica do NMP gera o valor zero quando todos os 5 tubos apresentam resultados negativos, mas para o referente *software* utilizado foi considerado os valores de $\leq 1,8$. Para fins de análise estatística e cálculo de médias, o valor $\leq 1,8$ foi considerado 1,8, tendo em vista que para realização de médias geométricas não pode ser utilizado o valor zero.

3.7 Testes de Suscetibilidade Antimicrobiana

3.7.1 Preparo do inóculo

Os isolados foram suspensos em Caldo Cérebro coração (BHI), incubados durante 24 horas a uma temperatura de 37°C e diluídos na concentração do tubo 0,5 da escala de *Mc Farland*, equivalente a $1,5 \times 10^6$ células/mL. Tal concentração foi ajustada através do espectrofotômetro de absorbância 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.

3.7.2 Difusão em disco simples

A suspensão bacteriana (0,1ml) foi distribuída por toda a superfície das placas contendo Ágar Mueller Hinton (AMH) (Merck®) com o auxílio da alça de Drigalski. Os discos foram depositados sobre a superfície do meio de cultura, já contendo o inóculo. Após incubação por 24 horas a 35°C, os diâmetros formados na zona de inibição ao redor do depósito dos fármacos, foram observados e medidos, em milímetros (CLSI, 2012).

Na tabela 1 estão listados os antibióticos testados nesse estudo e suas respectivas zonas de inibição de acordo com o CLSI, 2012. A escolha dos antibióticos foi feita a partir de informações dos fármacos mais utilizados nas propriedades para o tratamento da mastite.

Tabela 1. Zonas de inibição avaliadas pelo diâmetro dos antimicrobianos utilizados.

Antimicrobianos	Zonas de inibição (mm)		
	Resistente	Intermediário	Sensível
Tetraciclina (30µg)	≤14	15-16	≥19
Gentamicina (10µg)	≤12	13-14	≥15
Enrofloxacina (10µg)	≤14	15-17	≥18
Cefalotina (30µg)	≤14	15-17	≥18
Ampicilina (10µg)	≤28	-	≥29
Penicilina (10UI)	≤28	-	≥29
Sulfametoxazol-trimetropim (25µg)	≤10	11-15	≥16
Ciprofloxacina (5µg)	≤15	16-20	≥21
Neomicina (30µg)	≤12	13-16	≥17
Azitromicina (15µg)	≤13	14-17	≥18
Doxiciclina (30µg)	≤10	11-13	≥14
Norfloxacina (15µg)	≤12	13-16	≥17
Oxacilina (1µg)	≤10	11-12	≥13
Cefoxitina (30µg)	≤24	-	≥25

3.7.3 Ágar “screen” para pesquisa de *Staphylococcus* spp resistentes à oxacilina

Em adição à difusão em disco simples com discos de oxacilina e cefoxitina, também foi realizada a técnica de ágar *screen* através da diluição da oxacilina (1,0mg/ml) a uma concentração final de 6µg de antibiótico por mililitro de meio de cultura AMH, suplementado com 4% de NaCl. As placas de Petri foram divididas em oito partes iguais e sobre cada linha foi possível a inoculação de uma suspensão, ou seja, para cada placa foi possível a inoculação de 8 suspensões bacterianas distintas, semeadas com o auxílio da alça de platina. Após 24 horas de incubação a 35°C a resistência das cepas bacterianas ao antibiótico foi avaliada, onde qualquer colônia crescida na superfície do meio de cultura foi considerada resistente (KOHNER et al., 1999).

3.7.4 Pesquisa de produção de betalactamases em enterobactérias

a) Difusão em disco

Esta técnica foi realizada seguindo a mesma metodologia descrita anteriormente, segundo normas do CLSI (2008), porém com discos específicos de penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e associação com inibidores (ácido clavulânico) - (Sensidisc DME®) descritos na tabela abaixo (tabela 2).

Tabela 2. Zonas de inibição avaliadas pelo diâmetro dos antimicrobianos utilizados, segundo o CLSI (2012).

Antimicrobianos		Zonas de inibição (mm)			
Nome	Classificação	µg	Resistente	Intermediário	Sensível
Amox+ÁC	Aminopenicilina+AC*	30	≤13	14-17	≥18
Amoxicilina	Aminopenicilina	10	≤13	14-16	≥17
Ampicilina	Aminopenicilina	20	≤13	14-16	≥17
Aztreonam**	Oxyimino-monobactâmico	30	≤17	18-20	≥21
Cefalotina**	Oxyimino-cefalosporina	30	≤14	15-17	≥18
Cefepime	Oxyimino-cefalosporina	30	≤20	21-23	≥24
Cefoxitina	Cefamicina	30	≤14	15-17	≥18
Ceftazidima	Oxyimino-cefalosporina	30	≤17	18-20	≥21
Ceftriaxona	Oxyimino-cefalosporina	30	≤13	14-20	≥21
Imipenem	Carbapenema	10	≤13	14-15	≥16
Oxacilina**	Penicilina	1	≤17	-	≥18
Penicilina	Benzilpenicilina	10UI	≤28	-	≥29

*AC – ácido clavulânico **Foi utilizado para a realização de testes complementares em alguns isolados. A avaliação da suscetibilidade à oxacilina para os suspeitos de pertencerem ao grupo 2d ou 2br, aztreonam para os suspeitos do grupo 2ber e cefalotina para separação dos grupos 2b e 2e.

b) Confirmação dos principais grupos de betalactamases

A produção de ESBL, AmpC e Carbapenemases foi avaliada em todas as enterobactérias, em trabalho paralelo no LABAC-VET por Santiago (2013), durante seu trabalho de dissertação através dos testes de avaliação da concentração inibitória mínima (SOUZA Jr et al., 2004), aproximação em disco (SOUZA Jr et al., 2004., MARTINEZ-ROJAS 2009) e Teste de Hodge modificado (CLSI, 2012), respectivamente.

3.8 Detecção Fenotípica da Produção de *Slime* em Microplaca em *Staphylococcus* spp. Isolados de Amostras de Leite e da Linha de Ordenha.

A produção de *slime* em microplaca foi avaliada qualitativamente através do método proposto por Cucarella et al., 2001, com modificações padronizadas em nosso laboratório.

Os isolados foram repicados em AS por 24hs a 37°C e as colônias crescidas foram inoculadas em caldo tripticase soja (TSA - Britania) contendo 0,24% de glicose para estimular a produção do *slime*, e também incubada a 37°C por 24hs. A seguir, alíquotas de 0,2 mL desta suspensão foram inoculadas em microplacas de poliestireno estéreis com 96 poços contendo o mesmo caldo e incubadas por 24 horas à 37°C sem agitação. Após incubação, este material foi desprezado e os poços foram lavados 2 vezes com 200µL de solução salina estéril, secos em estufa à 65°C por 1h e corado com 200µL de safranina 1% por 15 min. Os poços foram lavados três vezes com água destilada e secos à temperatura ambiente. A absorbância foi determinada à 490nm em leitor de ELISA (BIO RAD MODEL 680). Poços não inoculados contendo caldo TSA com 0,24% de glicose serviram como branco. Os testes foram realizados em triplicata, a leitura avaliada em momentos diferentes (no dia em que foi realizada a coloração: 0DPC, um dia após a coloração: 1DPC e sete dias após a coloração: 7DPC) e uma média foi retirada dos valores obtidos em cada dia de leitura. As cepas com absorbância maior que 0,1 foram consideradas produtoras de biofilmes (MACK et al, 2000; VASUDEVAN et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2006). A produção de *slime* foi considerada forte, moderada ou fraca, conforme demonstrado na tabela 3.

Tabela3. Classificação da produção de “slime” pelo método da microplaca

Produção de <i>Slime</i>	Absorbância
Fraca	0,1 > 0,2
Moderada	0,2 > 0,3
Forte	> 0,3

3.9 Técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) para a Amplificação dos Genes de Resistência e Virulência.

Todo o experimento de extração do DNA e amplificação dos genes de resistência e virulência foi realizado no Laboratório de Genética de Microrganismos situado no Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

3.9.1 Extração do DNA bacteriano

A extração do DNA bacteriano foi realizado segundo protocolo otimizado pelo Laboratório de Bacteriologia Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, onde cada colônia crescida em ágar manitol vermelho de fenol foi repicada em 5 mL de caldo BHI (MERK®). Após 18hs a 37°C, uma alíquota de 1,5 mL do caldo contendo o inóculo foi transferida para microtubos que foram centrifugados a 14.000 rpm por 1 min, tal processo foi repetido três vezes, afim de se obter um pellet maior. Após duas lavagens com 500µl de tampão TE a 14.000 rpm por 1 min, ressuspendeu-se o pellet em 250µl de tampão de extração (NaCl 150mM; Tris-HCl 100mM e EDTA 20mM) e foi adicionada lisostafina (SIGMA®) para concentração final de 20µg/ml (5µl de lisostafina – 1mg/ml). Após incubação à 37°C por 30 minutos, foi adicionado SDS 1% aos microtubos para concentração final de 3mg/ml, os quais foram levados ao banho-maria a 50°C por 1 hora e posteriormente incubados a -20°C por 10 min. Após a centrifugação a 14.000 rpm por 10 min, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo, adicionado a este o mesmo volume de clorofórmio:álcool isoamílico

(24:1) e misturado por inversão por 5 min. Logo após a centrifugação a 14.000 rpm por 1 min, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo, adicionado NaCl para concentração final de 0,3M e misturado por inversão, acrescentado 2 volumes de etanol 100% e também misturado por inversão, seguido de incubação a -20°C por 2 horas ou overnight. Após isto, procedeu-se a centrifugação a 14.000 rpm por 30min e descarte do sobrenadante, o pellet foi lavado com 500µl de etanol 70% e colocado para secar a temperatura ambiente. O pellet foi ressuspensionado em 30 µl de água mili-Q.

3.9.2 Amplificação dos genes através da técnica de PCR

As concentrações utilizadas em todas as reações de PCR foram Tampão 1X (10 mM Tris-HCl; 50 mM KCl, e 0,1% Triton X-100, 2,0 mM de MgCl₂; pH 9,0), 0,5 mM de cada iniciador (BIONEER®), 0,2 mM de dNTP (FERMENTAS®), 2 U de Dream Taq™ Green DNAPolimerase (FERMENTAS®) e água mili-Q para completar um volume total de reação de 20µl, contendo 2µl do DNA extraído (SAMBROOK et al., 2002).

Os amplicons foram avaliados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, contendo corante SYBR Green (INVITROGEN®) diluído. A diluição foi feita na proporção de 1µl de solução estoque concentrada 10000X do corante para cada 10ml de gel de agarose, possibilitando a visualização dos amplicons no transiluminador ultra-violeta e documentação pela câmera fotográfica (SONY – Modelo DSC-HX1®), utilizando marcador de peso molecular de 100 pb (FERMENTAS®).

a) Caracterização genotípica das espécies de *Staphylococcus* spp.

Todos os isolados foram caracterizados genotipicamente. Inicialmente foi realizada uma PCR multiplex para os genes 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* (KARAHAN & 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*), foi submetido a enzima de restrição *MboI* (BANNOEHR et al., 2007) para outras espécies de estafilococos coagulase positivos (ECP) (Tabela4).

Tabela4. Iniciadores e ciclos empregados para amplificação dos genes de identificação das espécies de *Staphylococcus* spp. coagulase-positivos.

Gene	Espécie	Primer (5' - 3')	Ciclo*
<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
DNAr (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)**	<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

*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.**v: fragmento variável

b) Genes de relacionados à resistência aos Betalactâmicos em *Staphylococcus* spp.

Foi realizada a técnica de PCR para amplificação dos genes *blaZ* (ROSATO et al., 2003) e *mecA* (COELHO et al., 2007), como mostra a tabela 5.

Tabela 5. Iniciadores e ciclos empregados para amplificação do genemecA de *Staphylococcus* spp.

Gene	Primers	Ciclos *
<i>mecA</i> (513 pb)	AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGGC AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C	1

*1. (94°C 30s, 55°C 30s, 72°C 1 min) x 40 e 72°C 5min

c) Genes relacionados à produção de Slime em *Staphylococcus* spp.

Foi realizada a técnica de PCR simples para a amplificação dos genes envolvidos na produção de *slime*, *icaA* e *icaD* (VASUDEVAN et al., 2003) em todos os *Staphylococcus* spp. Os iniciadores e ciclos utilizado estão expostos na tabela 6.

Tabela 6. Iniciadores e ciclos empregados para amplificação dos genes de virulência de *Staphylococcus* spp.

Gene (fragmento)	Iniciadores (5' - 3')	Ciclos*
<i>icaA</i> (1315pb)	CCT AAC TAA CGA AAG GTA G AAG ATA TAG CGA TAA GTG C	1
<i>icaD</i> (381pb)	AAA CGT AAG AGA GGT GG GGC AAT ATG ATC AAG ATA C	1

*1 (92°C 45s, 49°C 45s., 72°C 1 min) x 30 e 72°C 7min

3.10 Eletroforese em Campo Pulsado (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis* – PFGE):

O PFGE foi realizado segundo o protocolo descrito por Saulnier e colaboradores (1993), com algumas modificações realizadas por Reinoso (2004). Os isolados de *Staphylococcus* spp. foram inoculados em caldo cérebro coração (BHI) e incubados por 16-18 horas a 37°C. Uma diluição de 1/50 foi realizada e esta foi incubada a 37°C até atingir OD₆₆₀ = 0,7 – 0,8. Em seguida 1,5 mL da cultura foi centrifugado a 5510 xg por 10 min e o sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspensas em 300 µL de tampão TEN (100 mM EDTA, 0,15 M NaCl, 100 mM Tris pH 7,5) e centrifugadas por 5 min a 5510 g. Em seguida o sobrenadante foi descartado e os sedimentos foram ressuspensos em 150 µL de tampão EC (100 mM EDTA, 1 M NaCl, 6 mM Tris-HCl pH 7,6, 0,2 % de deoxicolato, 0,5% de n-lauroilsarcosinato de sódio e 0,5% de Brij 58). Uma alíquota de 150 µL de agarose de baixo ponto de fusão a 2% fundida foi adicionada, homogeneizada e as amostras foram transferidas para os moldes, que foram incubados a 4°C por 5 min. Os blocos foram transferidos para tubos contendo 5 mL de tampão EC e lisozima (na concentração final de 0,5 mg/mL) e incubados em banho maria a 36°C por 16-18 h. Os blocos foram transferidos para 5 mL de tampão de lise (0,5 mM de EDTA, 1 % de n-lauroilsarcosinato de sódio), acrescido de proteinase K na concentração final de 0,2 mg/mL e incubados em banho maria a 50 °C por 4h sob agitação suave. Após a remoção do tampão de lise foram adicionados 10 mL de tampão

TE e os tubos foram colocados em banho maria a 37°C por 30 min. Este procedimento foi repetido três vezes. Ao término das três lavagens, foram acrescentados aos blocos 60 U de enzima de restrição *SmaI*, 2 µL de BSA 10 mg/mL, 20 µL de tampão J e 73 µL de água. Estes foram incubados por 4 h a 25°C.

Os blocos foram transferidos para poços do gel de agarose 1% (Bio-Rad), preparado com 0,5 x de TBE e separados por eletroforese em um equipamento CHEF-DR III system (Bio-Rad). As condições de corrida foram realizadas segundo critérios estabelecidos por Tenover e colaboradores (1994): tempo pulso inicial: 5 min, tempo pulso final: 25 seg., tempo de corrida: 24 h., ângulo do campo elétrico: 120°, voltagem: 6 V/cm. Concatâmeros do fago lambda foram utilizados como marcador de peso molecular.

A observação visual do padrão de bandas no gel foi utilizada para construção de uma matriz binária (1 = presença de banda; 0 = ausência de banda). A partir dessa matriz, foi calculada a similaridade entre as cepas e o dendrograma foi construído utilizando o software NT-SYS versão 3.0 segundo o coeficiente de Dice (S_D) e os coeficientes de correlação de agrupamento foram calculados segundo a média aritmética no ponderada (UPGMA) com ligamento completo (SNEATH & SOKAL, 1973). A determinação das possíveis associações foi realizada pelo software estatístico SSPS.

3.11 Análise Estatística

Os perfis de suscetibilidade aos fármacos testados foram expressos em porcentagens que foram analisadas de forma descritiva. O programa Excel (Microsoft®) foi utilizado para confecção dos gráficos com os percentuais dos isolados identificados e para a construção dos gráficos com percentuais de suscetibilidade antimicrobiana.

Os resultados obtidos a partir do instrumento diagnóstico, foram submetidos ao teste estatístico para avaliar a significância de animais com mastite clínica e subclínica e os fatores de risco extrínsecos (deficiência na limpeza e higiene do ambiente de ordenha e inadequações das práticas de higiene do ordenhador), determinantes para a prevalência da mastite entre as oito propriedades estudadas, foi utilizado o software Bioestati 5.1 (2011).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização das Propriedades

Foram visitadas oito propriedades, sendo quatro localizadas no município de Rio Claro, uma em Pirai, duas em Paracambi e uma em Seropédica. No total, 407 animais foram submetidos ao teste do CMT. As características de cada propriedade estão na tabela 7.

Tabela 7. Caracterização geral das fazendas

Fazenda	Localização	Características gerais das propriedades							
		Total de vacas	Vacas em lactação	Tipo de rebanho	V. de leite diário	Tipo de ordenha	% CMT positivo	% Mastite subclínica	% Mastite clínica
A	Seropédica	45	26	Mestiço	300	Mecânica	65% (17/26)	94% (16/17)	6% (1/17)
B	Rio Claro	200	127	Girolando	2000	Mecânica	68% (87/127)	97% (84/87)	3% (3/87)
C	Pirai	200	115	Holandês	1700	Mecânica	80% (92/115)	92% (85/92)	8% (7/92)
D	Rio Claro	50	25	Girolando	100	Manual	60% (15/25)	100% (15/15)	0% (0/15)
E	Paracambi	50	27	Girolando	80	Manual	67% (18/27)	83% (15/18)	17% (3/18)
F	Paracambi	40	16	Girolando	50	Manual	75% (12/16)	83% (10/12)	17% (2/12)
G	Rio Claro	50	46	Girolando	130	Manual	20% (9/46)	100% (9/9)	0% (0/9)
H	Rio Claro	52	25	Mestiço	105	Manual	68% (17/25)	82% (14/17)	18% (3/17)

Em sete dos oito rebanhos avaliados, a frequência de animais CMT positivos foi superior a 50%. Nas propriedades A, B, C, E, F e H, foram diagnosticados animais com mastite clínica. O maior percentual (18%) foi encontrado na propriedade H, seguidos de 17% nas propriedades E e F. As propriedades A, B, C apresentaram percentuais de 6%; 3% e 8%, respectivamente. Embora a propriedade C tenha apresentado um dos melhores resultados referente aos aspectos voltados para limpeza e higiene do ambiente de ordenha e para manejo dos animais, foi detectado 80% de positividade ao teste do CMT dos animais em lactação.

Este resultado pode estar relacionado à insuficiência na higiene pessoal, aspecto comum em todas as propriedades avaliadas. Como também com a questão genético-racial, pois os animais desta propriedade eram da raça holandesa (tabela 7). Esta raça, embora apresente características genéticas que lhe conferem maior produtividade, possui tetos pendulares mais próximos ao chão, considerado um fator predisponente a infecção. Oliveira e colaboradores (2012) ao avaliarem os fatores de riscos da mastite, observaram frequência menor de positividade ao exame microbiológico em animais mestiços em relação a raça holandesa. Alguns autores reportam que a profundidade do úbere é um fator de risco importante, onde animais que possuem a base do úbere abaixo ou próximo ao jarrete apresentam mais chances de terem a CCS acima de 200.000 células/mL, do que os animais com a base acima do jarrete (CARNEIRO et al, 2009; COENTRÃO et al, 2008).

As fazendas B e C assemelham-se quanto à estrutura da propriedade, número de animais, volume de leite ordenhado e tipo de ordenha. Apesar de atenderem às exigências estipuladas pela legislação vigente no que tange as instalações, equipamentos e infra-estrutura da sala de ordenha, em ambas foi detectado um elevado percentual de animais CMT positivos semelhante ao encontrado nas fazendas E e F 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 de se considerar a capacitação da mão de obra atuante na linha de ordenha vinculada a hábitos sistemáticos de higiene, independente da realidade tecnológica da propriedade.

4.2 Resultados do Instrumento Diagnóstico

A análise dos fatores de risco para mastite bovina revelou que todas as propriedades apresentaram grandes fragilidades em relação à manutenção da limpeza e higiene do ambiente de ordenha (Tabela 8). Estes aspectos são considerados preponderantes para prevenção da mastite bovina, uma vez que os cuidados relacionados ao ambiente onde ficam os animais influenciam diretamente no desenvolvimento da doença (SCHOEDER, 2012).

Foi observado que tanto na propriedade A enquanto na H, não houve conformidade em quaisquer dos quesitos avaliados referentes a limpeza e higiene do ambiente de ordenha. Aires (2010) alerta que a limpeza e higiene das instalações dos animais são fundamentais na profilaxia da mastite bovina, pois as vacas leiteiras passam entre 45 e 65% do tempo deitadas e as sujidades no ambiente aumenta a probabilidade de contaminação dos tetos facilitando a progressão dos microrganismos para o canal do teto e posterior infecção da cisterna da glândula. Foi observado que 87,50% das propriedades não realizavam a limpeza e o armazenamento adequado dos utensílios utilizados na ordenha, como ilustrado na Figura 2.



Figura 2. Armazenamento inadequado dos utensílios utilizados na linha de ordenha na propriedade D.

De acordo com Franco e colaboradores (2000), o leite pode ser contaminado em qualquer das etapas de produção, beneficiamento, distribuição e consumo por microrganismos patogênicos ou deteriorantes. Práticas inadequadas de manejo, higienização insuficiente de equipamentos na sala de ordenha e no beneficiamento, conservação inadequada tornam o leite suscetível a contaminação (SANGALETTI et al., 2009; CERESER et al., 2011). Segundo Mattioda (2012), nos vários estudos no Brasil para avaliar a qualidade microbiológica do leite e dos produtos lácteos os resultados obtidos tem sido insatisfatórios.

Tabela 8. Resultados do instrumento diagnóstico de cada propriedade visitada.

Limpeza e higiene do ambiente de ordenha	A	B	C	D	E	F	G	H
Limpeza do curral	0	1	2	1	0	1	0	0
Bebedouros limpos	0	1	2	1	0	1	0	0
Limpeza da sala de espera	0	1	2	1	0	0	0	0
Limpeza e higiene da sala de ordenha	0	1	2	1	0	0	0	0
Limpeza e higienização das teteiras entre ordenhas	0	1	1	NA	NA	NA	NA	0
Limpeza e armazenamento dos utensílios utilizados na ordenha de forma adequada	0	0	1	0	0	0	0	0
É realizada a manutenção dos equipamentos de ordenha	0	0	0	NA	NA	NA	NA	0
Controle de vetores e pragas	0	0	0	0	0	0	0	0
Presença de outros animais em alguma dessas instalações	0	2	0	0	0	0	0	0
Manejo de ordenha								
Conforto ambiental (sombra, disponibilidade de água, acessibilidade dos piquetes)	0	0	2	2	0	2	0	0
Encaminhamento adequado dos animais para ordenha	0	1	0	2	0	0	0	0
Vacas tranquilas durante a ordenha	0	1	0	2	2	2	0	0
Realiza teste da caneca telada	2	2	2	2	0	1	0	0
Realiza pré e pós dipping	1	2	2	2	0	1	0	0
Tetos dos animais limpos	0	0	2	2	0	0	0	0
Presença de bezerro ao pé	0	0	0	0	0	0	0	0
Tempo de ordenha entre 5-6 minutos	2	2	0	2	2	2	2	2
Os animais são mantidos de pé por aproximadamente 1 hora após a ordenha	0	2	2	2	0	2	0	0
Realização da lavagem dos tetos	1	1	0	2	0	0	0	0
Práticas de higiene do ordenhador na linha de ordenha								
Os ordenhadores realizam a lavagem e higienização das mãos	0	1	0	0	0	0	0	0
Os ordenhadores utilizam luvas	2	2	2	0	0	0	0	0
Os ordenhadores trocam de luvas sempre que necessário	0	0	0	0	0	0	0	0
Os ordenhadores utilizam indumentária adequada	0	2	2	0	0	0	0	0
Os ordenhadores apresentam unhas, barbas e cabelos aparados	1	2	0	0	0	0	0	0
Os ordenhadores tosem, cospem, fumam e conversam durante a ordenha	0	1	0	0	0	0	0	0
Os ordenhadores desempenham outras funções além da ordenha	0	2	0	0	0	0	0	0
Os ordenhadores sabem da importância da realização das boas práticas de ordenha	2	2	1	0	0	0	0	0
O ordenhador recebe capacitação periodicamente	0	1	0	0	0	0	0	0
Os ordenhadores apresentavam ferimentos nas mãos	1	0	0	0	0	0	0	0

A propriedade C era a única que realizava limpeza e higiene dos utensílios da ordenha, no entanto, os mesmos não eram armazenados em locais adequados, ficavam expostos à poeira e acessíveis aos outros animais presentes no ambiente. Uma característica observada em 87,50% das propriedades foi a presença de animais de outras espécies no ambiente de ordenha, como cão, gato e aves.

Ainda foi observado que das quatro propriedades que realizavam ordenha mecanizada, 2 não realizavam os procedimentos de limpeza e sanitização dos equipamentos de ordenha, e outras 2 o faziam de forma inadequada. De acordo com Hicpac (2006), a persistência de bactérias patogênicas em superfícies e equipamentos, pode estar relacionada à frequência e a forma como são realizadas a limpeza, a higienização e a desinfecção do ambiente. Estes fatores também são decisivos para a inocuidade do leite. A limpeza tem como principal objetivo remover os resíduos orgânicos e inorgânicos aderidos nos equipamentos, constituídos principalmente, por carboidratos, proteínas, gorduras e minerais (ANDRADE, 2008). Apesar da etapa de limpeza ser capaz de reduzir a carga microbiana, observa-se que a maioria ainda permanece aderida, principalmente quando há a formação de biofilmes bacterianos. Alguns sanitizantes não agem em resíduos da matéria orgânica que permanecem no equipamento após o processo de limpeza incorreto, não sendo capazes de destruir totalmente as células sésseis viáveis (SIMÕES et al., 2006). Desta forma, as etapas de limpeza e sanitização devem ser realizadas corretamente e sistematicamente, considerando a concentração adequada das soluções sanitizantes, seu tempo de contato e temperatura com o intuito de obter maior eficiência antimicrobiana (OLIVEIRA et al., 2013).

Quanto aos parâmetros utilizados para avaliar o manejo de ordenha dos animais, foi detectado que em 100% das propriedades, as vacas leiteiras encontravam-se com bezerro ao pé e em 87,50% das propriedades, os animais encontravam-se sujos no momento da ordenha (Figura 3), carregando resíduos de matéria orgânica para sala de ordenha, aumentando a probabilidade de contaminação dos tetos e do leite.



Figura 3. Animais presentes na linha de ordenha sujos de lama na propriedade B.

Ainda foi observado que em 50% das propriedades não era fornecida alimentação após a ordenha (Figura 4). Esta medida é aconselhada para manter os animais em estação durante a primeira hora após a ordenha, a fim de reduzir a exposição da extremidade do teto às bactérias.

Neste período, o esfíncter do teto permanece relaxado deixando os animais mais suscetíveis a mastite (RODEMBURG,2012)



Figura 4. Animais deitados sobre matéria orgânica após serem ordenhados na propriedade A.

As propriedades G e H apresentaram 90% de não conformidade com os parâmetros utilizados para avaliar as boas práticas do manejo de ordenha.

Observou-se que em 87,50% das propriedades, os animais eram encaminhados de forma inadequada para a linha de ordenha. Segundo Hachem (2005), a condução de forma calma e ordenada para a linha de ordenha, evita o estresse dos animais. Ao contrário, animais estressados tem seu peristaltismo intestinal aumentado e defecam mais na linha de ordenha. O estresse também resulta na retenção do leite, favorecendo a multiplicação de microrganismos no interior da glândula mamária. Segundo Alverdy (2000), a liberação dos hormônios no sangue diante de situações de estresse do hospedeiro estimula a produção dos fatores de virulência destes patógenos. Estudos realizados por Cogan (2007), avaliando a expressão dos fatores de virulência das enterobactérias detectou que quando as mesmas eram expostas *in vitro* a norepinefrina aumentavam a expressão de toxinas. Ainda, Pighetti (2010) realizou um estudo acerca da multiplicação da *E.coli*, devido a presença deste mesmo hormônio e observou que concentrações elevadas no leite permitem que a *E.coli* se adapte e multiplique mais rápido na glândula mamária.

Ao avaliar as práticas de higiene dos ordenhadores na linha de ordenha, foi observado que em 87,50% das propriedades, os ordenhadores não realizavam a lavagem e higiene das mãos, não recebiam capacitação quanto às boas práticas de ordenha, tossiam, cuspiam nas mãos durante a ordenha e apresentavam ferimentos nas mãos. Apenas em três propriedades eram utilizadas luvas de procedimento, no entanto, estas não eram trocadas periodicamente, contribuindo para a dispersão dos agentes contagiosos no ambiente de ordenha. Uma vez que o homem alberga *S. aureus* em suas mucosas nasais e faríngeas, nas mãos e pele, os ordenhadores podem atuar como dispersores destes agentes aos animais, utensílios e equipamentos de ordenha. De igual modo, o *S. agalactiae* também pode ser transferido de um animal para outro devido a falhas de higienização nas mãos e nos utensílios utilizados na ordenha (BRITO & BRITO, 2002). De acordo com Santos (2003), 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. A atuação do ordenhador é fundamental para que a implementação de práticas higiênico-sanitárias sejam eficazes, uma vez que opera os equipamentos da ordenha, latões de leite e tanque de resfriamento.

4.3 Análise Estatística

O teste estatístico usado para avaliar a significância de animais com mastite clínica e subclínica entre as propriedades, mostrou que as propriedades D e G apresentaram percentuais idênticos, em que 100% dos animais com mastite, apresentaram o quadro subclínico. Ainda podemos observar que as propriedades A e C também apresentaram percentuais semelhantes, de animais acometidos por mastite subclínica, próximo à 93%. Já a propriedade B apresentou 97% de animais com mastite subclínica. A Figura 5 mostra a distribuição dos quadros clínicos e subclínicos, entre os animais positivos para o teste do CMT.

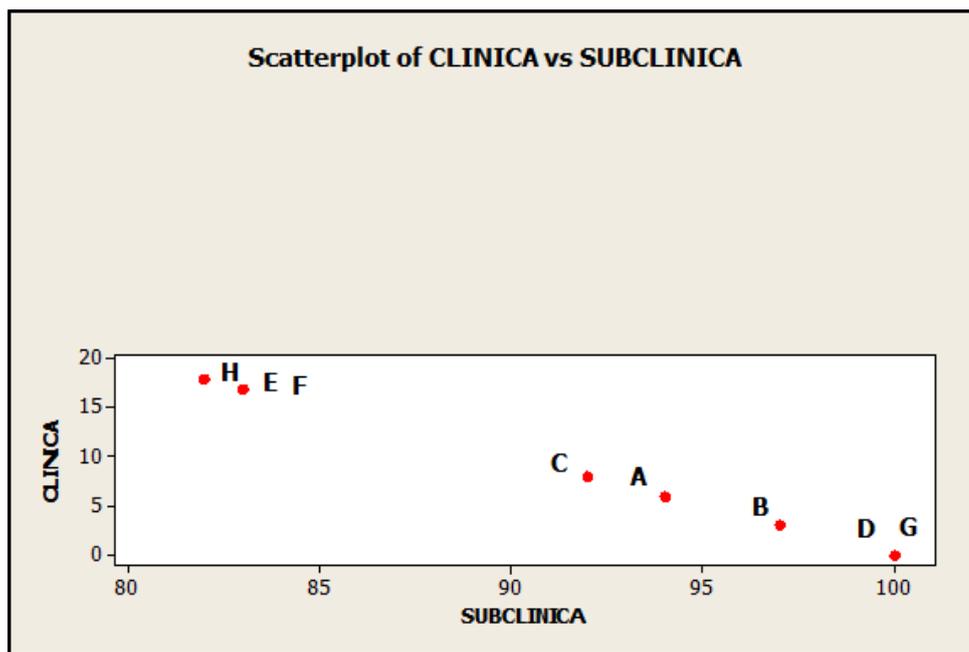


Figura 5. Distribuição da prevalência de mastite clínica e subclínica nas 8 propriedades estudadas.

As análises referentes aos fatores de risco extrínsecos, determinantes para a prevalência da mastite bovina nas propriedades estudadas (Tabela 9), permitiu o grupamento das fazendas em dois grupos. O primeiro compreendendo as propriedades E, F e H, e o segundo englobando as propriedades D e G.

As propriedades E, F e H, com percentuais altos de animais acometidos pela mastite clínica, não apresentaram diferenças significativas nos fatores de risco para a mastite, em que os principais pontos foram os fatores relacionados à deficiência na limpeza e higiene no ambiente da ordenha e à inadequação das práticas de higiene do ordenhador.

No grupo das fazendas com altos índices de mastite clínica (E, F e H) observou-se que os fatores comuns determinantes foram a ausência de limpeza da sala de espera, ausência de higiene da sala de ordenha e o armazenamento inadequado dos utensílios de ordenha, além de todos problemas relacionados à higiene dos ordenhadores. Já no grupo das fazendas com alto índice de mastite subclínica (D e G), os fatores principais foram a ineficiência na limpeza e armazenamento dos utensílios utilizados na ordenha e todas as variáveis associadas às práticas de higiene dos ordenhadores.

Estes dados sugerem que a ausência da limpeza da sala de espera e da sala de ordenha favorece o desenvolvimento dos quadros de mastite clínica. Por outro lado, as inadequações na limpeza e armazenamento dos utensílios e equipamentos utilizados na ordenha, além de todos os parâmetros avaliados para as práticas de higiene dos ordenhadores foram

determinantes nos altos índices de mastite observados nos dois grupos de propriedades, mas não parecem ter influenciado o tipo de quadro sintomático desenvolvido pelos animais.

Tabela 9. Probabilidade de semelhança de fatores de risco para Mastite bovina entre as propriedades estudadas, através do Teste de Mann-Whitney a 5% de probabilidade. Em destaque diferenças significativas.

Fazendas	A	B	C	D	E	F	G
B	0,0019						
C	0,0546	0,1919					
D	0,0689	0,1414	0,4413				
E	0,1094	< 0,0001	0,0050	0,0062			
F	0,4478	0,0033	0,0722	0,0900	0,0914		
G	0,0668	< 0,0001	0,0023	0,0028	0,4077	0,0548	
H	0,0609	< 0,0001	0,0018	0,0023	0,3997	0,0497	0,4935

4.4 Origem das Amostras

A partir das 407 vacas analisadas, foi possível coletar 272 amostras de leite, correspondendo aproximadamente a 20% do total de animais CMT positivos. Nestas propriedades também foram coletadas 107 amostras da linha de ordenha, sendo 19 amostras de mãos dos ordenhadores, 64 das ordenhadeiras mecânicas, 14 de material nasal dos ordenhadores e 10 amostras obtidas a partir dos latões de leite (Tabela 10). Além disso, foram coletadas amostras dos principais pontos de abastecimento da água utilizada na linha de ordenha de cada propriedade (n=8).

Tabela 10. Relação das propriedades, dos municípios, números de amostra com seus respectivos sítios de coleta e número de vacas.

Identificação da propriedade	Cidade	Número de amostras (n ^o de vacas) *	Ordenhadeira mecânica	Mãos	Nasal	Latões de leite
A	Seropédica	101 (26)	16	3	3	0
B	Rio Claro	62 (17)	24	3	3	0
C	Piraí	40 (13)	24	3	0	0
D	Rio Claro	20 (5)	0	2	2	2
E	Paracambi	16 (4)	0	2	2	2
F	Paracambi	15 (4)	0	2	2	2
G	Rio Claro	10 (3)	0	2	2	2
H	Rio Claro	8 (4)	0	2	0	2
Total		272 (76)	64	19	14	10

*20% dos animais positivos para o teste do CMT foram selecionados para o estudo. (O número de amostras de leite pode não corresponder a quatro vezes o número de vacas devido ao fato de alguns animais apresentarem tetos fibrosados).

A partir das amostras de leite e linha de ordenha foram obtidos 411 isolados, sendo 289 oriundos de leite mastítico, 51 das mãos, 31 da ordenhadeira mecânica 29 do material nasal e 11 dos latões de leite.

4.5 Análise Bacteriológica

4.5.1 Análise microbiológica da água.

A tabela 11 apresenta os resultados das análises microbiológicas da água utilizada nos ambientes de ordenha das 8 propriedades avaliadas.

Tabela 11. Resultados das pesquisas por Coliformes totais e fecais em amostras de águas das oito propriedades estudadas.

Propriedades	Coliformes Totais (NMP/100mL)	Coliformes Termotolerantes (NMP/100mL)
A	2	2
B	90	9
C	0	0
D	33	27
E	110	33
F	280	170
G	13	2
H	13	2

As análises realizadas a partir das amostras de água mostraram que das oito propriedades avaliadas, sete apresentaram resultados fora dos padrões de potabilidade estipulados pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2004). Lacerda e colaboradores (2009) em estudos realizados na região de Minas Gerais constataram que 90% da água utilizada nos processos de ordenha estavam fora dos padrões considerados aceitáveis para o consumo humano. Apenas a propriedade C 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 e a cloração apropriada da água de abastecimento da sala de ordenha. No entanto, foi a propriedade que apresentou maior percentual de positividade ao CMT, provavelmente devido a insuficiência observada nos procedimentos higiênico-sanitários conforme tabela 8.

As propriedades E e F apresentaram maiores valores tanto para coliformes totais quanto para termotolerantes, sendo 110NMP/100mL e 33NMP/100mL 280NMP/100mL e 170NMP/100mL, respectivamente. Estas propriedades estavam entre as que apresentaram o maior percentual de mastite clínica. Os coliformes são habitantes naturais da microbiota intestinal dos bovinos, estando presente em suas fezes, e podem ser facilmente disseminados através da água, e são um dos principais patógenos envolvidos nos casos de mastite clínica (RANGEL,2007). Segundo Miguel (2010) a carga bacteriana inicial do leite está diretamente associada à qualidade da água utilizada na limpeza dos equipamentos de ordenha. Muitas propriedades não utilizam água tratada, pois historicamente a incidência de contaminação das águas subterrâneas, principalmente a de poços artesianos, tem sido considerada baixa. No entanto, nos últimos anos, não tem sido descartada a possibilidade de contaminação biológica das águas subterrâneas relacionada às atividades pecuárias, o que aponta a necessidade desse monitoramento (Centro de Vigilância Epidemiológica/CVE/SES-SP). A água utilizada para a lavagem dos materiais e das ordenhadeiras devem ser clorada e para lavagem do ambiente deve ser hiperclorada. Concentração de 3 a 15 ppm por litro de cloro residual e de água são as concentrações que promovem a atividade bactericida do íon cloro (CERQUEIRA et al., 2006). A qualidade da água dos bebedouros dos animais também deve apresentar boa

qualidade microbiológica, uma vez que pode ser veículo para transmissão de doenças no rebanho (LACERDA et al. 2009).

4.5.2 Identificação bacteriana a partir das amostras de leite e linha de ordenha

Após isolamento e identificação bacteriana, foi possível avaliar o crescimento de *Staphylococcus* spp em 85,15% (350/411) e bastonetes Gram negativos em 14,8% (61/411). A tabela 12 apresenta a distribuição dos isolados de acordo com o sítio de coleta.

Tabela 12. Distribuição dos isolados bacterianos por sítio de coleta.

Espécie (nº de isolados)	Leite(nº290)	Mãos(nº46)	Nasal (nº29)	Ordenhadeira (nº 32)	Latão de leite (nº14)
ECN (216)	67,1% (145/216)	13,4% (29/216)	8,3% (18/216)	6,5% (14/216)	4,7% (10/216)
ECP (58)	88,0% (51/58)	1,7% (1/58)	1,7% (1/58)	8,6% (5/58)	0,0%
<i>S.aureus</i> (60)	63,3% (38/60)	10% (6/60)	13,3% (8/60)	6,7% (4/60)	6,7% (4/60)
<i>S.intermedius</i> (12)	100% (12/12)	0%	0%	0%	0%
SIG (4)	100% (4/4)	0%	0%	0%	0%
<i>P. mirabilis</i> (20)	95% (19/20)	5% (1/20)	0%	0%	0%
<i>E.coli</i> (17)	82,3% (14/17)	11,8% (2/17)	5,9% (1/17)	0%	0%
<i>S. rubidaea</i> (8)	25% (2/8)	12,5% (1/8)	0%	62,5% (5/8)	0%
<i>P.vulgaris</i> (7)	0%	42,9% (3/7)	0%	57,1% (4/7)	0%
<i>C. diversus</i> (4)	0%	75% (3/4)	25% (1/4)	0%	0%
<i>S. marcescens</i> (2)	100% (2/2)	0%	0%	0%	0%
<i>C. freundii</i> (2)	100% (2/2)	0%	0%	0%	0%
<i>E. aerogenes</i> (1)	100% (1/1)	0%	0%	0%	0%

A identificação fenogenotípica revelou que 85,2% (350/411) dos isolados oriundos do leite e da linha de ordenha foram de *Staphylococcus* spp. (Figura 5). Destes, 61,7% (216/350) foram classificados como *Staphylococcus* coagulase negativo (ECN), sendo 41,4% (145/350) correspondente ao leite e 20,3% (71/350) à linha de ordenha, respectivamente. Este dado embasou a elaboração de outro projeto destinado à identificação genotípica dos ECN, afim de que se possa mapear as espécies relacionadas e os possíveis clones circulantes em cada região estudada.

Os *Staphylococcus* coagulase positivos (ECP) foram isolados em um total de 38,3% (134/350), sendo 42% (105/250) proveniente do leite e 29% (29/100) da linha de ordenha. A amplificação dos genes 16S rRNA (figura A) e *coa* (figura B) identificou que 44,8% (60/134) eram *S. aureus*, sendo 36,2% (38/105) isolados do leite e 75,9% (22/29) da linha de ordenha. Um total de 36,2% (12/105) foi identificado como *S. intermedius* provenientes apenas do leite e 11,4% (4/105) foram identificados como *Staphylococcus* coagulase positivos do grupo SIG (Figura 5). Os demais 58 isolados caracterizados como estafilococos coagulase-positivos não amplificaram qualquer dos genes de caracterização específica utilizados: *DNAr* de *S.aureus*, *nuc3*, *nuc4* e *pta*. O grupo de trabalho padronizou recentemente uma nova caracterização genotípica baseada em PCR dos genes *coa*, *nuc* e 23SrRNA para *S. aureus*, PCR-RFLP do gene *groEL*, e estão sendo desenvolvidas novas metodologias de identificação para os demais ECPs, considerando as mudanças na classificação deste grupo. Estes isolados serão testados dentro desta nova metodologia com vistas ao fechamento conclusivo de sua identificação.

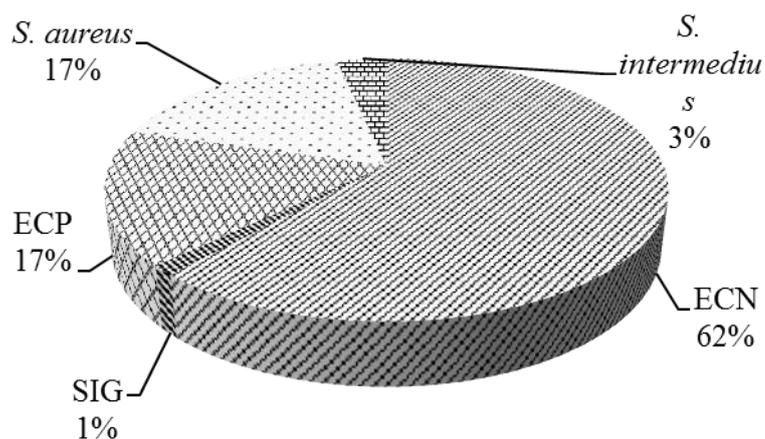


Figura 6. Percentuais das diferentes espécies de *Staphylococcus* spp. isoladas tanto das amostras de leite quanto da linha de ordenha.

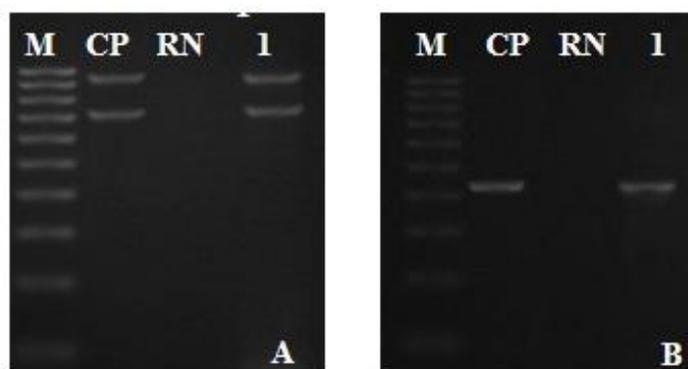


Figura 7. Genes *Staph* (756 pb) e *DNAr* de *S. aureus* (930 pb) (A), *nuc 3* e *4* (431pb) A: M: marcador de peso molecular (100bp), CP: controle positivo, RN: controle negativo e 1: Isolado positivo para os genes *Staph* e *DNAr* de *S. aureus*. B: M: marcador de peso molecular (100bp), CP: controle positivo, RN: controle negativo e 1: Isolado positivo para *nuc 3* e *4*.

O considerável progresso na classificação sistemática dos estafilococos e no desenvolvimento de métodos para a identificação do gênero, espécies e subespécies, tem permitido o reconhecimento da variedade de *Staphylococcus* coagulase-negativos (ECN) presentes em diversos tipos de amostras, bem como sua implicação como agentes etiológicos de uma série de processos infecciosos (CUNHA et al., 2002). No presente trabalho foi detectado um elevado percentual de ECN em diferentes sítios de coleta, sendo 67,1% (145/216) isolados do leite, 13,42% (29/216) das mãos e 8,33% (18/216) de swab nasal, 6,7% (14/216) da ordenhadeira mecânica e 4,7% (10/216) do latão de leite. Estes resultados podem estar associados ao fato deste grupo integrar parte da microbiota normal da pele e da mucosa humana e animal. No entanto, em situações de baixa de imunidade ou lesão tecidual do hospedeiro, esses microrganismos podem se desenvolver como patógenos oportunistas (BANNERMAN, 2003) e ainda são capazes de expressar mecanismos de virulência complexos que podem dificultar sua eliminação (PIORALA, 2009).

A excessiva manipulação de equipamentos e ausência de medidas adequadas de higiene pode explicar o elevado percentual de *Staphylococcus* spp, em especial ECNs, encontrado no presente trabalho. Durante o levantamento epidemiológico realizado no ambiente de ordenha, foram observadas falhas nas etapas de higienização tanto das mãos dos

ordenhadores quanto da ordenhadeira mecânica, além da circulação de pessoas externas à equipe técnica da ordenha. Em alguns, estes indivíduos até mesmo manipulavam equipamentos e utensílios da ordenha sem treinamento adequado. Thorberg e colaboradores, (2006) investigando a similaridade genética entre espécies de ECNs isoladas do leite e da pele dos ordenhadores observou que as estirpes predominantes no leite foram isoladas da pele dos ordenhadores, sugerindo que os seres humanos são provavelmente a principal fonte de contaminação para as vacas.

Segundo Tan e colaboradores, (2009), a mastite causada por ECN ainda é pouco compreendida e de difícil controle sendo a causa persistente de inflamação intramamária, que pode persistir durante os meses de lactação. De acordo com Tapponen e colaboradores (2009), a caracterização da natureza e virulência de diferentes espécies de ECN isolados de ambientes leiteiros, é preponderante na elaboração de estratégias de controle e prevenção da mastite causada por estes patógenos.

Zadoks e colaboradores (2009), através das técnicas de AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) e PFGE (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*), ao analisar estirpes de ECN isolados durante a lactação, bem como antes e depois do período seco, comprovaram que as cepas eram as mesmas durante todas as fases avaliadas. Este resultado levou aos autores a afirmarem que provavelmente houve a persistência da infecção ou uma reinfecção, aumentando a probabilidade de outros animais serem infectados. Estes resultados ressaltam a importância do constante monitoramento dos principais fômites da mastite bovina para a correta eliminação do agente no ambiente da ordenha. A frequência de isolamento dos ECN 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 (GENTILINI et al., 2002; PITKÄLÄ et al., 2004; FREITAS et al., 2005; SOARES et al., 2009).

Staphylococcus spp coagulase-positivos, em especial *S. aureus*, também foram isolados de todos os sítios de coleta. Estes microrganismos são comensais e patogênicos de humanos (ZADOKS et al, 2011). O elevado percentual de *S. aureus* isolados do leite em relação aos demais sítios de coletas, também deve estar relacionado as falhas nos procedimentos de higienização das mãos e dos equipamentos de ordenha. Estes microrganismos são os principais agentes bacterianos causadores da mastite contagiosa, tendo como uma das principais vias de transmissão as teteiras da ordenhadeira mecânica, assim como mãos dos ordenhadores, toalhas ou luvas utilizadas no momento da ordenha (RAJALA-SCHULTZ PJ et al, 2009, DELGADO et al, 2011). Ressalte-se que nas amostras coletadas após a higienização das teteiras da ordenhadeira mecânica, 10% (6/60) dos isolados eram *S. aureus*. Segundo Sachsek e colaboradores (2010), os equipamentos de ordenha tem um importante papel na transmissão destes patógenos entre vacas. No entanto, mesmo com a identificação das principais vias de transmissão dos *S. aureus*, ainda são enfrentadas grandes dificuldades no controle deste patógeno. Uma das razões que tem dificultado o desenvolvimento de protocolos direcionados para o tratamento e controle das infecções, é sua elevada diversidade genética, podendo haver vacas infectadas por diferentes estirpes de *S. aureus* com fatores de virulência e resistência que impossibilitam a eficácia das terapias e medidas profiláticas.

A importância de *Staphylococcus intermedius*, encontrado em 8,9% das amostras, é pouco discutida na etiologia das mastites, sendo esta espécie mais associada a cães. Nossos dados corroboraram com Moroni e colaboradores (2006), que isolaram *Staphylococcus intermedius* em 12,20% das 82 amostras que avaliaram. Recentemente, um grupo de pesquisa conseguiu realizar o sequenciamento de locus da espécie *Staphylococcus intermedius*, podendo assim demonstrar que esta era considerada a responsável por muitas enfermidades em animais de forma equivocada (BANNOEHR et al., 2009).

A análise genotípica revelou as espécies *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus pseudintermedius* e *Staphylococcus delphini*, as quais eram classificadas fenotipicamente como *S. intermedius*, assim surgiu o grupo *S. intermedius* (SIG) (BANNOEHR et al., 2007; DEVRIESE et al., 2008). 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 espécie animais, podendo ser mais importante clinicamente do que se pensava (BANNOEHR et al., 2007; 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 metilina são os principais problemas de saúde veterinária e pública (GUARDABASSI et al., 2004; VAN HOOVELS et al., 2006; BANNOEHR et al., 2007; DESCLOUX et al., 2008; DEVRIESE et al., 2008). Sasaki e colaboradores (2007) reportaram ser possível diferenciar bioquimicamente *S. intermedius* das outras espécies SIG, mas não identificaram marcadores fenotípicos para discriminar *S. pseudintermedius*, de importância clínica, de *S. delphini* (SASAKI et al., 2007), e concluíram que o sequenciamento de DNA é atualmente necessário para identificar *S. pseudintermedius* (BANNOEHR et al., 2007; SASAKI et al., 2007).

Foi realizada uma reação de PCR para detecção do gene *pta* (320 pb), o qual está presente em várias espécies de *Staphylococcus*. Este fragmento foi posteriormente submetido à ação da enzima de restrição *MboI*, produzindo fragmentos de 213 e 107 pb para a *S. pseudintermedius*, que possui apenas um sítio de ação para a enzima de restrição. As espécies *S. intermedius*, *S. delphini* e *S. schleiferi* não tem sítio de ação para *MboI* e portanto, não produziram fragmentos. *Staphylococcus aureus* produziu fragmentos de 156 e 164 pb. Assim, a diferenciação das espécies de *Staphylococcus* foi possível (BANNOEHR et al., 2009). No presente trabalho foi realizada somente a reação de PCR para amplificação do gene *pta* para identificação de *Staphylococcus* spp. do grupo SIG, sem a digestão do fragmento à ação da enzima *MboI*.

4.5.3. Distribuição dos isolados bacterianos e a caracterização da mastite bovina

Considerando a prevalência dos estafilococos e a caracterização da mastite (Anexo I), foi possível determinar que os ECNs foram isolados em 20% de amostras de mastite clínica e em 80% das amostras de mastite subclínicas. De acordo com Amaral e colaboradores (2003), tem sido relatado que espécies de ECN tendem a estar implicadas 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. 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 que fosse em apenas um dos tetos, tendo menor presença em amostras de animais que apresentavam CMT +++.

Já os ECPs foram encontrados em 14% das amostras de leite de mastite clínica e 35% da subclínica, sendo que os *S. aureus* foram isolados em 10% das amostras de leite de mastite clínica e 28% de subclínica. Muitos trabalhos tem documentado a capacidade dos *S. aureus* de internalizar e sobreviver dentro das células do hospedeiro por um longo período (GARZONI, 2009). Estudos realizados por Almeida e colaboradores, (1996) isolou *S. aureus* de amostras de células alveolares do tecido mamário de uma vaca com mastite crônica. Estes estudos suportam a tese de que estes patógenos podem ficar presentes no hospedeiro e diante uma baixa imunidade podem causar infecções crônicas na glândula mamária. De acordo Wolf e colaboradores (2010), os *S. aureus* podem causar mastite clínica com apresentação de sinais variáveis de moderados a graves, tanto locais quanto sistêmicos. Desta forma, o menor percentual de isolado de *S. aureus* observados tanto nos casos de mastite clínica quanto de

mastite subclínica comparado aos demais *Staphylococcus* spp. isolados, não deve ser subestimado devido a patogênese desta espécie apresentar diversificados mecanismos de sobrevivência que as tornam mais virulentas.

Segundo Benic e colaboradores (2012) o perfil dos isolados *S.aureus* de animais mastísticos, apresentam habilidade em produzir diferentes enzimas e toxinas capazes de gerar danos nos tecidos mamários proporcionando maior invasividade, e também são capazes de resistir a camada inibitória de queratina do canal do teto e ainda conseguem evitar a ação da fagocitose na presença da proteína. Estes aspectos entre outros dificultam o seu isolamento e realização de terapias antimicrobianas. De acordo Wilson e colaboradores (1997), Grohn e colaboradores (2004), as perdas econômicas resultantes da infecção por *S. aureus* é estimada em \$160,00 dólares por vaca. As vacas mais novas chegam a perder 8,4 litros de leite em relação a produção de vacas saudáveis, já em vacas mais velhas a produção após a mastite clínica é em torno de 5,5 litros de leite por dia.

4.5.4. Bastonetes Gram-negativos isolados

Dentre as espécies de bastonetes Gram negativos isolados do leite e da linha de ordenha, obteve-se um total de 14,35% (59/411), sendo 9,5% (39/411) correspondentes ao leite e 5,3% (22/411) a linha de ordenha. A identificação fenotípica dos bastonetes Gram negativos, revelou que dentre as espécies isoladas do leite 48,7% (19/39) foram identificadas como *P. mirabilis*, 35,9% (14/39) de *E. coli*, 5% (2/39) de *S.marcescens*, 2,5% (1/39) de *S.rubidaea*, 5% (2/39) de *C. freundii* e 2,5% (1/39) de *Enterobacter aerogenes*. Quanto as espécies de bastonetes Gram negativos isoladas da linha de ordenha, foram identificadas 31,8% (7/22) de *P. vulgaris*, 31,8% (7/22) de *S. rubidaea*, 18,18% (4/22) de *C.diversus*, 13,6% (3/22) de *E.coli* e 4,5% (1/22) de *P. mirabilis* (Figura 8).

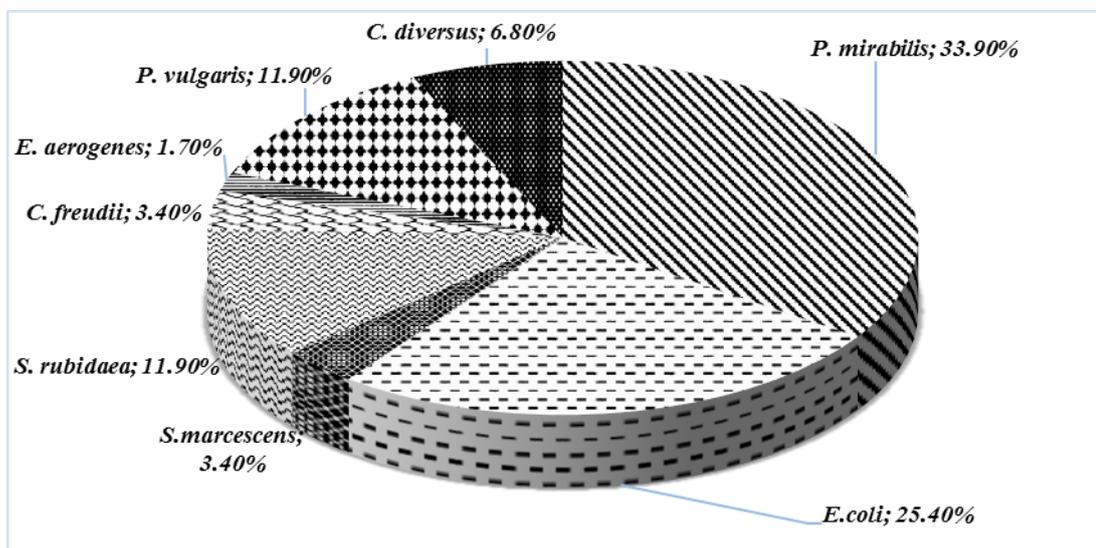


Figura 8. Percentuais das diferentes espécies de bastonetes Gram negativos isoladas tanto das amostras de leite quanto da linha de ordenha.

A variedade encontrada de espécies de bastonetes Gram negativos isolados do leite, pode estar associada ao ambiente propício para o desenvolvimento destes microrganismos, devido à presença de matéria orgânica, que quando associada a outros fatores como umidade e calor, potencializa a proliferação bacteriana (OLIVEIRA, 2012). Os resultados do instrumento diagnóstico identificou que todas as propriedades avaliadas apresentaram falhas nos quesitos relacionados a limpeza e higiene do ambiente, sendo que as propriedades A, B e C

destacaram-se por apresentar muita contaminação fecal, e as maiores taxas de prevalência de enterobactérias no leite mastítico, 30,7% (12/39), 46,1% (18/39) e 20,5% (8/39) respectivamente. Conforme dados previamente expostos na tabela 8 e Figura 4, na propriedade A, os animais não recebiam alimentação após a ordenha e eram soltos novamente no ambiente contaminado. Esta prática pode propiciar a entrada de microrganismos ambientais pelo esfíncter ainda aberto.

As espécies de enterobactérias provenientes de amostras de leite que foram isoladas em maior percentual foram *Proteus mirabilis* e *Escherichia coli*, com percentual de 48,7% (19/39), e de 35,9% (14/39), respectivamente. E as espécies isoladas em maior percentual na linha de ordenha foram *P. vulgaris* e *S. rubidaea*, ambos apresentaram o mesmo percentual 31,8% (7/22). O envolvimento do gênero *Proteus* spp. na etiologia da mastite bovina é subestimado e poucos relatos na literatura apontam para a sua importância. Segundo Hogan & Smith (2003), este gênero, que está presente no ambiente e pode contaminar as mangueiras de água usadas na lavagem dos tetos antes da ordenha.

Por existir, em ambiente de produção bovina, o risco de circulação de cepas patogênicas de *E. coli*, no presente estudo, os isolados desta espécie foram caracterizados por Santiago (2013) e encaminhados para sorotipagem no Laboratório de Enterobactérias da FIOCRUZ, de referência na área, não tendo sido detectada qualquer cepa patogênica. No entanto, cabe ressaltar que a *E. coli* O157H7 é ubiqüitária tanto em bovinos de corte quanto de leite (SILVEIRA, 2010) e que estudo realizado por Johnson e colaboradores (2008) com cepas de EPEC (*E. coli* enteropatogênica) detectou proximidade clonal entre as amostras isoladas de animais e humanos, sugerindo que estes animais podem atuar como reservatórios e fonte de infecção de cepas atípicas de enterobactérias para os humanos ou vice-versa. Desse modo, o monitoramento higiênico-sanitário no ambiente de produção leiteira deve considerar estratégias para detecção dessas cepas patogênicas. Segundo AIRES, (2010), a prevenção da veiculação destes microrganismos no ambiente de ordenha está diretamente relacionado a manutenção das condições de higiene da linha de ordenha e outras instalações utilizadas pelos animais.

A água também pode ser uma importante fonte de dispersão de agentes ambientais. Na propriedade B, cuja prevalência de *P. mirabilis* foi de 50% (9/18), foi observado que os animais entravam muito sujos de lama na linha de ordenha (Figura 3) e recebiam jatos de água antes da ordenha de forma irregular. Os resultados das análises de água coletadas diretamente dos pontos de saída da sala de ordenha nesta propriedade revelou os maiores valores tanto para coliformes totais quanto para termotolerantes (90NMP/100mL e 9NMP/ mL, respectivamente). De modo geral, apenas na propriedade A, a água foi considerada adequada aos padrões. Mallet et al., (2007), ao estudar a qualidade da água utilizada em 25 pequenas propriedades leiteiras de Minas Gerais, observaram que 68% não se encontravam dentro dos padrões estabelecidos pela legislação para coliformes termotolerantes.

4.5.5 Caracterização fenotípica de suscetibilidade dos *Staphylococcus* spp isolados do leite e da linha de ordenha

Os resultados dos percentuais de resistência dos 350 *Staphylococcus* spp. isolados tanto do leite quanto da linha de ordenha, obtidos através do ensaio de difusão em disco simples (Figura 9), estão dispostos na tabela 13 e Figura 10. Para a realização do teste de difusão em disco para os 350 *Staphylococcus* spp. isolados de leite e da linha de ordenha, foram utilizados os discos de tetraciclina (TET), gentamicina (GEN), enrofloxacina (ENO), cefalotina (CFL), ampicilina (AMP), penicilina (PEN) e sulfametoxazol+trimetropim (SUT), os percentuais de resistência avaliados foram expressos na Figura 7.



Figura 9. Método de difusão em disco. A linha demonstra o halo de sensibilidade ao disco em milímetros, os demais isolados são resistentes.

Tabela 13. Percentuais de resistência encontrados para os antimicrobianos testados em isolados de *Staphylococcus* spp. do leite e da linha de ordenha.

Antibióticos	Leite (%)		Linha de ordenha (%)	
	Sensibilidade	Resistência	Sensibilidade	Resistência
Tetraciclina	46	54	38	62
Gentamicina	72,4	27,6	56	44
Enrofloxacina	80	20	62	38
Cefalotina	80	20	42	58
Ampicilina	42	58	15	85
Penicilina	20	80	11	89
Sulfametoxazol+trimetropim	80	20	58	42

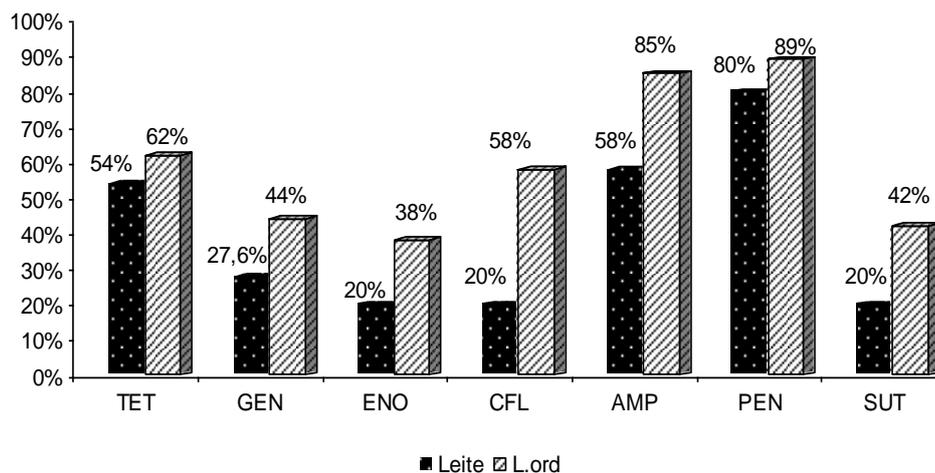


Figura 10. Gráfico dos percentuais de susceptibilidade dos *Staphylococcus* spp. obtidos a partir do leite e da linha de ordenha aos antimicrobianos testados.

A resistência antimicrobiana detectada foi superior em isolados de *Staphylococcus* spp. provenientes da linha de ordenha quando comparados aos isolados provenientes do leite.

Estudos realizados por Spoor e colaboradores (2013), ao rastrear a origem de clones de *Staphylococcus* pandêmicos de isolados humanos e de isolados de ambientes de produção animal, detectou que sete dos 17 isolados bovinos foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados, enquanto que 20 dos 23 isolados de origem humana foram resistentes a pelo menos um agente antimicrobiano, sugerindo que a resistência a meticilina tem origem de cepas humanas e que os isolados dos bovinos só adquirem esta resistência após terem colonizado os humanos, presume-se que isto se deve ao resultado de pressões seletivas impostas pelas prescrições de antibióticos para o tratamento de infecções em humanos ao longo das décadas.

A resistência dos *Staphylococcus* spp. em ambientes de produção leiteira também tem sido associada à capacidade destes patógenos desenvolverem resistência aos desinfetantes a base de compostos quaternário de amônio (QACs). Cloreto de benzalcônio QACs (BC) e brometo de dicetilamônio (CTAB) são componentes ativos em várias preparações utilizadas na desinfecção dos tetos das vacas leiteiras, superfícies da sala de ordenha, equipamentos e utensílios.

A resistência aos compostos de amônio quaternário é mediada por um mecanismo de efluxo que tem sido observada em estafilococos de várias origens e os genes responsáveis pela resistência QAC estafilocócica tem origem plasmidial (RUSSEL, et al, 1997), e codificam proteínas de efluxo gerais capazes de expulsar fármacos hidrófobos incluindo o QAC.

Sidhu e colaboradores (2001), em estudos realizados na Noruega com isolados de estafilococos de origem clínica humana e de leite de vacas mastíticas encontrou os genes *qacA/B* e o gene *blaZ* residindo no mesmo plasmídeo. Estes relatos sugerem que a utilização de QACs para desinfecção em ambientes hospitalares e em ambientes de produção animal podem selecionar estafilococos resistentes a penicilina ou vice versa.

No presente trabalho foi detectado 80% (200/250) de resistência a penicilina em isolados do leite e 89% (89/100) nos isolados da linha de ordenha. A utilização difundida deste antimicrobiano em terapias tanto na medicina veterinária quanto na medicina humana colabora para a disseminação desta resistência no ambiente de produção leiteira. Neves e colaboradores (2010) avaliando a resistência dos isolados provenientes dos tetos das vacas e das mãos dos ordenhadores no estado de São Paulo constatou que em 35 cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas dos tetos das vacas e das mãos dos ordenhadores foram detectados 4% e 100% de resistência a penicilina, respectivamente. Os percentuais de resistência a ampicilina no leite 58% e na linha de ordenha 85%, também foram elevados. Haftu e colaboradores (2012), ao avaliar o perfil de suscetibilidade antimicrobiana dos *Staphylococcus* spp. isolados do leite de animais mastíticos no norte da Etiópia detectou que 88,9% dos 26 isolados de *Staphylococcus* spp. foram resistentes à ampicilina. A alta resistência aos beta-lactâmicos tem sido detectada mundialmente, em especial devido ao uso intenso e inapropriado da penicilina. Coelho (2008), em estudos realizados na mesma região do presente trabalho, detectou um percentual de 64% de resistência à penicilina em 150 isolados de *Staphylococcus* spp isolados de leite mastítico.

Foi detectado um significativo percentual 64% e 54% de resistência à tetraciclina nos isolados de *Staphylococcus* da linha de ordenha e do leite respectivamente. Resultados contrastantes foram demonstrados por Donatele et al. (2002), que ao avaliar o perfil de resistência aos antimicrobianos de 180 amostras de *Staphylococcus aureus* isolados de mastite subclínica em rebanhos do estado do Rio de Janeiro, verificaram 24,4% de resistência à tetraciclina e Santos et al. (2006) que detectaram apenas 6,6% (n=30) de resistência a esse agente no mesmo tipo de amostra. Em estudo realizado no Pará, Oliveira et al. (2011) encontraram 26,1% de resistência à tetraciclina em ECNs e 6,7% para *S. aureus*. Enquanto Brito e colaboradores (2001) no Brasil, detectaram 91% de resistência à tetraciclina em isolados de mastite bovina. Os distintos percentuais observados parecem estar relacionados a pressão seletiva do meio, uma vez que no inquérito epidemiológico realizado no presente

trabalho, a tetraciclina constituiu-se em uma das frequentes opções terapêuticas utilizadas. Existe uma associação da neomicina à tetraciclina, que tem sido amplamente utilizada no tratamento da mastite bovina, com a intenção de potencializar a ação dos mesmos.

Em relação aos aminoglicosídeos, foi detectado que 44% dos isolados da linha de ordenha e 27,6% dos isolados do leite foram resistentes a gentamicina. COSTA et al. (2000) e FREITAS et al. (2005) detectaram 46% e 51% de resistência a este fármaco, respectivamente, em *Staphylococcus* spp. em isolados de mastite bovina. Entretanto, Nader Filho et al. (2000) e Neves et al. (2007) relataram percentuais bem mais baixos, como 5,4% (n=72) e 4% (n=50), respectivamente, de resistência a gentamicina em estafilococos provenientes da glândula mamária de vacas lactantes sadias. De modo semelhante ao que ocorreu para a tetraciclina, no presente estudo, observou-se que este antimicrobiano foi utilizado em 37,5% (3/8) das propriedades leiteiras visitadas.

Foi observado que 38% e 20% dos isolados da linha de ordenha e do leite foram resistentes a enrofloxacin, uma quinolona de uso veterinário, não muito difundida em ambientes de produção leiteira, sendo restrita ao tratamento de mastites clínicas. Langoni e colaboradores (2000) encontraram 28% (n=55) de resistência à enrofloxacin em isolados de *Staphylococcus* spp. provenientes de quadros de mastite. Da mesma forma, Marinho e colaboradores (2002) ao avaliarem *Staphylococcus 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, São Paulo. Já em Minas Gerais, Cardoso e colaboradores (2000) isolaram 127 *S. aureus* provenientes de 23 municípios e detectaram apenas 1,6% de resistência à enrofloxacin. O fato deste medicamento ser de uso restrito ao tratamento animal contribui para a baixa resistência detectada. No entanto, é importante destacar que a resistência detectada nos isolados de origem humana é de grande relevância, pois sugere uma possível transmissão cruzada entre os isolados de diferentes sítios de coleta. É importante considerar que a circulação desses microorganismos representa um perigo potencial para a transmissão aos indivíduos que desempenham atividades em ambientes de produção.

Em relação à associação de sulfametoxazol-trimetoprim foi detectado que 42% e 20% de resistência nos isolados da linha de ordenha e do leite respectivamente. Côrrea e colaboradores (2003) encontrou 24,21% (n=95) de resistência na região de Jaboticabal, no Estado de São Paulo. Cardoso e colaboradores (2000), no Estado de Minas Gerais, encontraram 13,4% de resistência à sulfametoxazol-trimetoprim. Já Machado e colaboradores (2008) reportaram 47,8% (n=57) de resistência ao agente. Em controvérsia, Zafalon e colaboradores (2007) observaram 2,7% de resistência e Oliveira e colaboradores (2011) detectaram 0% de resistência a esse fármaco. Todos avaliaram isolados de *Staphylococcus* spp. de leite mastítico.

A resistência a cefalotina, uma cefalosporina de primeira geração indicada no tratamento da mastite subclínica e de vacas secas, foi detectada em 20% dos isolados do leite e 58% dos isolados da linha de ordenha. Oliveira e colaboradores (2011) encontraram 13% de resistência a cefalotina em *Staphylococcus* spp. isolados de mastite bovina no Estado do Pará. De outro modo, Oliveira e colaboradores (2011), observaram 7% de resistência a esse fármaco em *Staphylococcus* spp. isolados de vacas com mastite subclínica no agreste do Estado de Pernambuco.

Os *Staphylococcus* spp. isolados do leite mastítico e da linha de ordenha foram classificados em 68 e 31 antibiótipos, respectivamente, segundo os seus perfis de resistência aos antimicrobianos mais utilizados nas propriedades leiteiras visitadas (anexos 1,2). A tabela 8 apresenta os antibiótipos prevalentes tanto na linha de ordenha quanto no leite.

Tabela 14. Distribuição dos antibiótipos predominantes entre as diferentes espécies de *Staphylococcus* spp. isolados do leite e da linha de ordenha.

Espécie	Perfil	Antimicrobianos							Leite	L.ord
		TET	GEN	CFL	ENO	AMP	PEN	SUT	(n= 250)	(n=100)
ECN	1	S	S	S	S	S	S	S	9% (-
	2	R	R	R	R	R	R	R	-	21,12%
	3	S	S	S	S	R	R	S	8,3%	-
	4	R	S	S	S	R	R	S	-	9,85%
	7	R	R	R	S	R	R	R	-	7,04%
	9	S	S	R	S	R	R	S	-	11,26%
	42	R	S	S	S	S	R	S	7,6%	-
ECP	10	R	S	S	S	S	S	S	9,8%	-
	14	S	S	R	S	R	R	S	7%	-
	26	R	S	S	S	S	S	R	-	28,57%
	29	R	S	R	R	R	R	S	-	28,57%
<i>S.aureus</i>	1	S	S	S	S	S	S	S	-	28,57%
	3	S	S	S	S	R	R	S	-	19,4%
	5	S	S	S	S	R	S	S	13,1%	-
	10	R	S	S	S	S	S	S	18,4%	-
	12	R	R	R	S	R	R	R	10,5%	-
<i>S.intermedius</i>	2	R	R	R	R	R	R	R	2,25%	-
	14	R	S	S	S	R	R	S	16,6%	-
	15	R	S	R	S	R	R	S	16,6%	-
	2	R	R	R	R	R	R	R	25%	-
SIG	3	S	S	S	S	R	R	S	25%	-
	10	R	S	S	S	S	S	S	25%	-
	37	S	R	R	S	R	S	S	25%	-

A resistência aos antimicrobianos ampicilina e penicilina foi marcante na maioria dos perfis. A utilização indiscriminada destes princípios ativos nas propriedades visitadas foi evidenciada através do inquérito epidemiológico realizado durante as visitas as propriedades, onde foi possível constatar seu uso contínuo e empírico, não apenas para o tratamento da mastite, mas também de outros processos infecciosos.

O antibiótipo prevalente para os 145 isolados de ECN do leite foi o de sensibilidade a todos os antimicrobianos (perfil 1). Enquanto que na linha de ordenha, entre os 71 isolados estudados, observou-se a prevalência do perfil 2, cuja característica é de resistência a todos os antimicrobianos testados.

Entre os isolados de ECN da linha de ordenha que apresentaram resistência a todos os antimicrobianos testados, 53% foram obtidos a partir de material nasal e mãos, o que corrobora com a hipótese de Sppor (2013), de que a resistência observada em isoladas de origem humana tendem a ser maior do que em isolados de bovinos. No entanto, estudos realizados em diferentes países sobre o perfil de resistência dos isolados de ECNs de animais mastíticos a diferentes antimicrobianos detectou uma elevada resistência. Na Noruega, foi detectado um percentual de resistência de 36% (NORM-VET,2005), na Dinamarca de 25% (DANMAP,2001), enquanto que nos Países Baixos foi observado uma resistência de 41,61% (MARAM,2004; MARAM, 2005) e na Finlândia um percentual de resistência de 32% (PITAKALA e colaboradores, 2004). Segundo Taponen e colaboradores (2009), os ECNs

podem apresentar elevada resistência a agentes antimicrobianos desenvolvendo multirresistência.

Para os 51 isolados de ECP não identificados em nível de espécie, destacam-se os antibiótipos de resistência à tetraciclina (perfis 9 e 10), seguido da resistência à cefalotina, ampicilina e penicilina (perfil 14). A resistência também foi elevada nos isolados de ECP da linha de ordenha, cujos perfis predominantes foram os perfis 29 e 26 que caracterizam resistência à tetraciclina, enrofloxacin, cefalexina, ampicilina e penicilina e resistência à tetraciclina, gentamicina e sulfametoxazol+trimetopim, respectivamente. Esta diferença não foi tão evidente em *S.aureus*, onde os 38 isolados provenientes do leite apresentaram resistência à tetraciclina (perfil 10), resistência à penicilina (perfil 5) e os 21 isolados da linha de ordenha os perfis prevalentes observados foram de sensibilidade a todos os antibióticos (perfil 1; 28,57%), seguido de resistência à ampicilina penicilina (perfil 3; 19,04%). Estudos realizados na Noruega relatou que a resistência dos *S.aureus* a penicilina foi de 7% (NORM-VET,2005), contra partida na Dinamarca a resistência observada de 18-30% (DANMAP,2001; DANMAP,2002), enquanto que na Holanda e na Finlândia os percentuais observados foram de 7-12% e de 52%, respectivamente (MARAM,2004; MARAM, 2005); (PITAKALA e colaboradores, 2004). Segundo Petersson e colaboradores (2010) a resistência dos *S.aureus* a penicilina e ampicilina geralmente é menor, quando comparada a outros *Staphylococcus* spp.

A variedade de antibiótipos observada pode ser explicada por diversos fatores, como a própria diversidade genética do gênero *Staphylococcus* spp. pela sua intensa recombinação gênica inter e intra-específicas; pelas diferenças estruturais e de manejo entre as unidades leiteiras visitadas o que acarreta diferentes pressões de seleção por parte do meio ambiente, uma vez que a antibioticoterapia adotada e os princípios ativos mais utilizados variavam entre as oito propriedades avaliadas; e ainda pelas características raciais e genéticas dos rebanhos leiteiros estudados.

O aumento da pressão seletiva tem causado alterações na etiologia e manifestações clínicas das infecções bacterianas, dificultando cada vez mais a elaboração de medidas profiláticas e tratamento das enfermidades. Pode-se observar que alguns perfis identificados nos isolados do leite, também foram detectados nos isolados da linha de ordenha em diferentes espécimes. Estes resultados sugerem que estes patógenos podem ter sido carregados para estes ambientes e destacam a grande capacidade de adaptação dos *Staphylococcus* spp. de se manterem viáveis em ambientes diversificados, apresentando capacidade de resistir a diferentes classes de antimicrobianos, possibilitando a sua ampla disseminação. Estes dados reforçam a importância da aplicação adequada de práticas higiênicas visando o controle destes patógenos.

4.5.6 Pesquisa da produção de betalactamases em bastonetes Gram negativos isolados do leite

Os 39 isolados de Bastonetes Gram – negativos (BGN), oriundos do leite, foram testados para produção da betalactamase. A Tabela 15 apresenta os perfis construídos a partir da resistência aos diferentes betalactâmicos avaliados.

Tabela 15. Distribuição dos perfis de resistência dos bastonetes Gram negativos aos betalactâmicos em diferentes propriedades.

Perfil	Fazenda	Frequência	Resistencia Antimicrobiana
1	C	1	PEN
	B	3	
	A	1	
2	B	1	CPM- CFO-CAZ-CRO-IPM-AMC-AMO-AMP-PEN
	C	2	
3	A	1	AMC-AMO-PEN
	C	1	
4	A	1	CPM-CAZ-AMO-AMP-PEN
5	B	1	CPM-AMC-AMO-AMP-PEN
6	B	1	CPM-CAZ-CRO-AMC-AMO-AMP-PEN
	A	1	
7	B	1	CPM-CRO-AMC-AMO-PEN
8	C	1	CPM-CAZ-CRO-AMC-AMO-AMP-PEN
9	C	1	CFO-CAZ-CRO-AMC-AMO-AMP-PEN
10	A	2	CPM-CFO-CAZ-CRO-AMC-AMO-AMP-PEN
	B	3	
	C	1	
	A	3	
11	B	4	CFO-AMC-AMO-AMP-PEN
	C	1	
	H	1	
12	C	1	CAZ-CRO-IPM-AMC-AMO-AMP-PEN
13	B	1	CFO-CAZ-CRO-AMC-AMO-AMP-PEN
14	A	3	AMC-AMO-AMP-PEN
	B	2	

A resistência à cefalosporinas de segunda geração foi observada em 51,3% (20/39) dos isolados e em 41% (16/39); 38,5% (15/39), para cefalosporinas de terceira geração ceftazidima e ceftraxona, respectivamente. A resistência às cefalosporinas de quarta geração foi de 38,5% (15/39). Estes antimicrobianos são amplamente utilizados no tratamento das mastites, como o ceftiofur e a cefalexina. Durante levantamento epidemiológico realizado nas propriedades visitadas, foi observado uma frequente administração desses antimicrobianos no

tratamento dos animais, ainda nos foi reportado que sua utilização só não era mais constante devido ao seu alto custo.

A resistência à amoxicilina+clavulânico foi de 84,6% (33/39) e a resistência à ampicilina e penicilina foi de 79,5% (31/39) e 100% (39/39), respectivamente. Segundo Gonçalves (2010), a utilização abusiva de antimicrobianos na medicina humana e animal e o seu uso prolongado na pecuária leiteira tem favorecido a emergência e disseminação de enterobactérias resistentes a várias classes de antimicrobianos.

As fazendas C e B apresentaram maior variedade de perfis sendo os perfis prevalentes 2 (22%) e 11 (57%), respectivamente. Estes apresentam em comum a resistência às penicilinas (amoxicilina, ampicilina e penicilina) inclusive à amoxicilina+ác.clavulânico, além da resistência à cefoxitina. A penicilina estava entre os antimicrobianos mais utilizados nas propriedades estudadas. Estes dados justificam a elevada resistência detectada nas bactérias isoladas do leite.

Os isolados que apresentaram resistência à cefotaxima e ceftazidima e sensibilidade ao clavulanato (12,9%-5/39), foram suspeitos de produzirem betalactamases de amplo espectro (ESBL-2be). Porém nenhum isolado foi caracterizado como produtor da enzima através dos testes de Concentração Inibitória Mínima (E-Test), aproximação em disco e teste de extrato tridimensional. Um total de 53% (21/39) apresentou resistência à cefoxitina e foram suspeitos de produzirem betalactamases do tipo AmpC, sendo 66% (14/21) *P.mirabilis*, 14% (3/21) *E.coli*, 9% (2/21) *S. marcescens*, 4% (1/21) *E.aerogenes* e 4% (1/21) *C. freundii*. Muitas espécies incluindo *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae* e *Serratia marcescens*, são produtoras naturais de AmpC (MARTÍNEZ-ROJAS, 2009; BUSH & JACOBY, 2010). O teste de aproximação em disco revelou que 57% (12/21) eram do tipo AmpC não induzível e 38% (8/21) eram do tipo induzível (Figura 11).

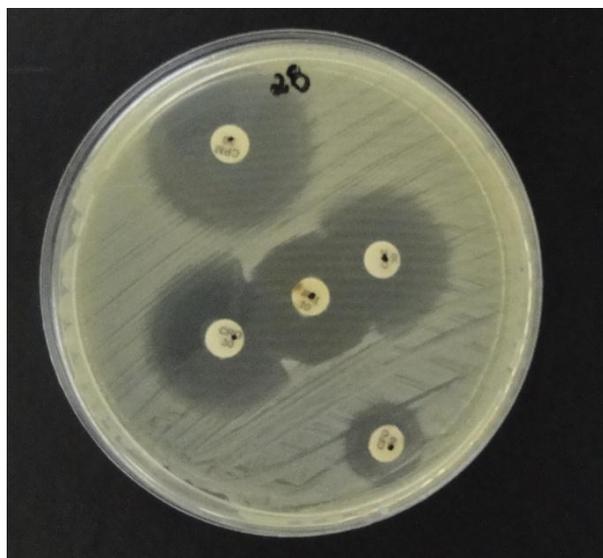


Figura 11- Indução da resistência pela presença do disco de imipenem pela “Zona D” formada (SANTIAGO, 2013).

Apesar de 4 isolados apresentarem resistência ao imipenem, nenhum foi caracterizado como produtor de carbapenemase pelo teste de Hodge Modificado. Após a realização dos testes confirmatórios para os suspeitos de produzirem betalactamases de amplo espectro, não foram detectados isolados produtores de ESBL e carbapenemases. O teste de aproximação em disco revelou que 60% (12/20) das enterobactérias avaliadas produziram enzima do tipo AmpC não induzível e 40% (8/20) do tipo induzível. Uma das características mais

importantes da resistência bacteriana dos bastonetes Gram-negativos é a variedade de mecanismos naturais de resistência que associada à possibilidade de agregarem outros genes de resistência, como o *ampC*, se torna ainda mais preocupante. (CANTÓM et al., 2008; COQUE et al., 2008; FALAGAS et al., 2009).

4.5.7 Perfil fenotípico da resistência dos *Staphylococcus* spp. a oxacilina.

Segundo as normas estabelecidas pelo CLSI (CLSI VET01-A4, 2013; CLSI VET01-S2, 2013), os testes de difusão em disco com cefoxitina foram usados para avaliar resistência à oxacilina mediada pelo gene *mecA*. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi avaliada pelo método de Ágar Screen. A tabela 16 representa a distribuição dos perfis prevalentes da resistência preditiva dos *Staphylococcus* spp. isolados de amostras de leite e da linha de ordenha.

Tabela 16. Distribuição dos perfis dos *Staphylococcus* spp. detectados nos testes de resistência à oxacilina.

Amostra	Perfil/nº isolados	A.S (OXA)	DDS(CFO)	PCR gene <i>mecA</i>
Leite	1(108)	R	R	-
	2(29)	R	S	-
	3(60)	S	R	-
	4(53)	S	S	-
L. ord	1(47)	R	R	-
	2(18)	R	S	-
	3(9)	S	R	-
	4(3)	S	S	-
	5(15)	R	R	+
	6(4)	R	S	+
	7(4)	S	R	+

R - resistente; S - sensível; A.S(OXA)- Ágar “screen” com Oxacilina e DDS(CFO) - difusão em disco simples com cefoxitina.

Nesse estudo foi detectado que 67,2% (168/250) e 56% (56/100) dos *Staphylococcus* spp isolados do leite e da linha de ordenha, respectivamente, apresentaram resistência fenotípica nos ensaios de disco-difusão com cefoxitina, no entanto, estes foram negativos à detecção do gene *mecA*. De outro modo, em um total de 23% de isolados *mecA* positivos (23/100) (Figura 12), 17,4% (4/23) não apresentaram resistência fenotípica à cefoxitina. Estes resultados indicam a possibilidade de haver outros mecanismos envolvidos na expressão da resistência como a hiperprodução de betalactamases e produção de outras PBPs (SAKOULAS et al., 2001). Além destes mecanismos, outras hipóteses tem sido estudadas para tentar elucidar a heteroresistência observada nos isolados de *Staphylococcus* spp. Motta (2014) apontou a importância da identificação correta das espécies para uma precisa detecção de resistência. Melo (2013) observou que mutações pontuais impediam a ligação do iniciador desenhado para isolados de origem humana ao sítio de anelamento do gene *mecA* em bovinos acarretando resultados falso-negativos. O Grupo de Pesquisa do LABAC-VET tem observado a não correlação entre a detecção genotípica e o fenótipo de resistência a oxacilina em isolados de origem animal e se dedicado a aprofundar os possíveis mecanismos subjacentes (MELO 2013; PEREIRA 2010; SOARES 2010; COELHO 2008). Esta ausência de correlação

também tem sido reportada na literatura mundial que aponta para o fato de que podem ocorrer mudanças nos genes do sistema regulatório *mec* desencadeadas por mutações, fagos, plasmídeos e transposons gerando perfis genéticos diferenciados.

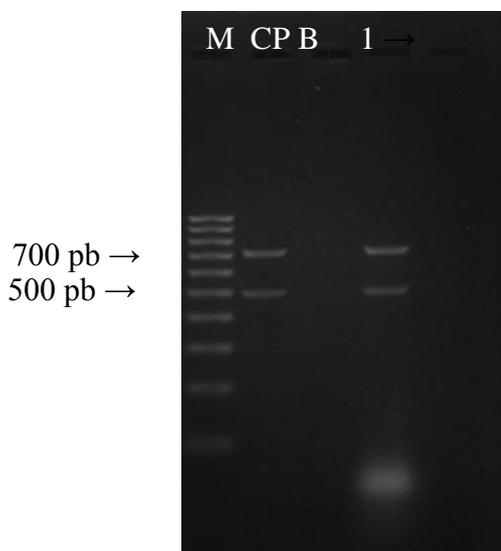


Figura 12. Gel de produto do multiplex-PCR para os genes *DNAr Staphy* (756 pb) e *mecA* (513 pb). M: marcador de peso molecular (100bp), CP: controle positivo B: branco e 1: isolado positivo.

Atualmente, tem sido investigado homólogo do gene *mecA*, denominado *mecA*_{LGA251} (CUNY et al., 2011), descrito em casos de mastite bovina e mais recentemente em seres humanos ambos no Reino Unido (SHORE et al., 2011; GARCIA et al., 2011). Isolados oriundos de seres humanos com fenótipo de MRSA, negativos para *mecA* e positivos para *mecA*_{LGA251} foram encontrados na Inglaterra e na Dinamarca. Este homólogo do gene *mecA* não é detectado por PCR com *primers* descritos na literatura (MURAKAMI et al., 1991) para detecção de *mecA* (CUNY et al., 2011). Outros estudos tem relatado a ocorrência de cepas denominadas LA-MRSA (livestock-associated MRSA) que estão presentes em ambientes de produção animal, acometendo tanto humanos quanto animais. Estas cepas albergam genes de virulência e resistência que sofreram modificações genéticas devido a seleção do próprio ambiente de produção. Segundo HURBER e colaboradores, (2010), LA-MRSA isolados de diferentes origens, geralmente são resistentes aos marcadores, oxacilina e cefoxitina e demais beta-lactâmicos (MOODLEY et al., 2011). Estes relatos apontam que a pecuária é um potencial reservatório de bactérias patogênicas capazes de cruzar as barreiras entre espécies.

De acordo com Leonard e colaboradores (2008), a transferência de cepas de MRSA pode ocorrer entre animais e humanos bidirecionalmente. Estudos filogenéticos recentes revelaram que algumas linhagens de *S. aureus* isoladas de animais derivam de linhagens humanas e que nesta mudança de hospedeiros, esses microrganismos sofrem adaptações genéticas, perdendo fatores de virulência desnecessários no novo hospedeiro além de adquirir características necessárias a colonização desse novo ambiente (PANTOSTI et al., 2012).

Wyllie e colaboradores, (2011), ressaltam que as práticas de higiene nestes ambientes têm um importante papel na prevenção da transmissão destas cepas, pois as melhorias na biossegurança e na higiene são medidas de controle capazes de impedir a propagação e transmissão de bactérias entre o bovino e o hospedeiro. Desta forma a vigilância regular da microbiota em animais e seres humanos pode facilitar a identificação precoce de clones emergentes capazes de transmitir doenças em humanos.

4.6 Produção de *Slime*

Foi detectada produção de *slime* em 84,8% (212/250) e 95% (95/100) dos *Staphylococcus* spp. isolados de amostras de leite e da linha de ordenha respectivamente, avaliados pela técnica de microplaca. No entanto, a detecção dos genes *icaA* e *icaD* foi significativamente inferior, sendo possível detectá-lo em 15,2% (38/250) e 21,6% (54/250) em isolados do leite, e 11% (11/100) e 20% (20/100) em isolados da linha de ordenha respectivamente (Figura 13).

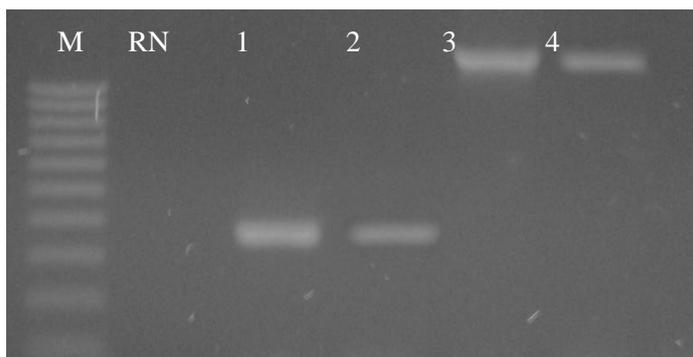


Figura 13. Genes *icaA* (1315pb) e *icaD* (381pb) em *Staphylococcus* spp. isolados de mastite bovina, em gel de agarose a 1,5%. M: marcador de peso molecular (100pb), RN: reação negativa; 1: controle positivo para *icaD*, 2: isolado positivo para *icaD*, 3: controle positivo para *icaA*, 4: isolado positivo para *icaA*.

Após a análises dos dados de produção fenotípica do *slime* em microplaca e da detecção dos genotípica dos mesmos, foram obtidos os perfis relacionados na Tabela 17. Entre estes, destacaram-se três perfis prevalentes de *Staphylococcus* spp. do leite e dois perfis da linha de ordenha. A baixa correlação entre os resultados fenotípicos e a detecção gênica já vem sendo discutida na literatura, e entre as explicações possíveis estão a dificuldade de reproduzir as condições *in vivo* para produção de *slime*, o que pode influenciar na expressão fenotípica dos isolados positivos, bem como, a ausência de ambos os genes em cepas produtoras aponta para outros mecanismos implicados na produção do *slime*, inclusive com possibilidade de regulação através de várias vias (SIMOJOKI et al., 2012).

Ao analisar isoladamente a expressão fenotípica do *slime* é possível inferir que independente da compreensão de sua regulação gênica, a produção deste fator de virulência é importante para a viabilidade dos *Staphylococcus* spp. em ambiente de produção leiteira (tabela 18). Quase a totalidade das bactérias avaliadas expressou esse fator de virulência, e se considerarmos a dificuldade já apontada em reproduzir as condições *in vitro* para tal expressão, torna-se perceptível que tal análise tem caráter preditivo e, portanto não é acurada o suficiente para confirmar o potencial produtor de cada cepa. Cepas com fraca ou moderada produção *in vitro* podem ser potencialmente capazes de intensificar esta produção no ambiente da glândula mamária.

Tabela 17. Perfis fenogenotípicos relacionado a produção de *slime* nos *Staphylococcus* spp. oriundos de amostras de leite e da linha de ordenha.

Origem	Perfil (%)	Slime	icaA	icaD
Leite	1 (44%)	(Fraco)	(-)	(-)
	2 (3,2%)	(Fraco)	(+)	(-)
	3 (7,2%)	(Fraco)	(+)	(+)
	4 (1,2%)	(Fraco)	(-)	(+)
	5 (0,8%)	(Mod)	(+)	(-)
	6 (14,8%)	(Mod)	(-)	(-)
	7 (1,2%)	(Mod)	(+)	(+)
	8 (2%)	(Mod)	(-)	(+)
	9 (3,2%)	(Forte)	(+)	(+)
	10 (2,8%)	(Forte)	(-)	(+)
	11 (15,2%)	(Forte)	(-)	(-)
L.ord	1 (28%)	(Fraco)	(-)	(+)
	2 (1%)	(Fraco)	(+)	(-)
	3 (3%)	(Fraco)	(+)	(+)
	4 (3%)	(Fraco)	(-)	(+)
	5 (34%)	(Mod)	(-)	(-)
	6 (3%)	(Mod)	(-)	(+)
	7 (1%)	(Mod)	(+)	(-)
	8 (1%)	(Mod)	(+)	(+)
	9 (5%)	(Forte)	(+)	(+)
	10 (16%)	(Forte)	(-)	(-)
	11 (5%)	(Forte)	(-)	(-)

* L.ord: linha de ordenha; Mod: moderado

Tabela 18. Distribuição da produção de *slime* em microplaca dos *Staphylococcus* spp. isolados do leite e da linha de ordenha.

Origem	Produção de Slime		
	Fraco	Moderado	Forte
Leite (n=250)	60% (n=150)	18,8% (n=47)	21,2% (n=53)
Ordenhadeira (n=26)	50% (n=13)	38,4% (n=10)	11,6% (n=3)
Latão de leite (n=11)	5% (n=5)	4% (n=4)	2% (n=2)
Cavidade nasal (n=27)	9% (n=9)	9% (n=9)	9% (n=9)
Mãos (n=36)	8% (n=8)	16% (n=16)	12% (n=12)

A maior parte dos isolados do leite (60%) foram fracos produtores de *slime*. Enquanto nos isolados provenientes da linha de ordenha foi observado que 39% (39/100) foi moderado produtor e 35% (35/100) fraco, sendo observados principalmente nos isolados da ordenhadeira mecânica, da cavidade nasal e das mãos dos ordenhadores. Fox e colaboradores (2005), acreditam que as estirpes de *Staphylococcus* spp. causadoras de infecções mamárias tenham maior capacidade de produzir biofilme que aquelas isoladas de outros locais devido a

grande capacidade de produzir exopolissacarídeos como fator de virulência em infecções intramamárias. Ainda pode-se observar que a presença do gene *icaD* foi mais expressiva do que a do gene *icaA* tanto nos isolados do leite quanto nos da linha de ordenha. Ciftci e colaboradores (2009), avaliaram 59 isolados de *Staphylococcus* spp. oriundos de leite mastítico encontraram 27,11% (16/59) isolados positivos para o gene *icaA* e 64,40% (38/59) para o gene *icaD*. Enquanto Santos e colaboradores (2009) ao avaliar a ocorrência dos genes *icaA* e *icaD* dos *Staphylococcus* spp. isolados de ordenhadeiras mecânica verificaram que 36,6% dos 41 isolados mostraram-se portadores do gene *icaA* e 100% do gene *icaD*. A lavagem e a higienização das mãos dos ordenhadores são medidas profiláticas na transmissão destes patógenos para os animais e para os equipamentos de ordenha (OTE e colaboradores 2011). Da mesma forma a limpeza e higienização insuficientes das teteiras da ordenhadeira mecânica fornecem substratos para as bactérias, favorecendo a formação de biofilme, podendo impedir a ação dos sanificantes e servir de fonte de contaminação para os animais e para o leite.

4.7 Tipagem Molecular Através da Técnica de Eletroforese em Campo Pulsado em *Staphylococcus* spp Provenientes da Linha de Ordenha e Leite Mastítico.

Um total de 36 isolados, 19 *S. aureus* de leite mastítico e 17 *Staphylococcus* spp. da linha de ordenha foram tipificados através da técnica de PFGE. Os *S.aureus* do leite geraram 9 perfis representativos, enquanto os *Staphylococcus* spp. da linha de ordenha geraram 3 perfis.

Em relação à linha de ordenha, foram obtidos 3 grupamentos e 7 subgrupamentos (Figura 14). Foi observado que vários isolados apresentaram alto grau de similaridade (Tabela 19).

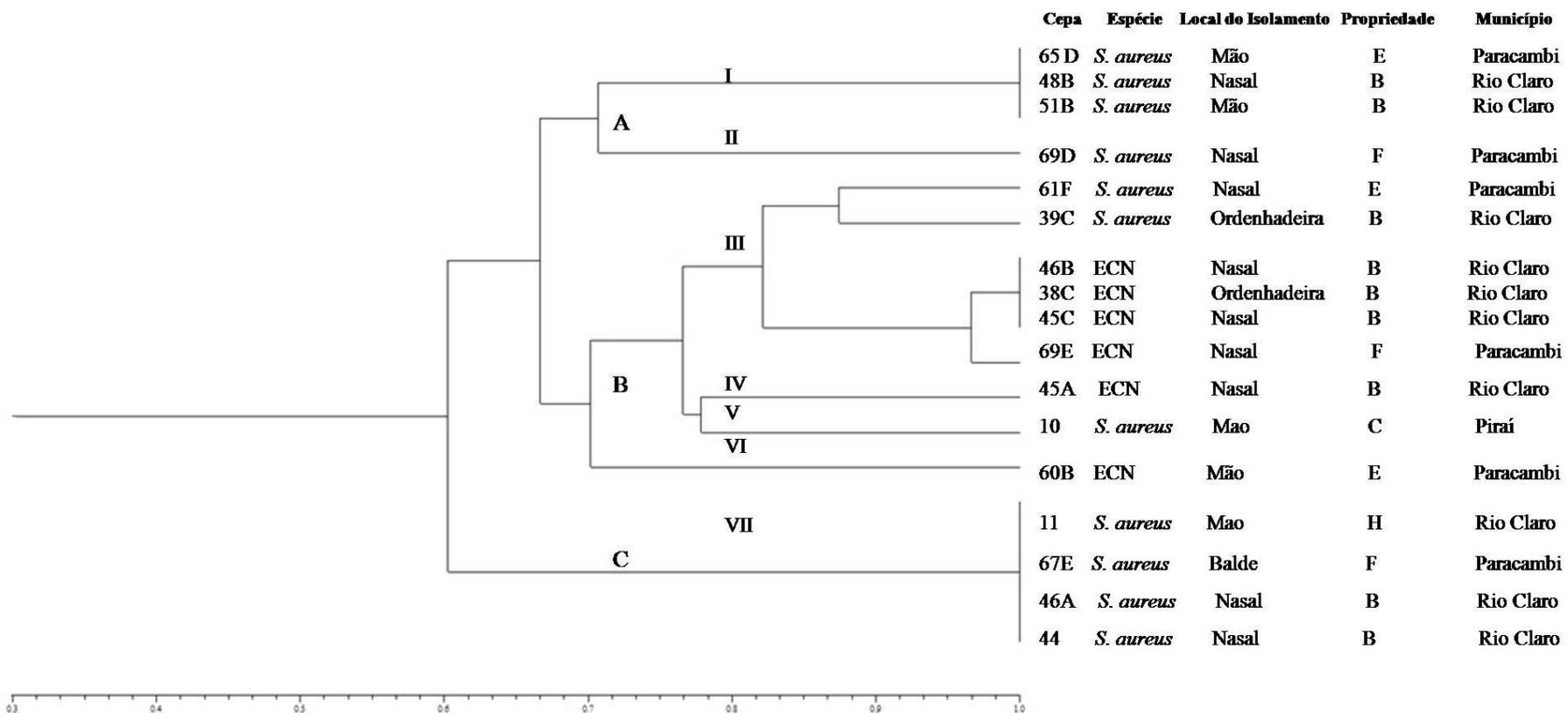


Figura 14. Dendrograma de similaridade dos perfis representativos da linha de ordenha, gerado a partir dos dados obtidos da tipagem de *Staphylococcus* spp. utilizando a técnica PFGE através do método de grupamento UPGMA, Programa GENES – UFV.

Tabela 19. Origens e grupamentos dos isolados de *Staphylococcus* spp. da linha de ordenha pela técnica de PFGE.

Isolado	Espécie	Origem dos isolados	Fazenda/Município	Agrupamento (subgrupo)	Antibiograma					
					TET	GEN	ENO	CFL	AMP	PEN
65D	<i>S.aureus</i>	Mão	E/Paracambi	A (I)	R	S	R	R	R	R
48B	<i>S.aureus</i>	Nasal	B/Rio Claro	A (I)	R	R	R	R	R	R
51B	<i>S.aureus</i>	Mão	B/Rio Claro	A (I)	R	R	S	R	R	R
69D	<i>S.aureus</i>	Nasal	F/Paracambi	A (II)	R	R	S	S	R	R
61F	<i>S.aureus</i>	Nasal	E/Paracambi	B (III)	R	R	R	R	R	R
39C	<i>S.aureus</i>	Ordanhadeira	B/Rio Claro	B (III)	R	S	S	S	S	R
46B	ECN	Nasal	B/Rio Claro	B (III)	R	R	S	R	R	R
38C	ECN	Ordanhadeira	B/Rio Claro	B (III)	R	S	S	R	R	R
45C	ECN	Nasal	B/Rio Claro	B (III)	S	R	S	S	S	R
69E	ECN	Nasal	F/Paracambi	B (III)	S	S	S	R	R	R
45 ^a	ECN	Nasal	B/Rio Claro	B (IV)	R	R	S	S	S	R
10	<i>S.aureus</i>	Mão	C/Piraí	B (V)	S	S	R	R	R	R
60B	ECN	Mão	E/Paracambi	B (VI)	R	R	R	R	R	R
11	<i>S.aureus</i>	Mão	H/Rio Claro	C (VII)	S	S	S	R	R	R
67E	<i>S.aureus</i>	Latão de leite	F/Paracambi	C (VII)	R	R	R	S	R	R
46 ^a	<i>S.aureus</i>	Nasal	B/Rio Claro	C (VII)	R	S	S	R	R	R
44	<i>S.aureus</i>	Nasal	B/Rio Claro	C (VII)	R	R	R	R	R	R

No grupamento A sub-grupamento I, observou-se a presença de cepas clonais oriundas do isolamento de *swab* nasais e mãos dos ordenhadores das propriedades E e B, dos municípios de Paracambi e Rio Claro, respectivamente. A distância entre os municípios onde estão localizadas estas propriedades é de 72,9 Km.

No grupamento B subgrupamento III, observou-se cepas clonais de *Staphylococcus* coagulase negativo dentro da mesma propriedade. Estes clones foram isolados da cavidade nasal e da ordanhadeira mecânica. Ainda no grupamento B, os subgrupamentos IV e V apresentaram 75% de similaridade, sendo formados por isolados de *S. aureus* oriundos das propriedades B, do município de Rio Claro e C, do município de Piraí, municípios vizinhos, com significativa circulação de pessoas comuns, incluindo o compartilhamento da assistência veterinária. No grupamento C subgrupamento VII, notou-se a presença de cepas clonais em três propriedades (H, B e F). As propriedades H e B estão localizados no mesmo município, Rio Claro, e são frequentadas pelos mesmos ordenhadores e pelo mesmo médico veterinário.

Já a presença dessa cepa clonal na propriedade F, localizada no município de Paracambi, sugere que a dispersão pode ter ocorrido devido a recorrente compra e venda de animais entre as propriedades dos municípios vizinhos.

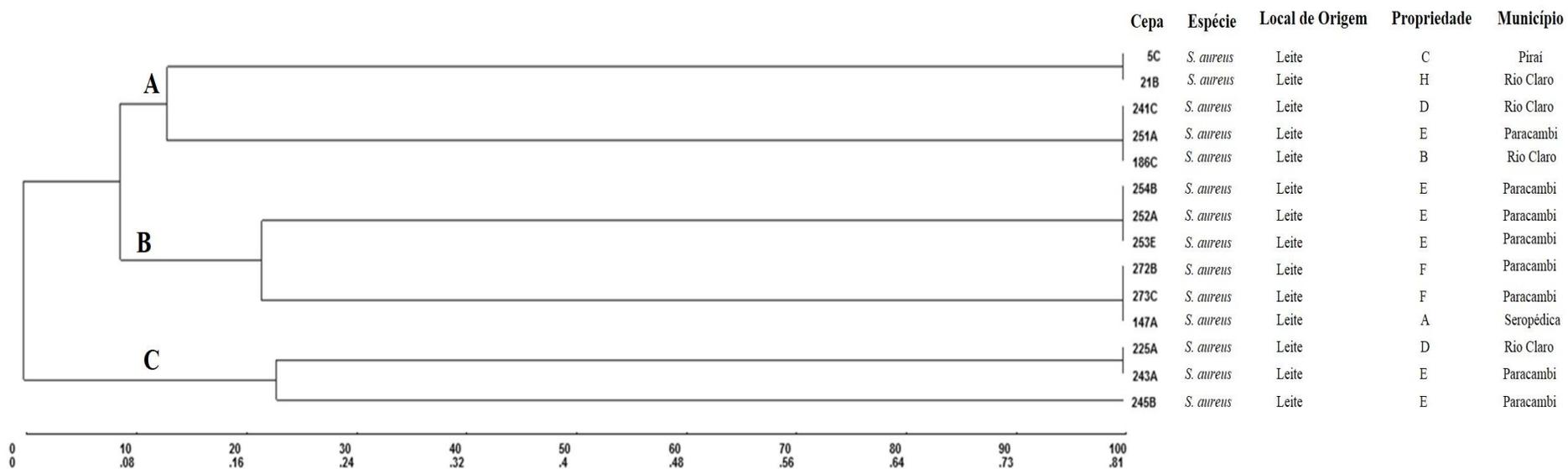


Figura 15. Dendrograma de similaridade dos perfis representativos do leite e da linha de ordenha, gerado a partir dos dados obtidos da tipagem de *Staphylococcus* spp. utilizando a técnica PFGE através do método de agrupamento UPGMA, Programa GENES – UFV.

Em relação ao leite (Figura 15) e tabela 20, observamos uma grande diversidade genética entre os grupamentos, o que corrobora com estudos realizados por Rabelo e colaboradores (2007, 2009 e 2013) na mesma região, onde foi observada elevada diversidade genética entre os isolados de *Staphylococcus* spp. e a ausência de um perfil predominante causador da mastite bovina. No grupamento A foi possível observar a presença de duas cepas clonais bastante distintas (13% de similaridade). Uma das cepas clonais estava presente nas propriedades C (5C) localizada no município de Piraí e na H (21B) em Rio Claro. A outra cepa clonal pertencente também ao grupamento A, foi encontrada nas propriedades B (186C) e D (241C) em Rio Claro e na propriedade E (251A) no município de Paracambi. A grande distância observada entre as cepas clonais do grupamento A, também pode ser observada no grupamento B (23% de similaridade). Uma das cepas clonais estava presente na mesma propriedade, a propriedade E (252A, 253E, 254B) localizada em Paracambi. A segunda cepa clonal do grupamento B estava localizada em propriedades de municípios diferentes, na propriedade F (272B e 273C) do município de Paracambi e na propriedade A (147A) do município de Seropédica.

O grupamento C também apresentou as mesmas características dos outros grupamentos (24% de similaridade entre as cepas), porém foi observado a presença de uma única cepa clonal encontrada nas propriedades D (225A) localizada em Rio Claro e na propriedade E (243A) Paracambi. Esta cepa clonal apresentou pouca semelhança com a cepa encontrada na propriedade E (245B) do município de Paracambi pertencente ao mesmo grupamento. É importante destacar que as propriedades avaliadas são consideradas propriedades abertas, ou seja, onde há intenso intercâmbio de animais, inclusive matrizes. Desse modo, estão mais vulneráveis à introdução de animais albergando cepas patogênicas.

Durante a última década, vários estudos moleculares têm descrito a estrutura e a diversidade da população de *S. aureus* causadores de mastite bovina (HASMAN et al., 2010; IKAWATY et al. 2009; SMYTH et al., 2009; JØRGENSEN et al., 2005). OLSON e colaboradores (2007), revelaram através do sequenciamento e análise do genoma de *S. aureus* oriundos de mastite bovina, e de humanos, que os clones bovinos divergiram de um ancestral comum parecido com o *S. aureus* de humanos e através da aquisição e/ou deleção de genes entre os *S. aureus* destas diferentes origens, otimizaram a patogênese da mastite no gado.

A análise comparativa entre os dendrogramas da linha de ordenha e do leite evidenciou diferenças entre os isolados. Os isolados do leite apresentaram grande distância genética entre si. Enquanto que os isolados da linha de ordenha eram mais próximos geneticamente. Estudos realizados para a identificação da origem filogenética das linhagens de *S. aureus* de bovinos demonstraram que as estirpes isoladas em vários países a partir do leite mastítico foram tipificadas usando técnicas de tipagem molecular como o MLEE (Musser et al., 1990), PFGE (ZADOKS et al., 2000), MLST (MONECKE et al., 2007; SUNG et al., 2008), *spa* e *agr* (HASMAN et al., 2010, SMYTH et al., 2009). Estes estudos sugerem que a origem clonal dos isolados humanos e bovinos não é a mesma. Além disso, o sequenciamento do genoma de um isolado ST151 de origem bovina, revelou um conjunto de características genéticas moleculares únicas para *S. aureus* associado a bovinos, muitos dos quais estão implicados na patogênese da mastite bovina (HERRON - OLSON et al., 2007).

Segundo Hata e colaboradores (2010), a análise da variação genética entre *S. aureus* isolados a partir do leite de bovino subsidia a investigação da relação entre bactérias isoladas em uma mesma ou em diferentes fazendas leiteiras, o que pode contribuir para a identificação das fontes de contágio e para o estabelecimento de medidas de prevenção.

Esta capacidade de adaptação está relacionada às diferentes taxas de mutações devido à pressão seletiva encontrada em diferentes hospedeiros (UHLEMANN.,et al., 2012, LERAT., & OCHMAN.,2005). Melo (2013) observou que estas mutações podem ocorrer de modo pontual em regiões de anelamento do gene *mecA* em bovinos, impossibilitando a detecção

deste quando utiliza-se iniciadores baseados na sequência gênica de isolados oriundos de humanos. Esta observação conduz a reflexão da importância de compreender a diversidade bacteriana em diferentes ambientes, em especial, quando trata-se de produção animal, de modo a não estabelecer falsos paradigmas para o estudo desses microrganismos. Ainda considerando a análise da resistência a meticilina, cabe destacar a descrição de um MRSA colonizador frequente de populações animais, possivelmente favorecido pela ampla utilização de antibióticos, denominado “livestock-associated MRSA” (LA-MRSA). Este tipo de MRSA surgiu primeiramente em porcos (KHANNA et al., 2008), mas também têm sido descrito em outras espécies animais, incluindo bovinos (CUNY et al., 2008; HASMAN et al., 2010; HUBER et al., 2010; LOEFFLER & LLOYD, 2010). LA-MRSA são resistentes a clivagem por *SmaI*, a enzima de restrição mais frequentemente utilizada para tipagem de *S. aureus* por PFGE (CHUNG et al., 2000), pela presença de uma metilação nos sítios de atuação da enzima de restrição (BENS et al., 2006). Quatro isolados avaliados no presente estudo não puderam ser clivados pela *SmaI*, e serão submetidos á análises posteriores.

Tabela 20: Origens e grupamentos dos perfis de *Staphylococcus aureus* da linha do leite mastítico pela técnica de PFGE.

Isolado	Espécie	Origem dos isolados	Fazenda/Município	Agrupamento (subgrupo)	Antibiograma					
					TET	GEN	ENO	CFL	AMP	PEN
5C	<i>S.aureus</i>	Leite	C/ Pirai	A (I)	S	S	S	R	R	S
21B	<i>S.aureus</i>	Leite	H/ Rio Claro	A (I)	S	S	S	S	R	R
241C	<i>S.aureus</i>	Leite	D/ Rio Claro	A (II)	S	S	S	R	R	R
251A	<i>S.aureus</i>	Leite	E/ Paracambi	A (II)	R	R	R	R	R	R
186C	<i>S.aureus</i>	Leite	B/ Rio Claro	A (II)	S	S	S	S	S	R
254B	<i>S.aureus</i>	Leite	E/ Paracambi	B (III)	R	R	R	R	R	R
252A	<i>S.aureus</i>	Leite	E/ Paracambi	B (III)	R	R	S	R	R	R
253E	<i>S.aureus</i>	Leite	E/ Paracambi	B (III)	R	R	S	R	R	R
272B	<i>S.aureus</i>	Leite	F/ Paracambi	B (IV)	R	S	S	S	S	S
273C	<i>S.aureus</i>	Leite	F/ Paracambi	B (IV)	R	S	S	S	S	S
147A	<i>S.aureus</i>	Leite	A/ Seropédica	B (IV)	S	R	S	S	S	S
225A	<i>S.aureus</i>	Leite	D/ Rio Claro	C (V)	S	S	S	R	R	R
243A	<i>S.aureus</i>	Leite	E/ Paracambi	C (V)	R	R	R	R	R	R
245B	<i>S.aureus</i>	Leite	E/ Paracambi	C (VI)	R	R	R	R	R	R

4.8 Percepção das Ações Extensionistas Realizadas

Por entender que o papel da universidade é desenvolver estratégias capazes de transcender as barreiras da comunicação existente entre a comunidade científica e a sociedade, o presente estudo buscou, de forma dinâmica e norteadora, transformar os resultados científicos em ações, junto aos proprietários e trabalhadores das propriedades, de modo a buscar atenuar parâmetros que extrapolam as questões econômicas e sociais.

Sendo assim, após a realização do isolamento, identificação e antibiograma dos isolados obtidos a partir das amostras de leite, houve retorno a cada propriedade para entrega dos laudos para os responsáveis técnicos ou para o proprietário das fazendas. Neste momento, foram estabelecidas orientações sobre a utilização dos antimicrobianos e sugestões que, pautadas nas observações da dinâmica da ordenha, poderiam ser corrigidas visando controlar e prevenir os quadros infecciosos de mastite e melhorar a qualidade do leite.

Em outro momento houve o contato com a EMATER-RJ (Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural), para através da percepção das principais dificuldades descritas pelos técnicos atuantes na região estudada, somar esforços para o desenvolvimento de algumas atividades que pudessem minimizar os impactos negativos.

Logo após este contato, foi estabelecido um dia de campo com vários proprietários da região, além de ordenhadores, no qual foram realizadas atividades abordando critérios teóricos e práticos sobre os principais aspectos críticos no controle da mastite bovina detectados durante o estudo. Um dos principais entraves identificado foi a incompatibilidade entre os parâmetros estipulados pela legislação vigente que devem ser adotados como regras pelos produtores e a realidade da produção leiteira da região. Frente a isto, cada um dos presentes foi contemplado com um mini manual de bolso desenvolvido em nosso grupo de trabalho - com orientações sobre práticas adequadas de manejo de ordenha - ajustado a uma linguagem capaz de despertar interesse e compreensão dos todos os envolvidos e que pudesse ser consultado em qualquer momento. Também foram realizadas palestras sobre manejo de pastagem, controle e profilaxia da mastite.

Após a realização de todas essas etapas, foram evidenciadas as dificuldades no que diz respeito à infra-estrutura e mão de obra atuante, bem como, a ausência de políticas públicas que possam viabilizar a implementação das práticas adequadas da produção de leite segundo os parâmetros preconizados pelos órgãos competentes. Observa-se ainda o alto custo investido na produção do leite, em contraste com o baixo valor pago ao produtor, o que gera desestímulo em investir até mesmo em capacitação, o que aponta para a necessidade de um constante acompanhamento destas propriedades a fim de estimular as mudanças necessárias. Em adição, foi detectado que existe uma certa resistência por parte dos ordenhadores, médicos veterinários e proprietários, geralmente desacreditados das possíveis melhorias resultantes das ações de treinamento e adoção de boas práticas. Por consequência, as medidas podem até ser tomadas por algum tempo, mas depois acabam por retornar as práticas antigas, o que parece estar relacionado à alta rotatividade dos ordenhadores. Reafirmando, a importância do acompanhamento e treinamento constantes.

Os programas de incentivo para produção leiteira, mesmo tendo o intuito de aprimorar a produção, apresentam fragilidades, pois são sujeitos às mudanças estruturais de governo, e devem ser elaborados considerando a realidade de produção e buscando sanar, prioritariamente, as necessidades básicas como assistência técnica, monitoramento, treinamento, padronização da estrutura de produção, capacitação de pessoas para utilização de materiais tecnificados, noções de boas práticas de higiene em sistemas de produção de alimentos de origem animal.

5 CONCLUSÕES

- O controle eficiente da mastite bovina só poderá ser alcançado com a associação entre a adoção de boas práticas de manejo e a monitoramento de patógenos circulantes no ambiente de produção;
- Todas as propriedades avaliadas apresentaram fragilidades significativas na manutenção da limpeza e higiene do ambiente de ordenha.
- Nenhum dos ordenhadores realizava a troca de luvas ao manusear diferentes animais ou outras superfícies, contribuindo para a dispersão dos agentes contagiosos no ambiente de ordenha.
- A maioria das propriedades avaliadas, apresentaram resultados fora dos padrões de potabilidade estipulados pelo Ministério da Saúde.
- A resistência antimicrobiana detectada foi superior em isolados de *Staphylococcus* spp. provenientes da linha de ordenha quando comparados aos isolados provenientes do leite.
- Apesar de haver isolados de bastonetes Gram negativos resistentes ao imipenem, nenhum foi caracterizado como produtor de carbapenemase pelo teste de Hodge Modificado.
- Não foram detectados isolados de bastonetes Gram negativos produtores de ESBL e carbapenemases
- A baixa correlação entre os resultados fenotípicos e a detecção gênica observada na produção de *slime* pode estar relacionada a dificuldade de reproduzir as condições *in vivo* para expressão gênica nos isolados *icaA* e *icaD* positivos. Por outro lado, a ausência de ambos os genes em cepas produtoras aponta para outros mecanismos, inclusive com possibilidade de regulação através de outras vias.
- A análise comparativa entre os dendrogramas da linha de ordenha e do leite evidenciou diferenças entre os isolados. Os isolados do leite apresentaram grande distância genética entre si. Enquanto que os isolados da linha de ordenha eram mais próximos geneticamente. Quatro isolados avaliados no presente estudo não puderam ser clivados pela *SmaI*, e serão submetidos á análises posteriores.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Fazendo uma avaliação dos resultados de uma forma geral, observamos que em sete dos oito rebanhos avaliados a frequência de animais CMT positivos foi superior a 50%, a identificação fenogenotípica revelou que 85,6% (350/411) dos isolados oriundos do leite e da linha de ordenha foram *Staphylococcus* spp. Dentre as espécies de bastonetes Gram negativos isolados do leite e da linha de ordenha, obteve-se um total de 14,35% (59/411), sendo 9,5% (39/411) correspondentes ao leite e 5,35% (22/411) a linha de ordenha.

Em relação a resistência fenotípica a cefoxitina foi observado que 67,2% (168/250) dos *Staphylococcus* spp isolados do leite, no entanto, todos foram negativos à detecção do gene *mecA*. Quanto aos isolados da linha de ordenha, foi detectada 56% (56/100) de resistência fenotípica a cefoxitina e 23% de isolados *mecA* positivos (23/100), porém, destes, 17,4% (4/23) não apresentaram resistência fenotípica à cefoxitina. Tais resultados indicam que a predição da resistência mediada pelo gene *mecA* precisa ser melhor estudada em ambientes de produção animal.

Dentro do contexto da importância econômica e social da atividade leiteira para o país notamos que é importante adoção de políticas públicas que considerem a realidade de produção e as necessidades básicas de cada unidade leiteira é preponderante para que a implementação de boas práticas de ordenha e a capacitação operacional nas propriedades tornem-se eficientes e constantes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARESTRUP, F.M.; SEYFARTH, A.M.; EMBORBG, H. **Effect of abolishment of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal enterococci from food animals in Denmark.** *Ant. Ag. Chemoth.*, v.45, pp.2054-2059, 2001.

AGUILAR, B.; ITURRALDE, M. **Binding of a surface protein of *Staphylococcus aureus* to cultured ovine mammary gland epithelial cells.** *Veterinary Microbiology*, Geneva, v. 82, pp. 165-175, 2001

AHER, C. **The isolation pattern, species distribution and antibiotic susceptibility profile of coagulase negative Staphylococci: an emerging opportunistic pathogen.** *Int. J. Biomed. Adv. Reserarche.* v.5, pp. 23-25, 2014.

AIRES-DE-SOUSA, M. **High interlaboratory reproducibility of DNA sequence-based typing of bacteria in a multicenter study.** *J. Clin. Microbiol.* v.44, pp.619-21, 2006.

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 de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa. 2010.

ALMEIDA, R.A.; MATTHEWS, K.R.; CIFRIAN, E.; GUIDRY, A.J.; OLIVER S.P. ***Staphylococcus aureus* invasion of bovine mamary epithelial cells.** *J. DAIRY Sci .* , v.79, n. 6, pp.1021-1026, 1996

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 Sao Paulo.** *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária Zootecnia.* v. 55 n°5, 2003.

ANDRADE, S. F. **Manual de terapêutica veterinária.** Cap. 27,. pp. 759-7713. ed. São Paulo, SP: Roca, 2008.

ANDERSON, K. L. & LYMAN, R. L. **Long-term persistence of specific genetic types of mastitis-causing *Staphylococcus aureus* on three dairies.** *J. Dairy Sci.*, v.89, pp.4551-4556, 2006

ARCIOLA, C.R.; CAMPOCCIA, D.; GAMBERINI, S.; CERNELLATI M.; DONATI, E.; MONTANARO, L. **Detection of slime production by means of an optimized congo red agar plate based on a colorimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates genotyped for *ica* locus.** *Biomaterials.*; v.23 pp. 4233–4239,2002.

ARCIOLA, C. R.; BALDASSARI, L.; MONTANARO, L. **Presence of *icaA* and *icaD* and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections.** *Journal of Clíical Microbiology*, Washington, v. 39, p. 2151-2156, 2001.

APARNA, MADHU SHARMA; YADAV, SARITA. **Biofilms: microbes and disease.** *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v.12, n°6, pp.526-530, 2008.

BANNERMAN, T.L.; PEACOCK, S. **Staphylococcus, Micrococcus and other catalase-positive cocci.** In: Manual of Clinical Microbiology. MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; JORGEMAN, J. H.; LANDY, M. L.; PFALLER, J. M. A (eds). 9th ed. Washington DC, ASM Press, pp. 390- 411, 2007.

BANNERMAN, T.M. **Staphylococcus, Micrococcus and other catalase-positive cocci that grow aerobically.** In: P. R. Murray (Ed.). Manual of Clinical Microbiology, Eighth Edition. Washington, DC: ASM Press, v. 1, pp. 384-404, 2003.

BANNERMAN, T.L.; HANCOCK, D.; TENOVER, F.; MILLER, J.M. **Pulsed-field gel electrophoresis as a replacement for bacteriophage typing of *Staphylococcus aureus*.** J. Clin. Microbiol. v.33, pp.551-555, 1995.

BANNOEHR, J.; FRANCO, A.; IURESCIA, M.; BATTISTI, A.; FITZGERALD, J.R. **Molecular Diagnostic Identification of *Staphylococcus pseudintermedius*.** Journal of clinical microbiology, v. 47, n. 2, p. 469–471, 2009.

BANNOEHR, 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. v.189 pp.8685–8692, 2007.

BASELGA, R.; ALBIZU, I.; DE LA CRUZ, M.; DEL CACHO, E.; BARBERAN, M.; AMORENA, B. **Phase variation of slime production in *Staphylococcus aureus*: implications in colonization and virulence.** Infection and Immunity, Washington, v. 61, pp. 4857-4862, 1993.

BENIĆ, M.; HABRUN, B.; KOMPES, G.; MIHALJEVI, Ž.; HABRUN, M., B.; KOMPES, G.; MIHALJEVIĆ, Ž.; CVETNI, Ž.; CERGOLJ, M.; CERGOLJ, N.M.A.; MAČEŠIĆ, N.. **Cell content in milk from cows with cell content in milk from cows with *S. aureus* intramammary infection.** Vet. Arhiv., v.82, pp.411-422, 2012.

BENS, C.C.; VOSS, A.; KLAASSEN, C.H. **Presence of a novel DNA methylation enzyme in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with pig farming leads to uninterpretable results in standard pulsed-field gel electrophoresis analysis.** J. Clin. Microbiol. v.44, pp.1875–1876, 2006.

BERNARDI, A.C.A.; PIZZOLITTO, E.L.; PIZZOLITTO, A.C. **Detection of slime production by coagulase-negative staphylococci isolated from central venous catheter.** Rev Cien Farm Apl. v.28, pp.57–66, 2007.

BERNARDI, A. C. A. **Estudo de amostras de *Staphylococcus coagulase- negativa* quanto a formação de biofilme.** Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, Tese de Doutorado, 2005.

BLODGETT, R. **Most probable number from serial dilutions,** 2006. In: Bacteriological Analytical Manual Online. 2001. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov>>.

BOARI, C. A. **Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de cultivo.** Universidade Federal de

Lavras, Lavras, Tese de Doutorado em Ciência dos Alimentos, 2008.

BRADLEY, A.J.; LEACH, K.A., BREEN, J.E.; GREEN, L.E.; GREEN, M.J. **Survey of the incidence and a etiology of mastitis on dairy farms in England and Wales.** Vet. Rec. v.160, pp.253–258, 2007.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Instrução Normativa nº 38. Proíbe a fabricação, a importação e a comercialização de cloranfenicol, de nitrofuranos e de produtos que contenham estes princípios ativos, para uso em preparações de insumos utilizados na pecuária nacional.** Diário Oficial da União, 2002.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Instrução Normativa nº 13. Aprova o Regulamento Técnico sobre Aditivos para Produtos Destinados à Alimentação Animal, segundo as boas práticas de fabricação, contendo os procedimentos sobre avaliação da segurança de uso, registro e comercialização.** Diário Oficial da União, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação geral de Vigilância em Saúde Ambiental. Portaria MS nº518, de 25 de março de 2004. **Controle e vigilância da qualidade da água para o consumo humano e seu padrão de potabilidade.** Brasília: Ministério da Saúde, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação geral de Vigilância em Saúde Ambiental. Portaria MS nº518, de 25 de março de 2004. **Controle e vigilância da qualidade da água para o consumo humano e seu padrão de potabilidade.** Brasília: Ministério da Saúde, 2005.

BRASIL - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E DO BASTECIMENTO (MAPA). **Instrução Normativa Nº 62: Regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, do leite tipo B, do leite tipo C, do leite pasteurizado e do leite cru refrigerado e o regulamento técnico da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel.**Diário Oficial da União, 2011.

BRITO, M.A.V.P. **Diagnóstico microbiológico da mastite bovina.** Disponível em: <http://www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/viewFile/7670/5443>. Acesso: 15 dez. 2013.

BRITO, M.A.; BRITO, V.P.; RIBEIRO, M.T.; VEIGA, V.M.O. **Padrão de infecção de intramamária em rebanhos leiteiros: Exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação.** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. v.51, pp.129–135, 2002.

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.**Arquivos Brasileirosde Medicina Veterinária e Zootecnia, v.53, nº5, pp.10-17, 2001.

BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; RIBEIRO, M.T.; VEIGA, V.M.O. **Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação.**Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, Juiz de Fora, v.51, n.2, p.129-135, 2000.

BUSH, K.; JACOBY, G.A. **Updated functional classification of β lactamases.** *Antimicrob Agents Chemother*, v.54, n° 3, pp. 969-976, 2010.

CANTÓN, R.; NOVAIS, A.; VALVERDE, A.; MACHADO, E.; PEIXE, L.; BAQUERO, F.; COQUE, T. M. **Prevalence and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe.** *Clin. Microbiol. Infect.* v.14, pp.144–153, 2008.

CARDOSO H.F.T.; CARMO L.S.; SILVA N.; SENA, M.J. **Production of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Brazil.** *Letters Appl. Microbiol.*, Oxford, v.29, pp.347-349, 2000.

CARDOSO, V.L.; MONSALVES, F.M.; EL FARO, L. **Valores econômicos para ocorrência de mastite clínica e contagem de células somáticas em um sistema intensivo de Produção de Leite.** 42ª Reunião da Sociedade Brasileira de Zootecnia. Goiânia, Goiás, 2005.

CARVALHO, L.A. **Embrapa gado de leite: sistema de produção.** Disponível na internet. www.cnp.gl.embrapa.br/sistema/cerrado.html. Acesso em 16 set. 2013.

CARNEIRO, D.M.V.F.; DOMINGOS, P.F.; VAZ, A.K. **Imunidade inata da glândula mamária bovina: resposta à infecção.** *Ciência Rural* v.39 n°.6, pp.1934-1943, 2009.

CERESER, N.D.; ROSSI JUNIOR, O.D.; MARCHI, P.G.F.; SOUZA, V.; CARDOZO, M.V.; MARTINELLI, T.M. **Avaliação da qualidade microbiológica da ricota comercializada em supermercados do Estado de São Paulo.** *Ci. Anim. Bras.*; v.12, n°.01, pp.149-155, 2011.

CHMIELEWSKI, R.A.N. & FRANK, J.F. **Biofilm formation and control in food processing facilities.** *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v.2, n°. 1, pp. 22-32, 2003.

CHIOU, C. S.; WEI, H. L.; YANG, L. C. **Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and coagulase gene restriction profile analysis techniques in the molecular typing of *Staphylococcus aureus*.** *J. Clin. Microbiol.*v.38, pp.2186– 2190, 2000.

CHUNG, M.; DE LENCASTRE, H.; MATTHEWS, P.; TOMASZ, A.; ADAMSSON, I.; AIRES DE SOUSA, M.; CAMOU, T.; COCUZZA, C.; CORSO, A.; COUTO, I.; DOMINGUEZ, A.; GNIADKOWSKI, M.; GOERING, R.; GOMES, A.; KIKUCHI, K.; MARCHESE, A.; MATO, R.; MELTER, O.; OLIVEIRA, D.; PALACIO, R.; SA-LEAO, R.; SANTOS SANCHES, I.; SONG, J. H.; TASSIOS, P.T.; VILLARI, P. **Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis: comparison of results obtained in a multilaboratory effort using identical protocols and MRSA strains.** *Microb. Drug Resist.* v.6, pp.189–198, 2000.

CHU, V. H.; WOODS, C. W.; MIRO, J. M.; HOEN, B.; CABELL, C. H.; PAPPAS, P. A.; FEDERSPIEL, J.; ATAHANS, E.; STRIJEWski, M.E.; NACINOVICHI, F.; MARCO, F.; LEVINE, D.P.; ELLIOTT, T.S.; FORTES, C. Q.; TORNOS, GORDON, D. L.; UTILI, R.; DELAHAËYE, F.; COREY, G.R. **Emergence of coagulase negative as a cause of native valve endocarditis.** *Clin. Infect. Dist.* v.46, pp.232-242, 2008.

CIFTCI, A.; FINDIK, A.; ONUK, E.E.; SAVASAN, S. **Detection of methicillin resistance and slime factor production of *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis.** Brazilian J. Microbiol., v.40, pp.254-261, 2009.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing.** 20th Informational Supplement, M100-S20. CLSI, Wayne, PA. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.

CLEMENTS, A.C.A.; TAYLOR, D.J.; FITZPATRICK, J.L. **Evaluation of diagnostic procedures form sub clinical mastitis in meat-producing sheep.** Dairy Research, v.70, p.139-148, 2003.

COELHO S.M.O.; REINOSO, E.; PEREIRA I.A.; SOARES L.C.; DEMO M.; BOGNI C.; SOUZA, M.M.S. **Virulence factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Rio de Janeiro.** Pesq. Vet. Bras. v.29, pp.369-374, 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.** Ciência Rural. v.37, pp.195-200, 2007.

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., v.60, pp.283-288, 2008.

COQUE, T.M.; BAQUERO, F.; CANTÓN, R. **Increasing prevalence of ESBL producing Enterobacteriaceae in Europe.** Euro Surveillance, v.13, n°.47, pp.1-11, 2008.

CORRÊA, I. **Resistencia a drogas antimicrobianas de cepas de *Staphylococcus coagulase positivo* de leite mastítico bovino.** Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, pp. 58, 2003.

COSTA, E. O. **Importância da mastite na produção leiteira do país.** Educação Continuada, CRMV-SP, v.1, n.1, 2002.

COSTA, E.O.; BENETIS, N.R.; GUERRA, J.L.; GUERRA, J.L.; MELVILLE, P.A. **Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* spp. isolate from mammary parenchymas of slaughtered dayre cows.** Jornal of Veterinary Medicine, v.47, pp..99-103, 2000.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. **Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections.** Science v.284, pp.1318-1322, 1999.

CRAMTON, S. E.; GERKE, C.; SCHNELL, N. F.; NICHOLS, W. W.; GÖTZ, F. **The intercellular adhesion (ica) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation.** Infect Immun. v.67, pp.5427–5433, 1999.

CREMONESI, P.; LUZZANA, M.; BRASCA, M.; MORANDI, S.; LODI, R.; VIMERCATI, C.; AGNELLINI, D.; CARAMENTI, G.; MORONI, P.; CASTIGLIONI, B. **Development of a multiplex PCR assay for the identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products.** Molecular and Celular Pobres, v. 9, n°.5, pp.299-305, 2005.

CUNHA, A.P.; SILVA, L.B.G.; PINHEIRO JÚNIOR, 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.** Arquivo Instituto de Biologia, São Paulo, v.73, nº.1, pp.17-21, 2002.

CUNY, C.; LAYER, F.; STROMMINGER, B.; WITTE, W. **Rare Occurrence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* CC130 with a Novel mecA Homologue in Humans in Germany.** PLoS ONE, v. 6, n. 9, 2011.

CUNY C., STROMMINGER B., WITTE W., STANEK C. **Clusters of infections in horses with MRSA ST1, ST254, and ST398 in a veterinary hospital.** Microb. Drug Resist. v.14, pp.307–310, 2008.

DANCER, S.J. **The problem with cephalosporins.** Journal Antimicrobial and Chemotherapy, v.48, pp.463–478, 2001.

DA ROS, C. A. **A contribuição das visitas de campo no ensino das Ciências Agrárias na UFRRJ.** Rev. Ciênc. Ext.v.8, nº.1, pp.1, 2012.

DAVIS, M.F.; CAIN, C.L.; BRAZIL, A. M.; RANKIN, S.C. **Two coagulase negative *Staphylococci* emerging as potential zoonotic pathogens: wolves in shepp's clothing.** Front.Microbiol. v.4, pp.1-4, 2013.

DANMAP. **Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, foods and humans in Denmark.** 2002. Available at: http://www.danmap.org/pdfFiles/Danmap_2002.pdf

DANMAP. **Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, foods and humans in Denmark.** 2001. Available at: http://www.danmap.org/pdfFiles/Danmap_2001.pdf

DEGO, K.O.; VAN DIJK, J.E.; NEDERBRAGT, H. **Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion: A review.** Vet. Microbiol. v.24, pp.181-198, 2002.

DELGADO, S.; GARCÍA, P.; FERNÁNDEZ, L.; JIMÉNEZ, E.; RODRÍGUEZ-BAÑOS, M.; DEL CAMPO, R.; RODRÍGUEZ, J. M. **Characterization of *Staphylococcus aureus* strains involved in human and bovine mastitis.** FEMS Immunology & Medical Microbiology, v.62, pp. 225-235.

DEPLANO, A.; SCHUERMANS, A.; VAN ELDERE, J.; WITTE, W.; MEUGNIER, H.; ETIENNE, J.; GRUNDMANN, H.; JONAS, D.; NOORDHOEK G. T.; DIJKSTRA, J.; VAN BELKUM, A.; VAN LEEUWEN, W.; TASSIOS, P. T.; LEGAKIS, N. J.; VAN DER ZEE, A.; BERGMANS, A.; BLANC, D. S.; TENOVER, F. C.; COOKSON, B. C.; O'NEIL, G.; STRUELENS, M. J. AND THE EUROPEAN STUDY GROUP ON EPIDEMIOLOGICAL MARKERS OF THE ESCMID. **Multicenter evaluation of epidemiological typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains by repetitive-element PCR analysis.** J. Clin. Microbiol. v.38, pp.3527–3533, 2000.

DEVRIESE, L.A.; VANCANNEYT, M.; BAELE, M. ***Staphylococcus intermedius* sp. nov., a coagulase positive species from animals.** International Journal of Systematic and Environmental Microbiology, v.55, pp.1569-1573, 2005.

DEVRIESE, L. A.; HERMANS, K.; BAELE, M.; HAESEBROUCK, F. ***Staphylococcus pseudintermedius* versus *Staphylococcus intermedius*.** Vet. Microbiol. v.133, pp.206–207, 2008.

DEVRIESE, L.A.; VANCANNEY, M.; BAELE, M.; VANECHOUTTE, M.; DE GRAEF, E.; SNAUWAERT, C.; CLEENWERCK, I.; DAWYNDT, P.; SWINGS, J.; DECOSTERE, A.; HAESEBROUCK, F. ***Staphylococcus pseudointermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals.** Int. J. Syst. Evol. Microbiol., v.55, pp.1569–1573, 2005.

DEVRIESE, L. A., SCHLEIFER, K. H., ADEGOKE, G. O. **Identification of coagulase-negative staphylococci from farm animals.** Journal of Applied Bacteriology. v.58, pp.45-55, 1985.

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. v.46, pp.1818–1823, 2008

DHANAWADE, N.B.; KALOREY, D.R.; SRINIVASAN, R.; BARBUDDHE, S.B.; KURKURE, N.V. **Detection of intercellular adhesion genes and biofilm production in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis.** Vet. Res. Commun., v.34, pp. 81–89, 2010.

DIARIO DO VALE, **Rio Leite Sul Reúne Pecuaristas no dia 13 em Resende.** Reportagem online. <http://diariodovale.uol.com.br/noticias/0,43091,Rio-Leite-Sul-reune-pecuaristas-dia-13-em-Resende.html#ixzz2HqDzvwDq> acessada 29 de dezembro de 2011 às 19hrs.

DONATELE, D. M & MOTTA, O. V., FOLLY, M.M. **Perfil antimicrobiano de linhagens de *Staphylococcus coagulase positivo* na mastite subclínica de vacas leiteiras na regiões norte e noroeste do estado do Rio de Janeiro.** Revista Núcleo de Apoio à pesquisa da Glandula Mamaria e Produção Leiteira, v.5, pp3-6, 2002

EMBRAPA GADO DE LEITE. **Sistema de Produção: importância econômica.** 2009. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/leite/leiteCerrado.html>. Acesso em 25 de fevereiro de 2013.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite,** <http://www.cnppl.embrapa.br/>. Acesso em: 4 de Janeiro de 2013.

ENRIGHT, M. C. & SPRATT, B. G. **Multilocus sequence typing.** Trends Microbiol. v.7, pp.482-487, 1999.

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

- EUZÉBY, J. **List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature**, 2007.
- 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**. *The Journal of Hospital Infection*, v.73, n°.4, pp.345-354, 2009.
- FARIA, N.A.; OLIVEIRA, D.C.; WESTH, H.; MONNET, D.L.; LARSEN, A.R.; SKOV, R.; DE LENCASTRE, H. **Epidemiology of emerging methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection Denmark: a nationwide study in a country with low prevalence of MRSA infection**. *J. Clin. Microbiol.* v.43, pp.1839-1842, 2005.
- FAO/WHO. **Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives**. 66th meeting (Residues of veterinary drugs). 2006 Feb 22-28; Rome; Italy. Summary and Conclusions. Rome, March 2006.
- FERREIRA, L. M.; NADER FILHO, A.; OLIVEIRA, E.; ZAFALON, L. F.; SOUZA, V. **Variabilidades fenotípica e genotípica de estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas em casos de mastite subclínica bovina**. *Cienc. Rural*, Santa Maria, v.36, n°.4, 2006.
- FLEMMING, H.C. & WINGENDER, J. **The Biofilm Matrix**. *Nature Reviews Microbiology*, v.8, pp.623-633, 2010.
- FONSECA, L.F.L. & SANTOS M.V. **Qualidade do leite e controle de mastite**. Editora Lemos, São Paulo, pp.50, 2000.
- FOX, L.K.; KIRK, J.H.; BRITTEN, A. **Mycoplasma Mastitis: A review of transmission and Control**. *Journal of Veterinary Medicine Series B* v.52, n°.4, pp.153-160, 2005.
- FRANCO, R. M.; CAVALCANTI, R. M. S.; WOOD, P. C. B.; LORETTI, V. P.; GONÇALVES, P. M. R.; OLIVEIRA, L. A. T. **Avaliação Da Qualidade Higiénico-Sanitária De Leite E Derivados**. *Higiene Alimentar*, v.14, n°.68/69, pp.70-77, 2000.
- FITZGERALD, R.H.; RICHARDSON, J.F.; SANE, M.J. **Four apparent outbreaks of prosthetic valve endocarditis caused by coagulase negative staphylococci**. *Zentralblatt Bakteriologie Supplementum*, v.14, pp. 463-469, 2005.
- FREITAS, M.F.L.; PINHEIRO JÚNIOR, J.W.; STAMFORD, T.L.M.; RABELO, S.S.A.; SILVA, D.R.; SILVEIRA FILHO, 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**. *Arqs Inst. Biológico*, São Paulo, v.72, n°.2, pp.171-177, 2005.
- GARCIA-ALVAREZ, L.; HOLDEN, M.T.; LINDSAY, H.; WEBB, C.R.; BROWN, D.F. **Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study**. *Lancet Infect. Dis.* v.11, pp.595-603, 2011.
- GARZONI, C. & KELLEY, W.L. ***Staphylococcus aureus*: new evidence for intracellular persistence**. *Trends in Microbiology*, v.17, n°.2, pp.59-65, 2009.

GUARDABASSI, L.; SCHWARZ, S.; LLOYD, D.H. **Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria.** J. Antimicrob. Chemother. v.54, pp.321–332, 2004.

GERMANO, P.M.L. & GERMANO, M.I.S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**, 3ª ed. São Paulo: Editora Manole, pp. 986, 2008.

GERKE, C., KRAFT, A.; SUSSMUTH, R.; SCHWEITZER, O.; GOTZ, F. **Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin.** J. Biol. Chem. v.273, pp.18586–18593, 1998.

GENTILINI, E.; DENAMIEL, G.; BETANCOR, A. **Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis in Argentina.** J. Dairy Sci. v.85, pp.1913-1917, 2002.

GIANNECHINI, R.E.; CONCHA, C.; FRANKLIN, A. **Antimicrobial susceptibility of udder pathogens isolated from dairy herds in the west littoral region of Uruguay.** Acta Veterinaria Scandinavica, v.43, pp. 31–41, 2002.

GIANOLA, D.; HERINGSTAD, B.; KLEMETSDAL, G.; CHANG, Y. M. **Longitudinal analysis of clinical mastitis at different stages of lactation in Norwegian cattle.** Livestock Production Science, v. 88, p. 251-261, 2004

GONÇALVES, T.M.P. **Caracterização de genes que codificam para beta-lactamase de espectro alargado em *Enterobacteriaceae* de origem hospitalar.** Universidade Fernando Pessoa, Dissertação de Mestrado em Ciências Farmaceuticas, 2010.

GOMES, S. T. **Diagnóstico da cadeia produtiva do leite em Goiás: relatório de pesquisa.** Federação da Agricultura e Pecuária de Goiás. 1ª ed. Goiânia, 2009.

GOMES, S. T. **Diagnóstico e perspectivas da produção de leite no Brasil.** In: VILELA, D.; BRESSAN, M.; CUNHA, A. S. Cadeia de lácteos no Brasil: restrições ao seu desenvolvimento. Brasília: MCT/CNPq, Juiz de Fora: EMBRAPA Gado de Leite, pp.21-37, 2010.

GONÇALVES, T. M. P. **Caracterização de genes que codificam beta-lactamases de espectro alargado em *Enterobacteriaceae* de origem hospitalar.** Universidade Fernando Pessoa, Monografia de Ciências Farmacêuticas, 2010.

GRÖHN, Y. T.; WILSON, D. J.; GONZALEZ, R. N.; HERTL, J. A.; SCHULTE, H.; BENNETT, G.; SCHUKKEN, Y. H. **Effect of pathogen-specific clinical mastitis on milk yield in dairy cows.** Journal of dairy science, v.87, nº.10, pp.3358-3374, 2004.

HACHEM, N. I. **Mastite Bovina: Descrição dos tipos mais frequentes e métodos de prevenção e tratamento visando a melhoria da qualidade do leite e saúde dos rebanhos.** Universidade Federal de Lavras, Dissertação de Pós-Graduação Lato Sensu em Processamento e Controle de Qualidade em Carne, Leite, Ovos e Pescado, 2005.

HAFTU, R.; TADDELE, H.; GUGSA, G.; KALAYOU, S. **Prevalence, bacterial causes, and antimicrobial susceptibility profile of mastitis isolates from cows in large-scale dairy farms of Northern Ethiopia.** Trop. Anim. Health Prod., v.44, pp.1765–1771, 2012.

HALLIN, M.; DENIS, O.; DEPLANO, A.; DE MENDONCA, R.; DE RYCK, R.; ROTTIERS, S.; STRUELENS, M. J. **Genetic relatedness between methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: results of a national survey.** J. Antimicrob. Chemother.v.59, pp.465–472, 2007.

HALL-STOODLEY, L. & STOODLEY, P. **Evolving concepts in biofilm infections.** Cell Microbiol 11: 1034–1043, 2009.

HASMAN, H.; MOODLEY, A.; GUARDABASSI, L.; STEGGER, M.; SKOV, R. L.; AARESTRUP, F. M. **Spa type distribution in *Staphylococcus aureus* originating from pigs, cattle and poultry.** Vet. Microbiol., v.141, pp.326–331, 2010.

HATA, E. ; KATSUDA, K.; KOBAYASHI, H.; UCHIDA, I.; TANAKA, K.; EGUCHI, M. **Genetic variation among *Staphylococcus aureus* strains from bovine milk and their relevance to methicillin-resistant isolates from humans.** J. Clin. Microbiol. v.48, pp.2130–2139, 2010.

HAVERI, M.; ROSLO F. A., RANTALA, L.; PYORALA , S. **Virulence genes of bovine *Staphylococcus aureus* from persistent and non persistent intra-mammary infections with different clinical characteristics.** J. Appl.Microbiol. v.103, pp. 993–1000, 2008.

HEMSWORTH, P. H.; COLEMAN, G.J.; BARNETT,J.L.; BORG,S. **Relationships between human animal interactions and productivity of commercial dairy cows.** Journal of Animal Science, v.78, pp.2821-2831, 2000.

HERRON-OLSON, L.; FITZGERALD, J. R.; MUSSER, J. M.; KAPUR, V. **Molecular correlates of host specialization in *Staphylococcus aureus*.** PLoS ONE 2, e112, 2007.

HIRSH, D.C. & ZEE,Y.C. **Microbiologia Veterinária**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, pp.446, 2003.

HOGAN, J., & SMITH, K. L. **Coliform mastitis.** Veterinary research, v.34, nº.5, pp.507-519, 2003.

HONORATO, L.A. **A interação humano-animal e o uso de homeopatia em Bovinos de leite.** Centro de Ciências Agrárias. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. Dissertação de Mestrado em Agroecossistemas. 2006.

HUBER, H.; KOLLER,S.; GIEZENDANNER, N.; STEPHAN, R.; ZWEIFEL, C. **Prevalence and characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in humans in contact with farm animals, in livestock, and in food of animal origin, Switzerland, 2009.** Euro Surveill., v.15, pp.19542, 2010.

HUDOME, S.M. & FISHER, M.C. **Nosocomial infections in the neonatal intensive care.** Curr. Opin. Infect. Dis., v.14, pp.303-307, 2001.

IBGE. **Censo Demográfico e Econômico**, 2004., <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 4 de Janeiro de 2013.

INGALLS, W. **Industry presentation. Procedures and products required for milking center efficiency, mastitis control and production of high quality milk**. High Plains Dairy Conference. Industry Presentation. Kansas City: DeLaval Inc., 2006.

ITO T; KATAYAMA Y.; ASDA K.; MORI N.; TSUTSUMIMOTO K.; TIENSASITORN C.; HIRAMATSU K. **Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *S. aureus***. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. v.45, pp.1323-1336, 2001.

ITO, T.; MA, X.X.; TAKEUCHI, F.; OKUMA, K.; YUZAWA, H.; HIRAMATSU, K. **Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccr***. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. v.48, pp. 2637-2651, 2004.

JACQUES, M.; ARAGON, V.; TREMBLAY, Y. **Biofilm formation in bacterial pathogens of veterinary importance**. Animal Health Research Reviews, v.11, pp.97-121, 2010

JANSEN, M.D.; BOX, A.T.A.; FLUIT, A.C. **SCC*mec* Typing in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains of Animal Origin**. Emerging Infectious Diseases.v.15, n.1, p.136, 2009.

JAYARAMAN, A. & WOOD, T. K. **Bacterial quorum sensing: signals, circuits, and implications for biofilms and disease**. Annu. Rev. Biomed. Eng., v.10, pp.145-167, 2008.

JOHNSON, J.R.; JOHNSTON, B.; CLABOTS, C.R. **Virulence genotypes and phylogenetic background of *Escherichia coli* serogroup O6 isolates from humans, dogs, and cats**. J. Clin. Microbiol.v.46, pp.417-422, 2008.

JONSSON P. & WADSTORM T. ***Staphylococcus***. In: Gyles C.L. & Thoen C.O. (eds.), Pathogenesis of bacterial infections in animals, The Iowa State University Press, USA, pp. 21-43, 1993.

JOHN, G.T. & DONALE, C.L. **Biofilms: architects of disease**. pp.884-895, 2007.

JØRGENSEN, H. J.; MØRK, T.; CAUGANT, D. A.; KEARNS, A.; RØRVIK, L. M. **Genetic variation among *Staphylococcus aureus* strains from Norwegian bulk milk**. Appl. Environ. Microbiol. v.71, pp.8352-8361, 2005.

KHANNA, T.; FRIENDSHIP, R.; DEWEY, C.; WEESE, J.S. **Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* colonization in pigs and pig farmers**. Vet. Microbiol. v.128, pp. 298–303, 2008.

KAIPAINEN, T.; POHJANVIRTA, T.; SHPIGEL, N. Y.; SHWIMMER, A.; PYÖRÄLÄ, S.; PELKONEN, S. **Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from bovine clinical mastitis**. Veterinary microbiology, v.85, n°1, pp.37-46, 2002.

KARAHAN M ; CETINKAYA B. **Coagulase gene polymorphisms detected by PCR in *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis in Turkey.** Vet J.,v.174, n°2, pp.428-431, 2007.

KAPUR, V.; SISCHO, W. M.; GREER, R. S.; WHITTAM, T. S.; MUSSER, J. M. **Molecular population genetic analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows.** J. Clin. Microbiol. v.33, pp.376-380, 1995.

KATAYAMA, Y.; ITO, T.; HIRAMATSU, K. **Genetic organization of the chromosome region surrounding *mecA* in clinical staphylococcal strains: role of *IS431*-mediated *mecI* deletion in expression of resistance in *mecA*-carrying, low-level methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus*.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 45, n. 7, p. 1955-1963, 2001.

KOHNER, J. P.; UHL, J.; KOLBERT, C.; PERSING, D. ; COCKERILL, F. **Comparison of susceptibility testing methods with *mecA* Gene analysis for determining oxacilin (methicilin) resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococcus spp.** Journal of Clinical Microbiology.v.76, n.4 pp.569-575, 1999.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, J.R. Diagn. Microbiol. 6.ed. Rio de Janeiro: Editora MEDS, 2008.

KOREEN, L., RAMASWAMY S. V., GRAVISS E. A., NAIDICH S., MUSSER J. M. ***spa* typing method for discriminating among *Staphylococcus aureus* isolates: implications for use of a single marker to detect genetic micro- and macrovariation.** J. Clin. Microbiol., v.42, pp.792-9,2004.

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.**Arquivo Instituto de Biologia, São Paulo, v.76, n°4, pp.569-575, 2009.

LANGE, CARLA C. **Uso de PCR e sequenciamento do rDNA 16S para identificação de bactérias do gênero *Staphylococcus* isoladas de mastite bovina1.** Pesq. Vet. Bras v.31, n°1, pp.36-40, 2011.

LANGE, C.; CARDOSO, M.; SENCZEK, D.; SCHWARZ, S. **Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* isolates from cases of bovine mastitis in Brazil.** Vet. Microbiol. v.67, pp.127–141, 1999.

LANGONI, H.; MENDONÇA, A.O.; DEVELLEY, A. **Avaliação do uso da associação da bromexina com gentamicina no tratamento da mastite subclínica bovina.**Napgama,n°1, pp.4-7, 2000.

LANGONI, H.; SAKIYAMA, D. T. P.; GUIMARÃES, F. de F.; MENOZZI, B. D.; da SILVA, R. C. **Aspectos citológicos e microbiológicos do leite em propriedades no sistema orgânico de produção.** Pesquisa Vet. Brasileira, v. 29, n.11, p. 881- 886, 2009.

LAPIDOT, A.; RÖMLING, U.; YARON, S. **Biofilm formation and the survival of *Salmonella typhimurium* on parsley.** Int. J. Food Microbiol. v.109, pp.229–33, 2006.

LEHNER, A.; RIEDEL, K.; EBEREL, L.; BREEUWER, P.; DIEP, B.; STEPHAN, R. **Biofilm formation, extracellular polysaccharide production, and cell-to-cell signaling in various *Enterobacter sakazakii* strains: aspects promoting environmental persistence.** J. Food Prot. v.68, pp.2287-2294, 2005.

LEITER, T. **Cephalosporins.** <http://www.fhsu.edu/nursing/otitis/cephalosporins.html>, 2000. Acessado em junho de 2012

LEONARD, F.C. & MARKEY, B.K. **Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals: a review.** Vet. J. v.175, pp.27–36, 2008.

LOEFFLER, A. & LLOYD, D. H. **Companion animals: a reservoir for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the community?** Epidemiol. Infect. v.138, pp.595–605, 2010.

LOMANDER, A. **Evaluation of chlorines impact on biofilms on scratched stainless steel surfaces.** Bioresources Technology, Raleigh, v.94, n°3, pp.275-283, 2004.

MA, X. X.; ITO, T.; TIASANSITORN, C.; JAMKLANG, M.; CHONGTRAKOOL, P.; BOYLE-VAVRA, S.; DAUM, R. S.; HIRAMATSU, K. **Novel type of staphylococcal cassette chromosome *mec* identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains.** Antimicrob Agents Chemother. v.46, n°4, pp.1147-1152, 2002

MACHADO, T.R.O.; CORREA, M.G.; MARINS, 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.

MACK, D.; ROHDE, H. DOBINSKY, S.; RIEDEWALD, J.; NEDELMANN, M.; KNOBLOCK, J.K.M. ELSNER, H.A.; FEUCHT, H.H. **Identification of three essential regulatory gene loci governing expression of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin and biofilm formation.** Infect Immun. v. 68, p. 3799–3807, 2000.

MADIGAN, M. T; MARTINKO, J. M; DUNLAP, P.V; CLARK, D.P. **Microbiologia de Brock.** 1160,p.12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

MALLET, A. **Quantificação e identificação de *Escherichia coli*, *Pseudomonas Aeruginosa* e *Aeromonas hydrophila* em águas utilizadas em pequenas propriedades leiteiras.** In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 26., 2007, Juiz de Fora. Anais... Revista do Instituto de laticínios "Cândido Tostes". v.62, n.357, p.394-400, 2007.

MARAFON, G. J. **Industrialização da agricultura e formação do Complexo Agroindustrial no Brasil.** n.3, p. 7-21. Geo UERJ Revista do Departamento de Geografia, Rio de Janeiro, 2004.

MARAN,. **Monitoring of antimicrobial resistance and antibiotic usage in animals in the Netherlands in 2005.** Disponível em: <http://www.cidc-lelystad.wur.nl/UK/publications/> . Acessado em : janeiro de 2013.

MARAN, **Monitoring of antimicrobial resistance and antibiotic usage in animals in the Netherlands in 2004**. Disponível <<http://www.cidc-lelystad.wur.nl/UK/publications/>>2004. Acessado em: janeiro de 2013.

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.** / *The in vitro action of enrofloxacin on the microorganisms isolated from mastitic bovine milk.* Ars Veterinaria, Jaboticabal, SP, V. 18, n° 2, 120-124p, 2002.

MARONI P., PISONI G., ANTONI M., VILLA R., BOETTCHER P. & CARLI S. **Curta comunicação: suscetibilidade às drogas antimicrobianas de *Staphylococcus aureus* oriundos de mastites bovinas subclínicas na Itália.** J. Dairy Sci. v. 89:2973-2976p, 2006.

MARSHALL, K. C.; STOUT, R.; MITCHELL, R. **Mechanism of initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces.** Journal of General Microbiology, Reading. v. 68. 337-348p, 1971.

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

MARTÍNEZ ROJAS, D. D. V. **AmpC type betalactamases: generalities and phenotype detection methods.** Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiologia. v. 29, n, 78-83p, 2009.

MASLOW, J. & MULLIGAN, M. E. **Epidemiologic Typing Systems.** Infec.Control and Hosp. Epidem., v.17, n,9,595-604 pp, 1996.

MATTIODA, F. **Influência do processo de qualificação para melhoria da qualidade do leite na pequena propriedade rural.** 98p. Disset. Mest. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Ponta Grossa, 2012.

MATTHEWS, K.R., R.J. HARMON, AND B.E. LANGLOIS.. **Prevalence of *Staphylococcus* species during the periparturient period in primiparous and multiparous cows.** J. Dairy Sci. 75:1835p, 1992.

MCDUGAL, L. K.; STEWARD, C. D.; KILLGORE, G. E.; CHAITRAM, J. M.; MCALLISTER, S. K., TENOVER, F. C. **Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database.** J. Clin. Microbiol. v.41, pp.5113–5120, 2003.

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.htm>. Acessado em 08/06/2013.

MCKENNEY, D., HÜBNER, J., MULLER, E., WANG, Y., GOLDMANN, D. A., & PIER, G. B.. **The *ica* locus of *Staphylococcus epidermidis* encodes production of the capsular polysaccharide/adhesin.** Infection and immunity.v. 66.n.2, p.4711-4720, 1998.

MELLENBERGER, R. **California Mastitis Test (CMT), an invaluable tool for managing mastitis**; Dept of Animal Sciences, Michigan State University. 2001.

MELO, D. A. **Implicações da utilização de parâmetros humanos na detecção do gene *mecA* em *Staphylococcus* spp. isolados de mastite bovina e seus impactos na predição da resistência aos beta-lactâmicos em ambientes de produção leiteira** . 66 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

MELO, P. C. **Estudo fenotípico e genotípico da produção de biofilmes por estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de casos de mastite subclínica bovina**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária – Medicina Veterinária Preventiva) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, p.103, 2008.

MIGUEL, P. R. R. **Incidência de contaminação no processo de obtenção do leite e suscetibilidade a agentes antimicrobianos**. Dissertação (Zootecnia). Universidade Estadual do Oeste do Paraná. 2010.

MIDDLETON, J.; FOX, L.; GAY, J.; TYLER, J.; BESSER T. **Use of pulsed-field gel electrophoresis for detecting differences in *Staphylococcus aureus* strain populations between dairy herds with different cattle importation practices**. *Epidemiol. Infect.* v.129, pp.387- 395, 2002.

MONTESINOS, I.; SALIDO, E.; DELGADO, T.; CUERVO, M.; SIERRA, A. **Epidemiologic genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed field gel electrophoresis at a University Hospital and comparison with antibiotyping and protein A and coagulase gene polymorphisms**. *J. Clin. Microbiol.* v.40,pp.2119-2125, 2002.

MONECKE, S., KUHNERT, P., HOTZEL, H., SLICKERS, P. & EHRICHT, R. **Microarray based study on virulence-associated genes and resistance determinants of *Staphylococcus aureus* isolates from cattle**. *Veterinary Microbiology*.v 12.5n.1-2,p.128-140, 2007.

MOODLEY A., NIELSEN S. S., GUARDABASSI L. **Effects of tetracycline and zinc on selection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) sequence type 398 in pigs**. *Vet. Microbiol.* V.152, p.420–423,2011.

MOON, J.S.; LEE, A.R.; KANG,H.M.; LEE, E.S.; KIM, M.N.; PAIK, Y.H.; PARK, Y.H.; JOO, Y.S.; KOO, H.S. **Phenotypic and Genetic Antibiogram of Methicillin-Resistant *Staphylococci* Isolated from Bovine Mastitis in Korea**. *Jouranl of Dairy Science.* v.90, pp.1176-1185, 2007.

MORONI P., PISONI G., ANTONINI M., VILLA R., BOETTCHER P. & CARLI S. Short Communication: **Antimicrobial Drug Susceptibility of *Staphylococcus aureus* from Subclínical Bovine Mastitis in Italy**. *J. Dairy Sci* .v. 89,p.2973–2976, 2006.

MOTA, R.A.; SILVA, K.P.C.; FREITAS, M.F.L.; PORTO, W, J.N.; SILVA, L.B.G. **The abuse of antimicrobials drugs and the appearance of resistance.** Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. v.42 n.6 São Paulo 2005.

MURAKAMI, K.W.; MINAMIDE, K.; WADA, W.; NAKAMURA, E.; TERAOKA, H.; WATANBE, S. **Identification of methicillin resistant strains of *staphylococci* by polymerase chain reaction.** Journal of Clinical Microbiology. v.29, pp.2240-2244, 1991.

MURCHAN, S., KAUFFMANN, M. E.; DEPLANO, A. ; DE RYCK, R.; STRUELENS, M.; OLSSON-LILJEQUIST, B.; RAMSJÖ, U.; COOMBES, G.; COOKSON, B. **Harmonization of pulsed field gel electrophoresis protocols for epidemiological typing of *Staphylococcus aureus*: a single approach developed by consensus in 10 European laboratories and its application for tracing the spread of related strains.** J. Clin. Microbiol. v.41, pp.1574-1585, 2003.

MUSSER, J. M., SCHLIEVERT, P. M., CHOW, A. W., EWAN, P., KREISWIRTH, B. N., ROSDAHL, V. T., NAIDU, A. S., WITTE, W. & SELANDER, R. K. **A single clone of *Staphylococcus aureus* causes the majority of cases of toxic shock syndrome.** P. Nat Acad Sci USA.v.87,n.1. p225-229,1990.

MØRETRØ T. & LANGSRUD S. ***Listeria monocytogenes*: biofilm formation and persistence in food-processing environments.** Biofilms, 1, pp 107-121 doi:10.1017/S1479050504001322, 2004.

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.** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. v.38 n.4 p.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.*** Arquivo do Instituto de Biologia de São Paulo.v.74, n.3, p.207-213, 2007.

NORM-VET 2005. **Usage of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in Norway.** 11 2006. Disponível em: http://www.vetinst.no/Arkiv/Zoonosesenteret/NORM_NORM-VET_2005.pdf. Acessado em: novembro de 2013.

OLIVE, D. M. & BEAN, P. **Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms.** J. Clin. Microbiol. v.37, pp.1661-1669, 1999.

OLIVEIRA, Júnior M.B. **Fatores de risco associados à mastite bovina na microrregião Garanhuns, Pernambuco.** Pesq. Vet. Bras. [online]. 2012, vol.32, n.5, pp. 391-395.

OLIVEIRA, L.G.L.; ALMEIDA, M.Z.P.R.B.; AFONSO, J.A.B.; LÁZARO, N.S.; MENDONÇA, C. L. **Aspectos clínico-epidemiológicos e etiológicos da mastite clínica em ovelhas da raça Santa Inês no agreste meridional do Estado de Pernambuco.** Archives of Veterinary Science, v.12, p.124-125, 2007. Suplemento. Resumo 088.

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.* V.31,n.2,p.104-110, 2011.

OLIVEIRA, J. M. B., VANDERLEI, D. R., BRANDESPIM, D. F., MOTA, R. A., JÚNIOR, J. W. P. **Análise do perfil de sensibilidade antimicrobiana de *staphylococcus spp.* isolados de vacas com mastite subclínica do agreste do Estado de Pernambuco.** *Vet. e Zootec.* V.18,n.4 Supl. 3): IX Congresso Brasileiro Buiatria. 04 a 07 de Outubro de 2011. Goiânia - Goiás, Brasil, 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.** *Ciênc. Anim. Bras.* v.10,n1:226-230, 2009.

OLIVEIRA, M., Bexiga, R., Nunes, S. F., Carneiro, C., Cavaco, L. M., Bernardo, F., & Vilela, C. L. **Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates.** *Veterinary microbiology.* v.118,n.1p, 133-140,2006.

OLIVEIRA, M.T. B. A. **Ambigüidade da extensão rural universitária e as acusações de técnicos.** *Rev.Econ. Sociol. Rural,* v.31, p.103-24, 1993.

OLIVEIRA, M. M. M. **Cinnamon essential oil and cinnamaldehyde in the control of bacterial biofilms formed on stainless steel surfaces.** *European Food Research and Technology, Berlin,* v. 234, n. 5, p. 821–832, 2012.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A AGRICULTURA E ALIMENTAÇÃO – **FAO. 2012. Agriculture.** Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/573/default.aspx#ancor>> Acesso em: 03, março 2014

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A AGRICULTURA E ALIMENTAÇÃO – **FAO. Crescimento da demanda internacional faz preço do leite dobrar nos últimos anos.** Notícias, 03 outubro. 2013. Disponível em: <<http://www.agrosoft.org.br/agropag/100756.htm>>. Acesso em: 12 jan. 2014.

OTE, I., Taminiou B., Duprez J.-N., Dizier I. & Mainil J.G. **Genotypic characterization by polymerase chain reaction of *Staphylococcus aureus* isolates associated with bovine mastitis.** *Vet. Microbiol,*v.153.p.285-292, 2011.

PANTOSTI, A. **Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with animals and its relevance to human health.** *Frontiers Microbiol,*v. 3,p.127, 2012.

PARIZZI, S. Q. F. **Adesão bacteriana em superfície de serviços de alimentação hospitalar avaliada pela microscopia de epifluorescência.** Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, p.57 ,1998.

PEDRINI, S. C. B. & MARGATHO, L. F. F. **Sensibilidade de microrganismos patogênicos isolados de casos de mastite clínica em bovinos frente a diferentes tipos de desinfetantes.** *Arquivos do Instituto Biológico,* v.70, n.4, p. 391-395, 2003.

PEIXOTO, R. M; MOTA, R. A; COSTA, M. M. da. **Mastite em pequenos ruminantes no Brasil.** Revista Pesquisa Veterinária Brasileira, v.30, n. 9, p. 754-762, 2010.

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.** 166 p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

PETERSON, L. R., Liesenfeld, O., Woods, C. W., Allen, S. D., Pombo, D., Patel, P. A., ... & Onderdonk, A. **Multicenter evaluation of the LightCycler methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) advanced test as a rapid method for detection of MRSA in nasal surveillance swab.** Journal of clinical microbiology, v.48,n. 5, p. 1661-1666, 2010.

PIGHETTI GM, P Morris, ML Riggle-Moxley, and ME Prado. ***Escherichia coli* isolates from clinical mastitis grow more rapidly in the presence of norepinephrine.** In: Proc Intl Dairy Fed Mastitis Conf. p.383, 2010.

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

PYORALA,S. & TAPONEN, S. **Coagulase-negative *staphylococci*: Emerging mastitis pathogens.** *Veterinary Microbiology*, Vol. 134, pp. 3-8, 2009.

PRESCOTT, M.L., HARLEY, J.P. AND KLEIN, D.A.**Procaryotic cell structure and function in Microbiology.** WCB (Wm. C. Brown Publishers). p 33-72, 1996.

PYORALA,S. & TAPONEN, S. **Coagulase-negative *staphylococci*: Emerging mastitis pathogens.** *Veterinary Microbiology*, V. n.134, pp. 3-8, 2009.

RABELLO R. F. **Multilocus sequence typing of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from cows with mastitis in Brazilian dairy herds.** J. Med. Microbiol,v.56,p.1505–1511, 2007.

RANGEL, P.M. **Perfil genético e microbiológico de cepas de *Escherichia coli* isoladas de leite mastítico bovino.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Jaboticabal, 2007.

RIBEIRO, M.G.; COSTA, E.O.; LEITE, D.S.; LANGONI, H.; GARINO JÚNIOR, F.; VICTORIA, C.; LISTONI, F.J.P. **Fatores de virulência em linhagens de *Escherichia coli* isoladas de mastite bovina.**Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. v.58, pp.724-731, 2006

RICKARD, A.H.; GILBERT, P.; HIGH, N.J.; KOLENBRANDER, P.E. & HANDLEY, P.S. **Bacterial coaggregation: an internal process in the development of multi-species biofilms.** Trends in Microbiology, v.11, nº.2, pp. 94-100(2003).

REINOSO, E.B.; EL-SAYED, A.; LÄMMLER, C.; BOGNI, C.; ZSCHÖCK M. **Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from humans, bovine subclinical mastitis and food samples in Argentina.** Microbiological Research. Vol. 163, pp. 314-322, 2006.

REINOSO E.B. **Análisis epidemiológico y molecular de cepas de *Staphylococcus aureus* de distintos orígenes.** Universidad Nacional de Rio Cuarto, Argentina. Tese de Doutorado, Instituto de Microbiologia, 2004.

RICE, L.; BONOMO, R. **Genetic and Biochemical mechanisms of bacterial.** In: Viclor Lorian, M. D. (Eds), Antibiotics in Laboratory Medicine. Nova Iorque. pp.441-476, 2005.

RISUEÑO, F. N.; CARDONA, E. M.; OTERO, B. M. **Lectura interpretada del antibiograma de enterobacterias.** Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, n.20, v.5, pp.225-234, 2002.

RIVERÓN, F. F.; HERNÁNDEZ, J. L.; MARTÍNEZ, L. M. P.; BETARTE, C. M. **Resistencia bacteriana.** Revista Cubana Medicina Militar, v. 32, n.1, p.44-48, 2003.

RODENBURG, J. **Mastitis Prevention for Dairy Cattle: Environmental Control.** 2009. Disponível em <<http://www.omafra.gov.on.ca/english/livestock/dairy/facts/90-104.htm>> Acessado em 29. Jan. 2013.

RODRÍGUEZ-LÁZARO, D.; LOMBARD, B.; SMITH, H.; RZEUZUTKA, A., D'AGOSTINO, M.; HELMUTH, R. **Trends in analytical methodology in food safety and quality: monitoring microorganisms and genetically modified organisms.** Trends in Food Science & Technology, v.18, n°6, pp.306-319, 2007.

ROSATO, A.E; KREISWIRTH, B.N; GRAIG, W.A.; EISNER, W.; CLIMO, M.W.; AECHER, G.L. ***mecA-BlaZ* corepressors in clinical *Staphylococcus aureus* isolates.** Antimicrobial Agents Chemotherapy. v.47, pp.1463-1466, 2003.

RUSSELL, A.D.; FURR, J.R.; MAILLARD J.Y. **Microbial susceptibility and resistance to biocides: an understanding.** ASM News. v.63, pp.481-487, 1997.

SAKOULAS, G.; GOLD, H. S.; VENKATARAMAN, L.; DEGIROLAMI, P. C.; ELIOPOULOS, G.M.; QUIAN, Q. **Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: comparison of susceptibility testing methods and analysis of *mecA*-positive susceptible strains.** J Clin Microbiol, v.39, p.3946-3951, 2001.

SALUSTIANO, V. C. **Isolamento, ribotipagem e controle de *Bacillus cereus* após a pasteurização do leite.** 75 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular Cloning: a laboratory manual.** 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, Press, 2002.

SABOUR, P.M.; GILL, J.J.; LEPP, D. **Molecular Typing and Distribution of *Staphylococcus aureus* Isolates in Eastern Canadian Dairy Herds.** J. Clin. Microbiol., v.42, p.3449-3455, 2004.

SANGALETTI, N.; PORTO, E.; BRAZACA, S.G.C.; YAGASAKI, C.A.; DALLA D.E.A.; SILVA, M.V. **Estudo da vida útil de queijo minas**. Ciência e Tecnologia de Alimentos v.29, pp.262-269, 2009.

SANTIAGO, G.S. **Caracterização da resistência antimicrobiana e estudo fenogenotípico da produção de betalactamases em enterobactérias associadas à etiologia da mastite bovina**. 82 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária. Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

SANTINI, G. A., PEDRA, D. F. B. M., PIGATTO, G.. **Internacionalização do Setor Lácteo: A Busca pela Consolidação**. Anais do 47^o Congresso da *Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural*. Disponível no link: <http://www.sober.org.br/palestra/13/831.pdf>. Acesso em 06 de julho de 2012.

SANTOS, L. M. M. **Mastite caprina: etiologia e influência na qualidade do leite**. Rio de Janeiro: Universidade Castelo Branco, 2009. 52p. Dissertação de Mestrado.

SANTOS, O.C.; BARROS, S.P.; ROSSI, E.M.; BRITO, M. A.V.P.; BASTOS, M. C.F.; SANTOS, K. R.N.& GIAMBIAGI-DE MARVAL, M. **Identification of coagulase –negative Staphylococci from bovine mastites using RFLP-PCR of de *groEL* gene**. Vet. Microbiol. P.130-140,2008.

SANTOS, F.G.B.; MOTA, R.A.; SILVEIRA FILHO, V.M.; SOUZA, H.M.; OLIVEIRA, M.B.M.; JOHNER, J.M.Q.; LEAL, N.A.; ALMEIDA, A.M.P.; LEAL-BALBINO, T.C. **Tipagem molecular de S. aureus isolados do leite de vacas com mastite subclínica e equipamentos de ordenha procedentes do estado de Pernambuco**. Napgama, v.6, n.1, p.19-23, 2003

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

SANTOS, J.L. 2003. Disponível em <<http://pt.engormix.com/MA-pecuaria-corte/administracao/artigos/qualidade-da-agua-pecuaria-de-leite-t361/124-p0.htm>> Acesso: 31 nov. 2013.

SASAKI, T.; TSUBAKISHITA, S.; TANAKA, Y. **Multiplex –PCR method for species indetification of coagulase – positive *Staphylococci***. Journal of Clínicl Microbiology, London, v.48, n. 3, p. 765 – 769, 2010.

SASAKI, T., K. KIKUCHI, Y. TANAKA, N. TAKAHASHI, S. KAMATA, AND K. HIRAMATSU. **Reclassification of phenotypically identified *Staphylococcus intermedius* strains**. *J. Clin. Microbiol.* V.45:p.2770–2778, 2007.

SAUER, K. ;CAMPER, A.K. ;EHRlich, G.D. ;COSTERTON, J.W DAVIES, D.G. ***Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm**. Journal of Bacteriology, v.184, pp. 1140–1154, 2002.

SAULNIER, P., BOURNEIX, C., PREVOST, G. & ANDREMONT, A. **Random amplified polymorphic DNA assay is less discriminant than pulsed-field gel electrophoresis for typing strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** J Clin Microbiol v.31, p.982–985, 1993.

SENNA, K. M. S. **Conhecimentos, atitudes e práticas dos profissionais de saúde relacionados à higiene de mãos.** Dissert. Mestrado. Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010. 106p.

SILVA, V. A. de M. da; RIVAS, P. M.; ZANELA, M. B.; PINTO, A. T.; RIBEIRO, M. E. R.; SILVA, F. F. P.; MACHADO, M. **Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica do leite cru, do leite pasteurizado tipo a e de pontos de contaminação de uma granja leiteira no RS.** Acta Scientiae Veterinariae, Porto Alegre, v. 38, n. 1, p. 51-57, 2010.

SILVA, C. C.; VARGAS, C. G.; LUND, R. G.; LADEIRA, S.; GONZALES, H. de L.; NASCENTE, P. da S. **Suscetibilidade *in vitro* de bactérias causadoras de mastite frente a antimicrobianos.** 2008. Disponível em <http://www.ufpel.edu.br/cic/2008/cd/pages/pdf/CA/CA_00928.pdf> Acessado em 26 de janeiro de 2014.

SILVA, B.N.; BASSO, D. **A produção de leite como estratégia de desenvolvimento para o Rio Grande do Sul. Desenvolvimento em questão.** Revista do Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento. Ijuí: Ed. Unijuí, , ano 3, n. 5.p. 53-72, 2005.

SIMÕES, M. **Control of flow-generated biofilms using surfactants: evidence of resistance and recovery.** Food and Bioproducts Processing, Rugby, v. 84, n. 4, p. 338-345, 2006.

SCHROEDER, J.W. **Bovine Mastitis and Milking Management. Mastitis Control Programs,** pp: 3-16, 2012.

SCHUENCK RP, NOUÉR SA, DE OLIVEIRA WINTER C, CAVALCANTE FS, SCOTTI TD, FERREIRA ALP, GIAMBIAGI-DE MARVAL M, NETTO DOS SANTOS KR. **Polyclonal presence of non-multiresistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates carrying SCCmec IV in health care-associated infections in a hospital in Rio de Janeiro, Brazil.** Diagn. Microbiol. Infect. Dis. v.64 pp.434–441, 2009 .

SEABROOK, M.F.; WILKINSON, J.M. **Stockpersons' attitudes to the husbandry of dairy cows.** Veterinary Record, v.147, p.157,160, 2000.

SILVA, W.P., SILVA; A.J., MACEDO, M.R.P., ARAÚJO, M.R., MATA, M.M.; GANDRA, E.A. **Identification of *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius* and *S. hyicus* by Pcr amplification of *coa* and *nuc* genes.** Brazilian Journal of Microbiology. v.34 (Suppl.1) p.125-127, 2003

SILVEIRA, J. B. **Investigação de *Escherichia coli* O157:H7 em Carne Moida no Estado do Rio Grande do Sul.** Disponível em <<http://hdl.handle.net/10183/24802>> Acessado em 31 de julho de 2013.

SHORE AC, DEASY EC, SLICKERS P, BRENNAN G, O'CONNELL B, **Detection of staphylococcal cassette chromosome mec type XI encoding highly divergent *mecA*, *mecI*,**

mecR1, blaZ and ccr genes in human clinical clonal complex 130 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 55: 3765–73, 2011.

SIDHU, M.S; HEIR, E.; LEEGAARD, T.; WIGER, K. HOLCK, A. **Frequency of disinfectant resistance genes and genetic linkage with beta-lactamase transposon Tn552 among clinical staphylococci Antimicrob. Agents Chemother., v.46 , pp. 2797–2803, 2002.**

SIMOJOKI H, HYVÖNEN P, FERRER CP, TAPONEN S, PYÖRÄLÄ S. **Is the biofilm formation and slime producing ability of coagulase-negative staphylococci associated with the persistence and severity of intramammary infection? Vet Microbiol 158:344–352, 2012.**

SMYTH, D. S., FEIL, E. J., MEANEY, W. J., HARTIGAN, P. J., TOLLERSRUD, T., FITZGERALD, J. R., ENRIGHT, M. C. & SMYTH, C. J. **Molecular genetic typing reveals further insights into the diversity of animal-associated *Staphylococcus aureus*. J Med Microbiol v.58, n.10, p. 1343-1353, 2009.**

SNEATH, P. H. A., AND R. R. SOKAL. . **Taxonomic structure**, p.188–308. In Numerical taxonomy. W. H. Freeman & Co., San Francisco, Calif., 1973

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.Ciência Rural.Vol. 38, No. 5, pp. 1346-1350, 2008.**

SOARES, L. C. **Correlação entre marcadores fenotípicos e genotípicos de virulência e resistência à oxacilina em *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos isolados a partir de mastite bovina.** 82 p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária. Departamento de Parasitologia Animal, UFRRJ, Seropédica, RJ, 2010.

SOL, J. **Factors associated with cure after therapy of clinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus*. Journal of Dairy Science, Netherlands, v. 83(2): 278-284, 2000.**

SOMMERHAUSER, J.; KLOPPERT, B.; WOLTER, W.; ZSCHOCK, M.; SOBIRAJ, A.; FAILING, K. **The epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections from subclinical mastitis in dairy cows during a control programme**, Veterinary Microbiology, Maryland Heights, v. 96, n. 1, p. 91-102, 2003.

SOUSA JR, M.A.; FERREIRA, E.S.; CONCEIÇÃO, G.C.**Betalactamases de espectro ampliado: um importante mecanismo de resistência bacteriana no laboratório clínico.** Newslab. V.63, p.152-174, 2004.

SOUZA, M. M. S., COELHO, S. M. O., PEREIRA, I. A., SOARES, L. C., PRIBUL, B. R., COELHO, I. S. **Antibiotic resistance in *Staphylococcus* species of animal origin. Antibiotic Resistance, 2012, in press.**

SOUSA, M.R.P., RISTOW, A.M., NOGUEIRA, E.B., FILHO, R.A.T. CORTEZ, M.A.S. **Caracterização de Pequenas Unidades Produtoras de Leite na região Centro e Noroeste do estado do Rio de Janeiro.** Ciencia Veterinária v.18, n. 2/3, p.79-89.

SPOOR LE, MCADAM PR, WEINERT LA, RAMBAUT A, HASMAN H. **Livestock Origin for a Human Pandemic Clone of Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus***. MBio 4., 2013.

STEIN, R. A. **Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* – the new zoonosis**. Int.J.Infect. Dis.v.13, pp.299-301, 2009.

STRAUB, J.A.; HERTEL, C.; HAMMES, W.P. **A 23S RNAr-targeted polymerase chain reaction-based system for detection of *Staphylococcus aureus* in meat started cultures and dairy products**. J. Food Prot., v.62, pp.1150-1156, 1999.

STRUELENS, M.J., HAWKEY, P.M., FRENCH, G.L., WITTE, W., TACCONELLI, E. **Laboratory tools and strategies for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* screening, surveillance and typing: state of the art and unmet needs**. Clin Microbiol Infect v.15, p.112-119, 2009.

SUNG, J. M. L., LLOYD, D. H. & LINDSAY, J. A. ***Staphylococcus aureus* host specificity: comparative genomics of human versus animal isolates by multistrain microarray**. Microbiology v.154, n.7, p.1949-1959, 2008.

SWARTZ, H.A. **Mastitis in ewe**. Disponível em <http://www.Case-agworld.com.caw.l.usmat>. Acessado em 02/02/2001

TAPONEN, S., SIMOJOKI, H., HAVERI, M., LARSEN, H.D., PYORALA, S. **Clínical characteristics and persistence of bovine mastitis caused by different species of coagulase-negative staphylococci identified with API or AFLP**. Vet. Microbiol. V.115, p.199-207, 2006.

TAPONEN, S. & PYÖRÄLÄ, S. **Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis—Not so different from *Staphylococcus aureus***. Veterinary microbiology, v.134, n.1, p.29-36, 2009.

TAPONEN, S., SUPRÉ, K., PIESSENS, V., VAN COILLIE, E., DE VliegHER, S., KOORT, J. ***Staphylococcus agnetis* sp. nov., a coagulase-variable species from bovine subclínical and mild clínical mastitis**. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. v.62,p.61-65, 2012.

TENHAGEN, B. A., G. KOSTER, J. WALLMANN, W. HEUWIESER **Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Bandenburg, Germany**. J. Dairy Sci. v.89, p.2542-2551, 2006.

TENOVER, F. C.; ARBEIT, G.; ARCHER, J.; BIDDLE, S.; BYRNE, R.; GOERING, G.; HANCOCK, G. A.; HÉBERT, B.; HILL, R. **Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus***. J. Clin. Microbiol. v.32, pp.407–415,1994.

THORBERG, B-M. **Coagulase-Negative Staphylococci in Bovine Sub-Clínical Mastitis. Licentiate Thesis Department of Biomedical Sciences and Veterinary Public Health Swedish University of Agricultural Sciences Report no. 2 Uppsala., pp: 7-20, 2008.**

THORBERG, B.M.; KUHN, I.; AARESTRUP, F.M.; BRANDSTROM, B.; JONSOON, P.; NIELSSON-THAM, M.L. **Pheno-and genotyping of Staphylococcus epidermidis isolated from bovine milk and human skin.** Vet Microbiol. V.115, p. 163-172, 2006.

TIRADO, C.; SCHIMDT, K. WHO. **Surveillance programme for control of food-borne infections and intoxications: preliminary results and trends across greater.** Europe Journal of Infection, v. 43, n. 1, p. 80-84, 2001.

TRINIDAD, P., S. C. NICKERSON, AND T. K. ALLEY. **Prevalence of intramammary infection and teat canal colonization in unbred and primigravid dairy heifers.** Journal of Dairy Science. v.73, n.1, p.107-114, 1990.

UHLEMANN AC. **Identification of a highly transmissible animal-independent Staphylococcus aureus ST398 clone with distinct genomic and cell adhesion properties.** mBio v.3, p.27–32.2012.

VAN HOOVELS, L., A. VANKEERBERGHEN, A. BOEL, K. VAN VAERENBERGH, AND H. DE BEENHOUWER. **First case of Staphylococcus pseudintermedius infection in a human.** J. Clin. Microbiol. V.44, p.4609–4612, 2006.

VAN BELKUM, A.; VAN LEEUWEN, W.; KAUFMANN, M. E.; COOKSON, B.; FOREY, F.; ETIENNE, J.; GOERING, R.; TENOVER, F.; STEWARD, C.; O'BRIEN, F. **Assessment of resolution and intercenter reproducibility of results of genotyping Staphylococcus aureus by pulsed-field gel electrophoresis of SmaI macrorestriction fragments: a multicenter study.** J. Clin. Microbiol. v.36, pp.1653–1659, 1998.

VASUDEVAN, P.; NAIR, M. K. M.; ANNAMALAI, T.; VENKITANARAYANAN, K. S. **Phenotypic and Genotypic characterization of bovine mastitis isolates of Staphylococcus aureus for biofilm formation.** Veterinary Microbiology, Geneva, v. 92, p. 179-185, 2003.

VAZ, A.K.; PATERNO, M.R. e MARCA, A. **Avaliação da vacina estafilocócica como auxílio à antibioticoterapia de mastite subclínica durante a lactação.** A Hora Veterinária. 21: 68-70, 2001.

VEIGA, V. M. O. **Diagnostico da mastite bovina,** EMBRAPA – CNPGL: Juiz de Fora, 24 p., 2005.

VIGUIER, C., S. ARORA, N. GILMARTIN, K. WELBECK AND R. O'KENNEDY, **Mastitis detection. current trends and future perspectives.** Trend. Biotechnol., v.27, n.8, p. 486-493, 2009.

WATTIAUX, M. A. **Development The Babcock Institute for International Dairy Research.** 2000 Disponível em <http://babcock.cals.wisc.edu/downloads/de_html/ch23_pt.html> acesso 20/06/2012.

WATTIAUX. M. A. **Mastitis: The disease and its transmission.** Babcock Institute International Dairy research and Development UW-Madison, Wisconsin. 1996, disponível em: <http://babcock.cals.wisc.edu/downloads/de/23.em.pdf>

WILSON, D. J., Y. T. GRÖHN, G. J. BENNETT, R. N. GONZÁLEZ, Y. H. SCHUKKEN, AND J. SPATZ. **Comparison of J5 vaccinates and controls for incidence, etiologic agent, clinical severity, and survival in the herd following naturally occurring cases of clinical mastitis.** J. Dairy Sci. v.90p.4282–4288, 2007.

WILSON, D. J., R. N. GONZALES, AND H. H. D. **Bovine mastitis pathogens in New York and Pennsylvania: Prevalence and effects on somatic cell count and milk production.** J. Dairy Sci. v.80, p.2592–2598, 1997.

WOLF J., WOLFOVÁ M., ŠTÍPKOVÁ M. **A model for the genetic evaluation of number of clinical mastitis cases per lactation in Czech Holstein cows.** Journal of Dairy Science, v.93, p.1193–1204, 2010.

WYLLIE, D. H., WALKER, A. S., MILLER, R., MOORE, C., WILLIAMSON, S. R., SCHLACKOW, I., ... & CROOK, D. W. **Decline of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Oxfordshire hospitals is strain-specific and preceded infection-control intensification.** BMJ open, v.1, n.1, 2011

YAMAMURA, A. A.; MÜLLER, E. E., FREIRE, R. R. **Fatores de risco associados à mastite bovina causada por *Prototheca zopfii*.** Ciência Rural, v.38, n.3, p.755-766, 2008.

YOUSAF M, **Evaluation of some non-antibiotic antibacterials in the treatment of bubaline mastitis.** PhD Thesis, Deptt Clinical Medicine and Surgery, Univ Agri, Faisalabad, Pakistan, 2009.

ZADOKS, R.N., MIDLLTON, J.R., MCDUGALL.,S., KATHOLM,J., SCHUKKEN,Y.H. **Molecular Epidemiology Mastists Pathogens of Dairy Cattle and Comparative Relevance to Humans.** J Mammari Gland Biomol Neoplasia, v.16, p.357-372, 2011.

ZADOKS, R. N.; VAN LEEUWEN, W. B.; KREFT, D.; FOX, L. K.; BARKEMA, H. W.; SCHUKKEN, Y. H.; VAN BELKUM, A. **Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine and human skin, milking-equipment, and bovine milk by phage typing, pulsed-field gel electrophoresis, and binary typing.** J. Clin. Microbiol. v.40, pp.3894-3902, 2002.

ZADOKS, R.; VAN LEEUWEN, W.; BARKEMA, H.; SAMPIMON, O.; VERBRUGH, H.; SCHUKKEN, Y. H.; VAN BELKUM, A. **Application of pulsed-field gel electrophoresis and binary typing as tools in veterinary clinical microbiology and molecular epidemiologic analysis of bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates.** J. Clin. Microbiol. v.38, pp.1931-1939, 2000.

ZAFALON, L.F.; POZZI, C.R.; CAMPOS, F.P.; ARCARO, J.R.P.; SARMENTO, P.; MATARAZZO, S.V. **Boas Práticas de Ordenha. Cartilha Da Embrapa, São Paulo.** www.cppse.embrapa.br/servicos/publicacao gratuita/documentosqDocumentos78.pdf.view>.2008. Acessado em 10/06/2012.

ZAFALON L.F., ARCARO J.R.P., NADER FILHO A., FERREIRA L.M., CASTELANI L. & BENVENUTTO F. **Investigação de perfis de resistência aos antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados na ordenha de vacas em lactação.** Revta Inst. Adolfo Lutz v.67, n.2,p.118-125, 2008

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

ZHANG, K.; SPARLING, J.; CHOW, B.L.; ELSAYED, S.; HUSSAIN, Z.; CHURCH, D.L.; GREGSON, D.B.; LOUIE, T.; CONLY, J.M. **New Quadriplex PCR Assay for Detection of Methicillin and Mupirocin Resistance and Simultaneous Discrimination of *Staphylococcus aureus* from Coagulase-Negative Staphylococci.** Journal of clinical microbiology, v.42,nº11,pp.4947–4955, 2004.

ZIEBUHR, W., HEILMANN, C., GÖTZ, F., MEYER, P., WILMS, K., STRAUBE, E., HACKER, J. **Detection of the intercellular adhesin gene cluster (ica) and phase variation in *Staphylococcus epidermidis* blood culture strains and mucosal isolates.** Infect Immun v.65, p, 890–896, 1997.

ZOCAL, R.; SOUZA, A. D.; GOMES, A. T.; LEITE, J. L. B. **Produção de leite na agricultura familiar.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL, 42, 2004b, Cuiabá. Anais eletrônicos. Cuiabá: SOBER. Disponível em: <<http://www.sober.org.br/palestra/12/09O433.pdf>>. Acesso em: 20 ago. 2010

9.ANEXOS

Anexo 1 - Instrumento Diagnóstico dos principais fatores de riscos extrínsecos para mastite bovina.

Fazenda:

Limpeza e higiene no ambiente de ordenha	0	1	2
Limpeza do curral			
Bebedouros limpos			
Limpeza da sala de espera			
Limpeza e higiene da sala de ordenha			
Limpeza e higienização das teteiras entre ordenhas			
Limpeza e armazenamento dos utensílios utilizados na ordenha de forma adequada			
É realizada a manutenção dos equipamentos de ordenha			
Controle de vetores e pragas			
Presença de outros animais em alguma dessas instalações			
Manejo de ordenha			
Conforto ambiental (sombra, disponibilidade de água, acessibilidade dos piquetes)			
Encaminhamento adequado dos animais para ordenha			
Vacas tranquilas durante a ordenha			
Realiza teste da caneca telada			
Realiza pré e pós dipping			
Tetos dos animais limpos			
Presença de bezerro ao pé			
Tempo de ordenha entre 5-6 minutos			
Os animais são mantidos de pé por aproximadamente 1 hora após a ordenha			
Realização da lavagem dos tetos			
Práticas e higiene do ordenhador na linha de ordenha			
Os ordenhadores realizam a lavagem e higienização das mãos			
Os ordenhadores utilizam luvas			
Os ordenhadores trocam de luvas sempre que necessário			
Os ordenhadores utilizam indumentária adequada			
Os ordenhadores apresentam unhas, barbas e cabelos aparados			
Os ordenhadores tosem, cospem, fumam e conversam durante a ordenha			
Os ordenhadores desempenham outras funções além da ordenha			
Os ordenhadores sabem da importância da realização das boas práticas de ordenha			
O ordenhador recebe capacitação periodicamente			
Os ordenhadores apresentam ferimentos nas mãos			

Legenda das variáveis: (0) Ações não realizadas; (1) Ações realizadas de forma inadequada; (2) ações realizadas de forma satisfatória e (NA) Não aplicável.

Anexo 2 - Antibiotipos de resistencia aos antimicrobianos dos *Staphylococcus* spp. isolados da linha de ordenha.

Antibiotipos	Resistência aos antimicrobianos	Espécies (%)				
		ECN (71)	ECP (7)	<i>S.aureus</i> (22)	<i>S.inter</i> (0)	ECP (SIG) (0)
1	*	4	1	1	-	-
2	TET,GEN,ENO, CFL, AMP,PEN, SUT	11	-	4	-	-
3	AMP,PEN	2	-	2	-	-
4	TET, AMP,PEN	6	-	1	-	-
5	AMP,PEN, SUT	2	-	-	-	-
6	TET	2	-	-	-	-
7	TET,GEN,CFL, AMP,PEN, SUT	4	-	1	-	-
8	CFL, AMP,PEN	5	1	2	-	-
9	TET,GEN,ENO, CFL, AMP,PEN	6	-	2	-	-
10	TET,CFL, AMP,PEN	2	-	1	-	-
11	TET, AMP	1	-	-	-	-
12	TET,GEN,AMP,PEN, SUT	2		1		
13	ENO, AMP,PEN	2	-	-	-	-
14	TET,CFL, AMP,PEN, SUT	3	-	-	-	-
15	TET,CFL, PEN, SUT	1	-	-	-	-
16	TET, PEN	-	1	-	-	-
17	TET, PEN, SUT	-	1	-	-	-
18	CFL, AMP,PEN, SUT	1	-	1	-	-
19	TET,GEN, AMP,PEN	1	-	3	-	-
20	GEN, AMP,PEN	1		1		
21	GEN CFL, AMP,PEN	1	-	-	-	-
22	TET,ENO,CFL, AMP,PEN, SUT	1	-	-	-	-
23	TET,GEN,ENO, AMP,PEN, SUT	-	-	1	-	-
24	ENO,CFL, AMP,PEN	6	1		-	-
25	ENO, CFL, AMP, PEN, SUT	2	-	-	-	-
26	TET,GEN,SUT	1	1	-	-	-
27	GEN,PEN, SUT	1	-	-	-	-
28	GEN,AMP,PEN, SUT	1	-	-	-	-
29	TET,ENO,CFL,AMP,PEN	-	1	1	-	-
30	TET,GEN,PEN,SUT	1	-	-	-	-
31	TET,AMP,PEN,SUT	1	-	-	-	-

Anexo 3 - Percentuais das espécies isoladas do leite de vacas com mastite clínica e subclínica.

Bactérias	Mastite Clínica (%)	Mastite Subclínica (%)	Total no. (%)
ECN	20% (n=30)	80% (n=115)	145
ECP	27,4%(n=14)	70,5 (n=35)	49
<i>S.aureus</i>	26,3%(n=10)	73,6% (n=28)	38
<i>S.intermedius</i>	25%(n=3)	75% (n=9)	12
SIG	0	100% (n=4)	4
<i>P. mirabilis</i>	36,9% (n=7)	63,1% (n=12)	19
<i>E.coli</i>	28,5% (n=4)	71,4% (n=10)	14
<i>S. rubidaea</i>	-*	100% (n=1)	1
<i>S. marsenscens</i>	-	100% (n=2)	2
<i>C. freundii</i>	100% (n=2)	-	2
<i>E. aerogenes</i>	100% (n=1)	-	1
Total	100% (n=71)	100% (n=216)	100% (n=287)

* Não foi detectado

Anexo 4 - Padrões eletroforéticos do DNA cromossômico de *S.aureus* do leite clivado com *SmaI* em gel de agarose 0,8% após eletroforese em campo pulsado.

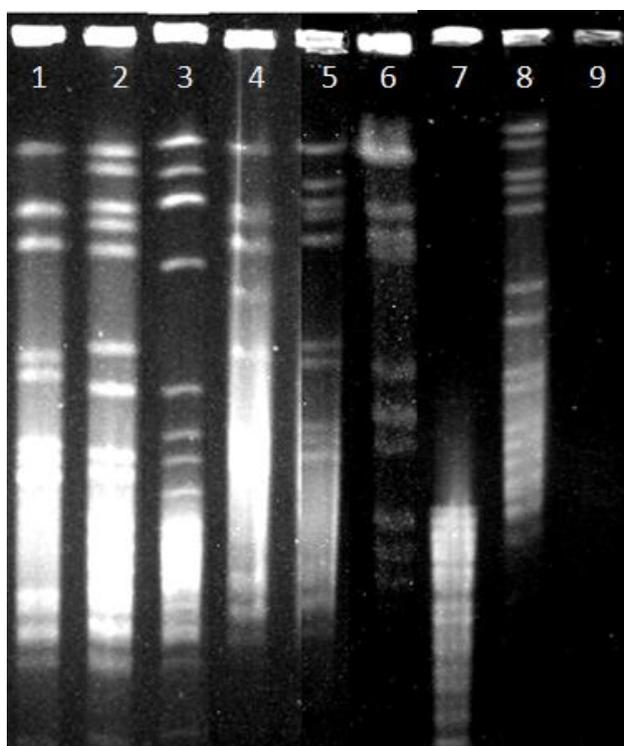


Figura I: Padrões eletroforéticos do DNA cromossômico de *S.aureus* do leite clivado com *SmaI* em gel de agarose 0,8% após eletroforese em campo pulsado. Isolados

classificados em distintos perfis: 1 (C); 2 (D); 3 (E); 4 (B); 5 (F); 6 (A); 7 (perfil tipo rastro); 8 (D); 9: isolado não cortado pela enzima *SmaI*.

Anexo 5 - Padrões eletroforéticos do DNA cromossômico de *Staphylococcus* spp. da linha de ordenha clivado com *SmaI* em gel de agarose 0,8% após eletroforese em campo pulsado.

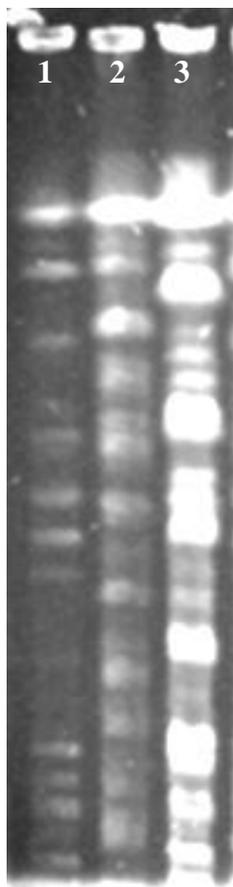


Figura II: Padrão eletroforético do DNA cromossômico de *Staphylococcus* spp. da linha de ordenha clivado com *SmaI* em gel de agarose 0,8% após eletroforese em campo pulsado. Isolados classificados em distintos perfis: 1 (A); 2 (B); 3 (C);.

Anexo 6 - Mini manual de bolso contendo orientações sobre práticas adequadas de manejo de ordenha.



Com o propósito de orientar os ordenhadores de forma clara e prática, elaboramos esta cartilha para que ela sirva de instrumento útil na realização das atividades diárias relacionadas à ordenha.

O que é Mastite Bovina ou Mamite?

A mastite bovina, também popularmente conhecida como mamite, é a infecção da glândula mamária (tetos) que pode ser causada por bactérias e outros microrganismos e resulta na diminuição do leite e na perda da sua qualidade.

Para prevenir esta doença é recomendada uma série de medidas simples e de baixo custo que podem ser eficazes no seu combate. Estas medidas dependem em grande parte de mudanças nas atitudes das pessoas que trabalham direta ou indiretamente com os animais.



Muitas pessoas acreditam que quanto mais moderna é a propriedade, menos casos de mastite são observados. No entanto, se os critérios de higiene com os animais, com o ambiente de ordenha e do ordenhador não forem feitos corretamente de nada adiantará.

Além das questões relacionadas à higiene, outro fator que dificulta a eliminação da mastite é o uso incorreto de antibióticos, tanto na prevenção quanto no tratamento desta infecção.

A utilização de antibióticos deve ser realizada de forma cautelosa, pois algumas bactérias podem desenvolver a capacidade de resistir aos antibióticos utilizados e ainda transmitir essa capacidade de resistência para outras bactérias. É por isso que alguns antibióticos não funcionam depois de algum tempo de utilização, e ainda podem deixar resíduos no leite, o que prejudica a saúde do consumidor.

• **Limpeza e higienização inadequadas dos utensílios e equipamentos de ordenha.** Estes devem ser lavados e higienizados adequadamente para remover todo resíduo de leite. O armazenamento dos equipamentos e dos utensílios são importantes para boa manutenção dos mesmos.



• **Falta de higiene pessoal do ordenhador.** O indivíduo que atua na linha de ordenha deve apresentar-se asseadamente: roupas adequadas e limpas, mãos higienizadas (não apenas lavadas), cabelos e barbas aparadas, não pode passar as mãos no rosto, nariz e nas roupas enquanto está ordenhando. Um dos cuidados mais importantes que devem ser adotados para prevenir a transmissão de bactérias é a higienização adequada das mãos. Se as mãos forem secas em panos sujos ou nas roupas do ordenhador não irá adiantar ter sido lavada de forma correta.



• **Falta de higiene com os animais.** Devem estar limpos, não estar enlameados, cauda tosquiada e tetos limpos, sem resíduos de matéria orgânica (esterco, capim e areia).

• **Falta de cuidados com os animais.** Quando os animais são encaminhados para o ambiente de ordenha de forma agressiva (gritos, varadas e empurrões) ficam estressados, provocando diminuição da saída do leite e aumento da defecação no momento da ordenha.



Para evitar que isto aconteça, deve-se fazer uma análise do leite para identificar a bactéria que está causando a mastite e qual antibiótico recomendado para o tratamento.

Agindo assim, o responsável pelo rebanho estará garantindo a saúde dos animais, melhor qualidade do leite e da saúde da população.

Principais fatores que causam a mastite:

• **Sujeiras no ambiente de ordenha.** A sala de ordenha precisa ser limpa e higienizada, quer dizer, não basta remover a sujeira, é necessário utilizar soluções desinfetantes em concentrações adequadas a este tipo de ambiente, como por exemplo: solução clorada, etc... encontradas nas lojas de produtos agropecuários.



Como deve ser feito o preparo das vacas para ordenha?

a. Limpeza dos tetos: Nos casos em que os tetos estão muito sujos deve-se proceder a lavagem dos tetos antes da realização do pré-dipping. Os jatos de água deve ser direcionados para o teto do animal evitando molhar o úbere, pois a água suja pode escorrer contaminando o teto, a teteira e o leite.



b. Teste da caneca de fundo preto: Tire três jatos de leite de cada um dos tetos e cheque cuidadosamente se há alguma alteração no leite retirado de cada teto como grumos ou pus e se há presença de sangue ou alteração da coloração. A caneca deve ser limpa antes de ser utilizada em outro animal. Caso seja detectada mastite clínica deve-se identificar o animal e aloca-lo na devida ordem da linha de ordenha e comunicar.



c. Teste da mastite subclínica ou CMT: Deve-se coletar o leite em raquetes próprias, em seguida inclinar a raquete até a marca indicada na parte inferior (aproximadamente 2ml) realizando movimentos circulares para misturar o leite com o CMT. Então fazer a leitura do teste, considerando o grau de aglutinação do leite da seguinte forma:

Grau do CMT	Reações observadas na mistura do leite com o CMT
Negativo	Não há formação de gel quando o leite é misturado com o CMT

Traço (falso positivo)	Formação rápida de gel e desaparecimento rapidamente sem alterar a consistência da solução
Fracamente positivo (+)	Formação de gel
Positivo (+ +)	Formação de gel e alterações na consistência da solução
Fortemente positivo	Há a formação de forte gel na solução e alterações de da consistência da solução

Como fazer a aplicação do pré-dipping?

O pré-dipping deve ser realizado em todas as vacas que estão na linha de ordenha mesmo as que estão com mastite.

A aplicação da solução desinfetante é iniciada dos tetos mais distantes para os mais próximos, os tetos devem ser totalmente cobertos com a solução desinfetante durante 30 minutos, podendo esta ser solução de



iodo (0,25%), clorexidine (de 0,25 a 0,5%) ou ainda cloro (0,2%).

A remoção da solução desinfetante deve ser feita com papel toalha, encostando a ponta do teto no papel toalha e removendo a solução de cima para baixo. É importante evitar tocar os tetos com as mãos.

Mecânica: as teteiras devem ser acopladas bem ajustada para evitar a entrada de ar. O vácuo deve ser desligado para remoção das teteiras.

Quais são as funções do Ordenhador?

- a. Cumprimento dos horários de ordenha;
- b. Preparação do ambiente de ordenha: checar se os recipientes estão abastecidos com soluções desinfetantes, se as instalações estão limpas e desinfetadas adequadamente e se os equipamentos estão limpos e desinfetados para serem utilizados;
- c. Atenção à lavagem e desinfecção das mãos para realização da ordenha e vestimenta adequada e limpa;
- d. Monitoramento do ambiente, restringindo o fluxo de pessoas e animais (cachorro, gatos galinhas etc) que

possam trazer riscos de contaminação para os animais, os utensílios e o leite;

- e. Paciência e critério na execução de todas essas funções, com plena consciência da importância do seu trabalho.

Como fazer a organização das vacas para ordenha?

Formação da linha de ordenha: As vacas devem ser ordenadas de acordo com o diagnóstico da mastite para prevenir a transmissão para outros animais sendo esquamizada da seguinte forma:

- | | |
|---------------------------------------|---------------------------------|
| 1- Vacas de primeira cria sem mastite | curadas da mastite |
| 2- Vacas que nunca tiveram mastite | 4- Vacas com mastite subclínica |
| 3- Vacas que já foram | 5- Vacas com mastite clínica |

- Oferta de alimento para os animais após a ordenha para que eles permaneçam de pé, evitando a entrada de bactérias pelo orifício do teto que permanece aberto por 1 hora após a ordenha;
- Limpeza e desinfecção da sala de ordenha.

Quais são as ações após a ordenha?

- Realização do pós-dipping, certificando-se de que a solução desinfetante está cobrindo todo o teto;
- Encaminhamento dos animais calmamente até os comedouros;

Finalização

Este trabalho foi desenvolvido com base em observações feitas em várias propriedades leiteiras que abriram suas porteiras para realização desta pesquisa.

As propriedades visitadas eram de produção familiar e

outras produtoras em larga escala.

Foi possível observar que as propriedades que utilizavam a produção tecnificada, apresentavam altos percentuais de animais mastíticos, enquanto que, propriedades com estrutura pequena, mas que realizavam todo o procedimento recomendado para a prevenção da mastite, apresentavam baixos percentuais desta infecção.

Acreditamos que juntos, chegaremos ao principal objetivo que é o de promover a saúde pública e dos animais.

Participação e agradecimentos

Contamos com vocês, ordenhadores e fazendeiros, para

realizarmos essas ações com dedicação e cuidado, não somente nos 12 meses do ano, mas para toda uma vida!

A equipe.....coordenada por Tatiana, agradece também a colaboração das entidades para tal pesquisa e trabalho realizado:

- Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo – auxílio na Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), apoio e contemplação deste projeto;
- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ);
- Laboratório de Bacteriologia da UFRRJ - realização das análises

Anexo 7. Carta de aceite do artigo “Aspectos das condições higiênico-sanitárias em unidades leiteiras em municípios do Rio de Janeiro e análise dos agentes bacterianos envolvidos na etiologia das mastites.” na Revista Brasileira de Medicina Veterinária.”

REVISTA BRASILEIRA DE MEDICINA VETERINÁRIA
ISSN 0100-2430 - Periódico de Informação Técnico Científico
SOCIEDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA DO RIO DE JANEIRO
Avenida Presidente Vargas, 446/1004 – Edifício Delamare – Centro, Rio de Janeiro, 20.085-900, RJ
E-mail: somveri@gmail.com

RBMV 75/2014-Somverj

Em, 16 de junho de 2014.

Prezada
Profa. Dra. Miliane Moreira Soares de Souza
Instituto de Veterinária, UFRRJ
Campus Seropédica, BR 465 km 7
Seropédica, 23897-970, RJ. E-mail: milianemss@gmail.com

Comunico a V.Sa., e aos demais autores que o artigo abaixo relacionado que o manuscrito abaixo relacionado foi aceite e tem previsão de publicação 2015 na *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*. Este periódico está indexado até o presente momento no CABI, AGRICOLA, ISI (Web of knowledge), AGRIS-FAO, sendo considerada como B1 no *Qualis/CAPES*.

1. **Aspectos das condições higiênico-sanitárias em unidades leiteiras em municípios do Rio de Janeiro e análise dos agentes bacterianos envolvidos na etiologia das mastites** de autoria dos seguintes autores: Tatiani Abreu de Alencar, Elaine da Conceição Liporage de Mendonça, Viviane Figueira Marques, Dayanne Araujo de Melo, Anna Carolina Marins Rojas, Cássia Couto da Motta, Gabrielli Stefaninni Santiago, Felipe Dubenczuk, Pedro Trivisol de Castro Medeiros, Shana de Mattos de Oliveira Coelho e Miliane Moreira Soares de Souza

Atenciosamente


Carlos Wilson Gomes Lopes PhD, LD
Editor da RBMV

Anexo 8 ALENCAR, T.A.; MENDONÇA, E.C.L.; MARQUES, V.F.; MELO, D.A.; ROJAS, A.C.M.; MOTTA, C.C.; SANTIAGO, G.S.; DUBENCZUK, F.C.; TRIVISOL, P.; COELHO, S.M.O.; SOUZA, M.M.S. Aspectos das condições higiênico-sanitárias em unidades leiteiras em municípios do Rio de Janeiro e análise dos agentes bacterianos envolvidos na etiologia das mastites. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*. [Aceito para publicação]

ASPECTOS DAS CONDIÇÕES HIGIÊNICO-SANITÁRIAS EM UNIDADES LEITEIRAS EM MUNICÍPIOS DO RIO DE JANEIRO E ANÁLISE DOS AGENTES BACTERIANOS ENVOLVIDOS NA ETIOLOGIA DAS MASTITES.

FEATURES OF HYGIENIC-SANITARY CONDITIONS IN DAIRY UNITS IN COUNTIES IN THE RIO DE JANEIRO STATE AND BACTERIOLOGICAL ANALYSIS INVOLVED IN THE MASTITIS ETIOLOGY.

Tatiani Abreu de Alencar¹, Elaine da Conceição Liporage de Mendonça², Viviane Figueira Marques³, Dayanne Araujo de Melo⁴, Anna Carolina Marins Rojas⁴, Cássia Couto da Motta⁴, Gabrielli Stefaninni Santiago⁴, Felipe Carlos Dubenczuk⁵, Pedro Trivisol de Castro Medeiros⁶, Shana de Mattos de Oliveira Coelho⁷, Miliane Moreira Soares de Souza^{8*}.

ABSTRACT. Alencar T.A., Mendonça E.C.L., Marques V.F., Melo D.A., Rojas A.C.M., Motta, C.C., Santiago, G.S., Dubenczuk, F.C., Trivisol P., Coelho S.M.O., Souza, M.M.S. [Features of hygienic-sanitary conditions in dairy units in counties in the Rio de Janeiro state and bacteriological analysis involved in the mastitis etiology]. Aspectos das condições higiênico-sanitárias em unidades leiteiras em municípios do Rio de Janeiro e análise dos agentes bacterianos envolvidos na etiologia das mastites. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária 00(0): 00-00, 2012*. Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465, KM 07, Seropédica, Rio de Janeiro, CEP 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 in the South Fluminense region of the Rio de Janeiro state. 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 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.

1. Economista Doméstica, Programa de Pós-Graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação Agropecuária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Br 465, Km 7, Seropédica, Rio de Janeiro, RJ 23890-000, Brasil. Email: tatianimedvet@yahoo.com.br – bolsista Capes.

2. Médica-veterinária, M.Cs/Vs. Curso de Pós Graduação Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Br 465, Km 7, Seropédica, Rio de Janeiro, RJ 23890-000 Email: elaineliporage@yahoo.com.br.

3. Bióloga, M.Cs/Vs. Curso de Pós Graduação Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Br 465, Km 7, Seropédica, Rio de Janeiro, RJ 23890-000, Brasil. Email: vivifigueira@yahoo.com.br.

4. Médica-veterinária, Curso de Pós Graduação Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Br 465, Km 7, Seropédica, Rio de Janeiro, RJ 23890-000, Brasil. Emails: daymelo@gmail.com, ca.damotta@hotmail.com, acacmar@gmail.com, gabrielliss@hotmail.com - Bolsistas Capes.

5. Curso de Graduação em Medicina Veterinária, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Br 465, Km 7, Seropédica, Rio de Janeiro, RJ 23890-000, Brasil. Email: felipe_c_d@hotmail.com – bolsista PIBIC.

6. Curso de Graduação em Medicina Veterinária, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Br 465, Km 7, Seropédica, Rio de Janeiro, RJ 23890-000, Brasil. Email: pedrotrivisol@hotmail.com.

7. Bióloga, *Dr. CsVs*. Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Br 465, Km 7, Seropédica, Rio de Janeiro, RJ 23890-000, Brasil. Email: shana@ufrj.br

8. Médica Veterinária, *PhD*. Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Br 465, Km 7, Seropédica, Rio de Janeiro, RJ 23890-000, Brasil. +Autor para correspondência: Email: miliane@ufrj.br – bolsista CNPq.

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 região sul - fluminense 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 à 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). Considerando 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 faringes, 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 momentos 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 (Carreiro 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 derivados, 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 Pirai- 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 da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

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 morfológicas. De acordo com as características encontradas os isolados foram processados para melhor identificação segundo protocolos estabelecidos na literatura (Koneman 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 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* (Karahan & 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 BHI, incubados durante 24 horas a uma temperatura de 37°C e diluídos na concentração do tubo 0,5 da escala de Mc Farland, 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), Enrofloxacina (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 na tabela 1 e 2, respectivamente.

Das 140 amostras de leite foram obtidos 201 isolados, sendo 85,07% (171/201) pertencentes ao gênero *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 rubidaea*, 1,49% (3/201) *E.coli*, 3,33% (1/30) de *Morganella morganii*, 3,33% (1/30) *Klebsiella pneumoniae*, 10% (3/30) 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 ÉCP, 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. rubidaea* (6/14), 50% (7/14) *C.diversus* e 7,14% (1/14) *E.coli*.

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 enrofloxacin 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.

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 infra-estrutura 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 aproveitam 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. *S. intermedius* e *Staphylococcus* do grupo SIG foram isolados em menor proporção. Em estudo desenvolvido por Moroni et al. (2006), verificou-se que o *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 *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus pseudintermedius* e *Staphylococcus 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 meticilina 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 são 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 no quadro 2.

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 enrofloxacina 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 *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* spp. isolados de leite mastítico, detectaram níveis de resistência de 28,37% e 26,04%, respectivamente, à ação da enrofloxacina na região de Botucatu, São Paulo. O fato de este 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 enrofloxacina de 57% (12/21), a relevância desse dado deve ser avaliada quanto à circulação dessa resistência.

Estudos que avaliaram a resistência à sulfametoxazol+trimetopim em isolados de *Staphylococcus* spp. de leite mastítico reportaram distintos 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 tetraciclina 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 tetraciclina 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 BIBLIOGRÁFICAS

- 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. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária Zootecnia*. 55(5): 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(2):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. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 53(5):10-17, 2001.
- Carvalho L.A. Embrapa gado de leite: sistema de produção. Disponível em: <www.cnpqg.embrapa.br/sistema/cerrado.html>. Acesso em: 16 junho 2012.
- Carneiro D.M.V.F., Domingos P.F. & Vaz A.K. Imunidade inata da glândula mamária bovina: resposta à infecção. *Ciência Rural*. 39(6):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. *Ciência Rural*. 37:195-200, 2008.
- Coelho S.M.O., Reinoso E., Pereira I.A., Soares L.C., Demo M., Bogni C. & Souza M.M.S. Virulence factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*

- isolated from bovine mastitis in Rio de Janeiro. *Pesq. Vet. a 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(2):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. *Arquivo Instituto de Biologia.* 73(1):17-21, 2002.
- CLSI Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From animals; Approved Standard. 3th. M31-A3. 22(6), 2008. 116p.
- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 22th 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. *Journal of Dairy Science.* 85(5): 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. *The Journal of Hospital Infection.* 73 (4): 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. *Arqs Inst. Biológico.* 72(2): 171-177, 2005.
- Hirsh D.C. & Zee Y.C. Microbiologia Veterinária, Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan, 3ed, 2003.446p.
- Koneman E.W., Allen S.D., Janda W.M., Schreckenberger P.C. & Winn J.R. Diagn. Microbiol. 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. *Arquivo Instituto de Biologia.* 76 (4): 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. *Naggama.* 1:4-7, 2000.
- Leiter, T. Cephalosporins. 2000. Disponível em <<http://www.fhsu.edu/nursing/otitis/cephalosporins.html>> Acesso em: junho de 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. / The in vitro action of enrofloxacin on the microorganisms isolated from mastitic bovine milk. *Ars Veterinaria, Jaboticabal*. 18 (2): 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. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 60 (1): 278-282, 2008.
- Mendonça E.C.L., Marques, V.F., Melo D.A., Alencar T.A., Coelho S.M.O. & Souza M.M.S. 2012. Caracterização fenogenotípica da resistência antimicrobiana em *Staphylococcus* spp. isolados de mastite bovina. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. In press.
- 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: julho de 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. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 38 (4): 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. *Arquivo do Instituto de Biologia de São Paulo*. 74 (3): 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(2): 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. *Ciênc. Anim. Bras.* 10(1): 226-230, 2011.
- Oliveira M.T. Ambigüidade da extensão rural universitária e as acusações de técnicos. *Rev.Econ. Sociol. Rural*. 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. 166 p. (Disponível em: http://www.bdtd.ufrrj.br/tde_arquivos/3/TDE-2012-05-18T082409Z-1098/Publico/Ingrid%20Annes%20Pereira.pdf)
- Pyoralá S. & Taponen S. Coagulase-negative staphylococci: Emerging mastitis pathogens. *Veterinary Microbiolog.* 134: 3-8, 2009.
- Santini G.A., Pedra D.F.B.M. & Pigatto G. Internacionalização do Setor Lácteo: A Busca pela Consolidação. Anais do 47^o Congresso da *Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural*. Disponível em: <<http://www.sober.org.br/palestra/13/831.pdf>> Acesso em 06 de julho de 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. *Veterinária Notícias*. 12 (2): 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. *Ciência Rural*. 38 (5): 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. *Journal of Food Protection*. 62: 1150-1156.
- Zafalon L.F. Mastite subclínica causada por *Staphylococcus aureus*: custo-benefício da antibioticoterapia de vacas em lactação. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 59 (3): 577-585, 2007.
- Wattiaux M.A. Development The Babcock Institute for International Dairy Research. 2000. Disponível em: <<http://babcock.cals.wisc.edu>> acesso em: junho de 2012.

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 ^a
<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
DNAr (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) ^b	<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

a. 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

Tabela 1. Caracterização geral das fazendas

Características gerais das propriedades								
Fazenda	Local ^a	Total de vacas	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%	60,9%
E	RC	50	46	girolando	130	manual	0%	20%

a. 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%

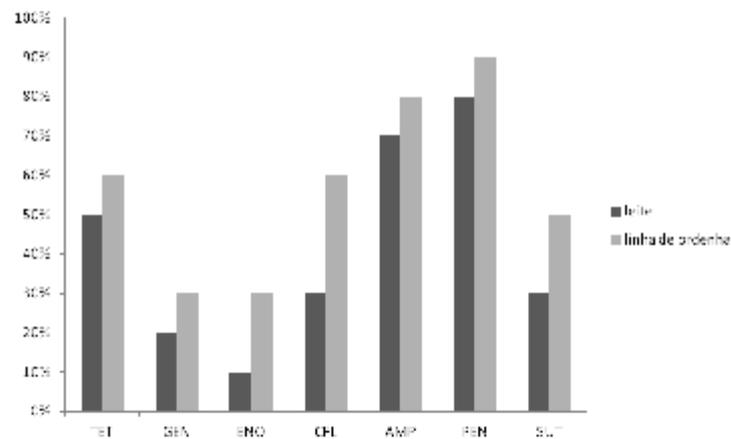


Figura 1. Gráfico dos percentuais de resistência dos *Staphylococcus spp.* obtidos a partir do leite e da cadeia produtiva aos antimicrobianos testados.

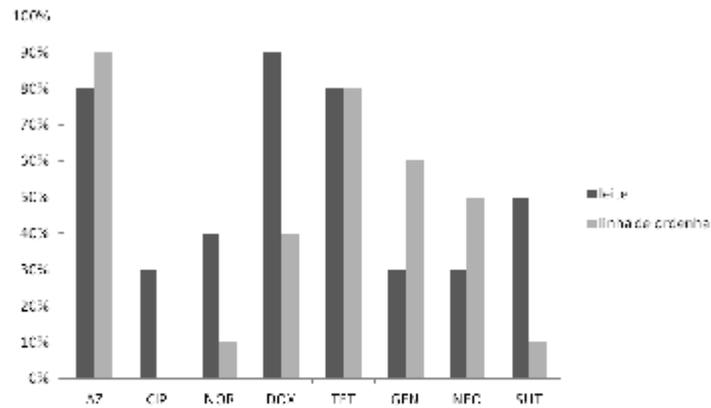


Figura 2. Gráfico dos percentuais de resistência dos bastonetes Gram negativos isolados do leite e da cadeia produtiva aos antibióticos testados.

Tabela 3. Frequência das espécies bacterianas nas propriedades avaliadas

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

ECP	(2/2)	-	(1/1)
(8/26)			

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