

**ELIZABETH SAMPAIO DE MEDEIROS**

**PERFIL DE SENSIBILIDADE *in vitro* DE *Staphylococcus* spp FRENTE A  
ANTIMICROBIANOS E DESINFETANTES UTILIZADOS NO  
CONTROLE DA MASTITE BOVINA**

RECIFE

2008



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

**ELIZABETH SAMPAIO DE MEDEIROS**

**PERFIL DE SENSIBILIDADE *in vitro* DE *Staphylococcus spp* FRENTE A  
ANTIMICROBIANOS E DESINFETANTES UTILIZADOS NO  
CONTROLE DA MASTITE BOVINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Veterinária.

Orientador:

**Prof. Rinaldo Aparecido Mota**

Co-orientador:

**Prof. Marcos Veiga dos Santos**

RECIFE

2008

FICHA CATALOGRÁFICA

M488p Medeiros, Elizabeth Sampaio de  
Perfil de sensibilidade in vitro dos *Staphylococcus spp*  
frente a antimicrobianos e desinfetantes utilizados no con-  
trole da mastite bovina / Elizabeth Sampaio de Medeiros.  
-- 2008.  
95 f.

Orientador : Rinaldo Aparecido Mota  
Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) --  
Universidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento  
de Medicina Veterinária.  
Inclui anexo e bibliografia.

CDD 636.208 961 89

1. Mastite bovina
  2. *Staphylococcus spp*
  3. Antibióticos
  4. Desinfetantes
- I. Mota, Rinaldo Aparecido
  - II. Título

Dedico esta dissertação aos meus filhos e a minha mãe por contribuírem com paciência e carinho durante todo este período. E a todos que participaram de forma direta ou indireta para realização deste trabalho.

## AGRADECIMENTOS

A Deus que torna todos os sonhos possíveis, onde encontro o conforto em todos os momentos desta caminhada;

A minha avó Antônia Iva Sampaio “*in memoria*” exemplo de dignidade, integridade e amor incondicional;

Aos meus pais por todo apoio, incentivo e paciência;

Aos meus filhos Francisco Expedito e Antônia Iva por serem o amor mais puro e confortável que torna nossa busca por ideais mais amena com todo carinho oferecido;

Ao Professor Rinaldo Aparecido Mota, amigo de apreço inestimável que me transformou como pessoa, me orientou para a vida e me fez entender o valor que cada um guarda dentro de si;

Ao Professor Marcos Veiga dos Santos pelo apoio e confiança;

Ao meu tio Glênio Cavalcanti de Barros por acreditar que eu poderia alcançar este objetivo e não ter desistido de incentivar;

A toda minha família que torceu para esta conquista;

A coordenadora do Programa de Pós-graduação em Ciência Veterinária, Profa. Dra. Aurea Wischral e todos os alunos de pós graduação por esta caminhada harmoniosa;

A minha querida amiga Ana Virgínia Marinho pelo carinho e apoio pessoal e profissional;

Aos meus amigos em especial Manuela Freitas e José Willton Júnior por tornar possível a conclusão deste projeto com incentivo e ensinamentos que não esquecerei;

A equipe de profissionais de campo que representam as empresas Schering Plough, Intervet, Irfá, Pfizer e Ourofino nas pessoas dos médicos veterinários Marne Portela e Otto Portela, Bruno Tinoco, Pedro Henrique, Espedito e Daniela Miyasaka;

A todos os criadores das regiões visitadas que me receberam com amizade, confiança e cederam os animais para o estudo;

Aos amigos Andréia Paiva, Andréa Alice, Sineide, Raquel, Ednéia, Prof. Jean, Prof. Leo, Prof<sup>a</sup>. Silvana Suely, Prof. Leucio, Tadeu, Prof. Paulo, Prof<sup>a</sup>. Márcia agradeço o apoio;

A todos os integrantes da equipe do Laboratório de Bacterioses da Universidade Federal Rural de Pernambuco que auxiliaram durante a realização deste projeto (Rodolfo, Alonso, Gileno, Olegário “*in memoria*”, Davi, Andréia, Patrícia, Luciana, Erika Samico, Erika Moraes, David, Flora, Saulo, Eduardo e Bruno);

A todos os funcionários da Universidade (Dona Guiomar, Seu Bené, Lurdinha, Edna, Lucinha, Marisa, Autamira, Flávia e Tusinha)

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a conclusão deste trabalho.

## SUMÁRIO

|  | <i>Página</i> |
|--|---------------|
| RESUMO   |               |
| 1. INTRODUÇÃO .....  | 09            |
| 2. OBJETIVOS.....  | 11            |
| 2.1. – Objetivo Geral.....   | 11            |
| 2.2. – Objetivos Específicos.....  | 11            |
| 3. REVISÃO DE LITERATURA.....  | 12            |
| 3.1. Leite.....  | 12            |
| 3.2. Considerações gerais sobre mastite.....   | 14            |
| 3.3. Estafilococos.....  | 19            |
| 3.4. Desinfetantes no controle da mastite.....   | 21            |
| 3.5. Antibióticos no controle da mastite.....  | 23            |
| 4. REFERÊNCIAS.....  | 26            |
| 5. ARTIGOS.....  | 46            |
| 5.1. Participação dos <i>Staphylococcus</i> Coagulase Positiva e Negativa<br>na etiologia das mastites em bovinos leiteiros no estado de<br>Pernambuco.....  | 46            |
| 5.2. Avaliação “ <i>in vitro</i> ” da eficácia dos desinfetantes comerciais<br>utilizados no pré e pós- <i>dipping</i> frente a amostras de <i>Staphylococcus</i><br>spp isolados de mastite bovina..... | 59            |
| 5.3. Sensibilidade antimicrobiana “ <i>in vitro</i> ” dos <i>Staphylococcus</i> spp<br>isolados no leite de vacas com mastite subclínica.....  | 71            |
| 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....   | 87            |
| 7. ANEXOS.....   | 88            |

## RESUMO

Objetivou-se com esse trabalho avaliar a ocorrência e a sensibilidade de bactérias do gênero *Staphylococcus* spp frente aos antibióticos e desinfetantes utilizados no controle das mastites bovinas. Foram estudadas 15 propriedades situadas em municípios da Região Metropolitana do Recife (A), Agreste (B) e Zona da Mata (C) do estado de Pernambuco. Foram coletadas 1080 amostras de leite de vacas com mastite subclínica que foram submetidas ao exame microbiológico para isolamento e identificação dos *Staphylococcus* spp. Para o estudo da sensibilidade e resistência dos *Staphylococcus* spp aos antimicrobianos foi empregada a técnica de difusão em discos frente aos seguintes antibióticos: amoxicilina (10 mcg), ampicilina (10 mcg), azitromicina (15 mcg), cefquinome (30 mcg), cephalonium (30 mcg), ciprofloxacina (5mcg), cloxacilina (25 mcg), danofloxacina (10 mcg), enrofloxacina (5 mcg), eritromicina (15 mcg), florfenicol (30mcg), gentamicina (10 mcg), penicilina + novobiocina (10 mcg), sulfá (25 mcg) + trimetoprim (5 mcg), tobramicina (10 mcg) e tetraciclina (30 mcg) + neomicina (30 mcg) + bacitracina (10 mcg). Para o estudo “*in vitro*” da sensibilidade e resistência dos *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* coagulase positiva aos desinfetantes, foram utilizados o iodo (0,57%), cloro (2,5%), amônia quaternária (4%), ácido láctico e clorexidine (2,0%). Das 1080 amostras analisadas, 740 (68,5%) foram positivas ao exame microbiológico e 340 (31,5%) negativas. Das amostras positivas, isolaram-se bactérias do gênero *Staphylococcus* em 291 (39,3%). Dos 291 isolados, 170(58,4%) foram classificados como *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN), 84(28,9%) como *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) e 37(12,7%) como *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP). A melhor eficácia *in vitro* foi obtida pela associação entre neomicina + bacitracina + tetraciclina com percentuais de 98,4%, 99,3%, 89,7% para as regiões A, B e C respectivamente. O menos eficaz foi a ampicilina que apresentou 56,5% de resistência para os isolados da região A, 72,8% para a região B e 71,8% na região C. Com relação aos desinfetantes, observou-se que o iodo foi o mais eficaz para os *S. aureus* e SCP e o menos eficaz foi o cloro. Conclui-se com este estudo a importância epidemiológica dos *Staphylococcus* spp nas mastites subclínicas em vacas leiteiras nas regiões estudadas e a necessidade da avaliação periódica dos antibióticos e desinfetantes utilizados no controle da mastite.

## **Profile of *in vitro* sensitivity of *Staphylococcus* spp in respect to Antimicrobials and Disinfectants used in the control of Bovine Mastitis.**

### **ABSTRACT**

The goal of this research was to evaluate the occurrence and the sensitivity of *Staphylococcus* spp to antibiotics and disinfectants used in the control of bovine mastitis. Fifteen dairy farms located in the Metropolitan Recife regions (A), Agreste (B) and Zona de Mata (C), of the state of Pernambuco were studied. A total of 1,080 milk samples were collected and submitted to microbiological culture in order to isolate and identify *Staphylococcus* spp. To study the sensitivity and resistance of *Staphylococcus* spp to antimicrobials the diffusion disk technique with the following antibiotics was used: amoxiciline (10 mcg), ampiciline (10 mcg), azitromicine (15 mcg), cefquinome (30 mcg), cephalonium (30 mcg), ciprofloxacin (5mcg), cloxacillin (25 mcg), danofloxacin (10 mcg), enrofloxacin (5 mcg), eritromicine (15 mcg), florfenicol (30mcg), gentamicine (10 mcg), penicillin + novobiocine (10 mcg), sulfa (25 mcg) + trimetoprim (5 mcg), tobramicine (10 mcg) e tetraciclina (30 mcg) + neomicine (30 mcg) + bacitracine (10 mcg). For the *in vitro* study of sensitivity and resistance of *S. aureus* and *Staphylococcus* coagulase positive to the disinfectants, the following products were used: iodine (0.5%), chlorine (2.5%), quaternary ammonium (4%), lactic acid and chlorhexidine (2.0%). Of the 1,080 samples analyzed, 740 (68.5%) were positive and 340 (31.5%) negative. From the positive samples, *Staphylococcus* were isolated in 291 (39.3%). Of these, 170 (58.4%) were classified as coagulase negative *Staphylococcus* (SCN), 84(28.9%) as *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), and 37(12.7%) as coagulase positive *Staphylococcus* (SCP). The most efficient antibiotic *in vitro* was the combination between neomicine (98.4%), and bacitracine (99.3%) and tetracycline (89.7%) for regions A, B e C, respectively. The least efficient was ampicillin, which only showed a resistance of 56.5% to the isolates from region A, 72.8% for region B e 71.8% for region C. With respect to the disinfectants, iodine proved to be the most effective for *S. aureus* and SCP. The least effective was chlorine. Based on the results, it can be concluded with the epidemiological importance of *Staphylococcus* spp in subclinical mastitis in dairy cows in the regions chosen and the need for periodic evaluation of the antibiotics and disinfectants used to control mastitis.

## 1. INTRODUÇÃO

Entre os processos infecciosos da glândula mamária que interferem na qualidade do leite destaca-se a mastite, que é considerada uma das principais enfermidades que causam prejuízos à indústria leiteira, apesar dos inúmeros esforços voltados para o seu controle (PEDRINI; MARGATHO, 2003; FREITAS et al., 2005). É uma enfermidade plurietiológica e multifatorial que acomete a maior parte do rebanho leiteiro e causa problemas em toda cadeia produtiva, inclusive ao consumidor que poderá ter um produto final de qualidade inferior (COSTA, 1999).

Esta doença pode se apresentar, na dependência da intensidade da resposta inflamatória, de forma clínica que é diagnosticada por alterações no úbere e na secreção láctea e de forma subclínica confirmada por testes baseados no conteúdo celular do leite (RIBEIRO et al. 2003).

Independentemente da forma de apresentação, a etiologia bacteriana assume um lugar de destaque na epidemiologia do processo infeccioso. Entre os agentes envolvidos neste processo destacam-se os *Staphylococcus* que são fontes inesgotáveis de estudos em diversos países do mundo, possuem características particulares de dispersão entre os rebanhos, resistência aos fármacos utilizados no tratamento da doença e grau de toxigenicidade que pode ocasionar riscos à saúde pública (LANGONI et al., 1991; QUINN et al., 1994; LANGONI et al., 1998; FREITAS et al., 2005).

Diversos autores confirmaram a enterotoxigenicidade dos *Staphylococcus* em amostras de leite bovino. De Freitas e Magalhães (1990) estudaram a enterotoxigenicidade de 93 amostras de *S. aureus* e verificaram que delas 1,7% eram produtoras de enterotoxina A, responsável por vários casos de toxinfecções alimentares.

Cardoso (2000) estudaram a produção de enterotoxinas estafilocócicas em 127 amostras de *S. aureus* provenientes de vacas com mastite no estado de Minas Gerais e constataram que do total de amostras analisadas, 54 (43%) eram produtoras de enterotoxinas.

Stamford et al. (2006) analisaram 109 cepas de *Staphylococcus* spp provenientes de leite *in natura* de vacas com mastite subclínica procedentes de fazendas localizadas no agreste de Pernambuco. Submeteram 43 amostras de *Staphylococcus* coagulase positiva ao teste de produção de enterotoxinas e encontraram 77% das amostras positivas.

Os programas de controle da mastite bovina incluem diferentes estratégias para reduzir a prevalência à níveis economicamente aceitáveis, uma vez que a erradicação desta enfermidade não se mostra como uma meta viável (NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 1978; COSTA, 1991).

A mastite nos bovinos pode ser controlada com a utilização de substâncias germicidas nos tetos antes e após a ordenha, antibioticoterapia no período de secagem, eliminação dos casos crônicos, tratamento dos casos clínicos durante a lactação e o adequado funcionamento dos equipamentos de ordenha (PHILPOT; NICKERSON, 1992).

De acordo com Brito et al. (2001), diversos estudos sobre a sensibilidade antimicrobiana realizados no Brasil com patógenos envolvidos na mastite bovina demonstram um aumento crescente no padrão de resistência, principalmente para o *S. aureus*. O uso indiscriminado de medicamentos sem a realização de testes preliminares de sensibilidade “*in vitro*” pode na maioria das vezes resultar em tratamentos inadequados e ocasionar agravamento do processo, perdas econômicas e o desenvolvimento de resistência microbiana (CULLOR, 1993).

Diversas medidas devem ser adotadas durante o processo de ordenha para minimizar a transmissão de agentes causadores de mastites que podem ser transferidos ao leite depreciando sua qualidade microbiológica. Destacam-se a ordenhadeira, a mão do ordenhador e lesões nos tetos que expõem a superfície destes aos microrganismos (AMARAL et al., 2004). A higienização prévia dos tetos previne doenças como a mastite sendo de grande importância para redução do número de microrganismos patogênicos no leite e melhoraria das condições higiênicas do mesmo (JONES, 1998).

Vários trabalhos demonstraram a eficiência dos desinfetantes na redução dos casos de mastite subclínica quando utilizados de maneira adequada (SILVA, 1997; FREITAS, 1998; JONES, 1998; BRITO, 2000).

Considerando a importância que os *Staphylococcus* assumem no processo inflamatório da glândula mamária de vacas leiteiras, é importante a realização de um estudo regional sobre a epidemiologia das mastites, assim como, avaliar a sensibilidade dos *Staphylococcus* frente a antibióticos e desinfetantes disponíveis no mercado, para que assim se possa sugerir um programa de utilização de produtos que se adequem ao controle e tratamento desta enfermidade.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Geral

- ✓ Estudar a epidemiologia e aspectos relacionados ao tratamento e controle das mastites subclínicas em bovinos leiteiros em três regiões do estado de Pernambuco.

### 2.2 Específicos:

- ✓ Avaliar a ocorrência dos *Staphylococcus* spp nas mastites subclínicas em vacas leiteiras nas diferentes regiões do estado de Pernambuco;
- ✓ Caracterizar fenotipicamente os *Staphylococcus* spp isolados no leite de vacas com mastite subclínica;
- ✓ Determinar a sensibilidade "*in vitro*" dos *Staphylococcus aureus*, coagulase positiva e coagulase negativa frente aos antimicrobianos utilizados no tratamento da mastite;
- ✓ Determinar a sensibilidade "*in vitro*" dos *Staphylococcus aureus* e outros coagulase positiva frente aos desinfetantes mais utilizados no pós "dipping".

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. Leite

Segundo Gonzales (2001), o leite é um fluído composto por uma série de nutrientes sintetizados na glândula mamária a partir de precursores derivados da alimentação e do metabolismo.

O regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal-RIISPOA, artigo 475 define o leite como o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas (BRASIL, 1997).

É um alimento de alto valor nutritivo que fornece ao homem os macro e micro nutrientes necessários ao seu crescimento, desenvolvimento e manutenção da saúde (SOUZA et al., 1996). Faz parte da alimentação de indivíduos de todas as idades e classes sociais, destacando-se um maior consumo principalmente na dieta de crianças e idosos (FRANCO et al., 2000).

A composição do leite *in natura* varia dentro de uma mesma raça em função de diversos fatores, como fase de lactação, idade do animal, estado sanitário do úbere, infecções e inflamações, alimentação, condições climáticas, estação do ano e tempo transcorrido entre as ordenhas (TAMINE; ROBINSON, 1991; WALDNER et al., 2005).

De acordo com Riedel (1992), o leite é um dos melhores meios de cultura para a multiplicação de microrganismos como algas, fungos, leveduras e bactérias, devido às suas características nutritivas (CHYE et al., 2004). Estes microrganismos podem contaminar o leite durante ou após a ordenha e conseqüentemente os derivados de leite, os quais podem ainda sofrer contaminação durante o processamento e estocagem, principalmente nos casos em que há grande manipulação do produto (NOUT, 1994). Portanto, deve ser obtido com a máxima higiene e mantido em baixa temperatura, desde a ordenha até o seu beneficiamento, visando garantir suas características físicas, químicas e nutricionais (BONFOH et al., 2003).

Em 18 de setembro de 2002, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), por intermédio do Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA) publicou a Instrução Normativa Nº 51 no Diário Oficial da União. Esta instrução normatiza a produção que estabelece os critérios e parâmetros de identidade e qualidade do leite desde a ordenha, o resfriamento na propriedade e seu transporte a granel, incluindo requisitos físico-químicos e microbiológicos, contagem de células somáticas (CCS) e limites máximos de resíduos (LMR) de antimicrobianos (BRASIL, 2002).

Desta forma, busca-se a médio e longo prazo a melhoria da qualidade para que haja a inserção cada vez maior do Brasil no mercado internacional de produtos lácteos. Isto implica na produção de leite de excelente qualidade, a um baixo custo e com o maior rendimento industrial possível e, para que isto ocorra, a qualidade da matéria prima é essencial (COSTA, 2005).

O mercado internacional possui normas rígidas para garantir a qualidade do leite para beneficiamento industrial. Nos EUA, a regulamentação exige que o leite *in natura* seja resfriado a 7°C, 2 horas depois da ordenha, e mantido a essa temperatura ou abaixo. A contagem bacteriana do leite deve ser inferior a 100 mil unidades formadoras de colônias por mililitro, UFC mL<sup>-1</sup>; a contagem de células somáticas (CCS) deve estar abaixo de 750 mil células mL<sup>-1</sup>; e não pode conter resíduos de antibióticos, adulterantes ou água (PHILPOT; NICKERSON, 2002).

Entre os microrganismos que podem contaminar o leite e seus derivados, o *Staphylococcus* spp tem sido considerado um dos mais frequentemente envolvidos em surtos de intoxicação alimentar (DE BUYSER et al., 2001). É considerada uma das mais importantes bactérias causadoras de doenças de origem alimentar (VERAS et al., 2003).

Segundo DE BUYSER et al. (2001), é difícil estimar a proporção de doenças transmitidas pelo leite e derivados, devido às limitações dos sistemas de vigilância. Na França, o leite e os seus derivados estiveram envolvidos em 5% dos 3.839 surtos de doenças transmitidas por alimentos de origem bacteriana entre 1988 e 1997. Neste país, dos 60 surtos relatados, 48% foram relacionados ao consumo de leite cru. Do mesmo modo, de 1 a 5% dos casos relatados em outros países como Escócia, Inglaterra e País de Gales (COWDEN et al., 1995; AMMON, 1997), Estados Unidos (BEAN et al., 1997) e Holanda (SIMONE et al., 1997) estiveram relacionados ao leite cru.

No Brasil, o leite e seus derivados são amplamente consumidos e podem causar doenças de origem alimentar quando contaminados por amostras enterotoxigênicas de *S. aureus*, *Staphylococcus* coagulase positiva (CARMO et al., 1995, 1996) ou *Staphylococcus* coagulase negativa (SENA, 2000; VERAS et al., 2003).

No Estado de Minas Gerais, no período de 1997 a 2002, o leite e seus derivados estiveram envolvidos em surtos de toxinfecção alimentar, sendo *Staphylococcus* o principal agente (VERAS et al., 2003).

A garantia da qualidade do leite, principalmente para evitar a veiculação de agentes infecciosos ao homem, se inicia com o atestado sanitário da vaca, do ordenhador, das condições sanitárias do ambiente em que as vacas são ordenhadas, dos equipamentos usados

na coleta e transporte do leite. Depende ainda, das condições higiênico-sanitárias durante a produção, do tratamento térmico, da temperatura de armazenamento do leite na propriedade, durante o transporte até a indústria, assim como os cuidados na rede de distribuição e no consumo (CERQUEIRA et al., 1999a,b).

### **3.2. Considerações gerais sobre mastite**

A mastite é uma enfermidade plurietiológica e multifatorial que acomete a maior parte do rebanho leiteiro e causa problemas em toda cadeia produtiva, inclusive ao consumidor que poderá ter um produto final de qualidade inferior (COSTA, 1999).

Caracteriza-se por alterar o tecido glandular, causando distúrbios funcionais no quarto mamário afetado. Tais distúrbios resultarão em uma diminuição da produção de leite e alterações em suas características físico-químicas, bacteriológicas e sensoriais (GERMANO, 2001). Ocorre elevação no número de células somáticas (leucocitárias e epiteliais), da carga microbiana, redução nos teores de gordura, proteína e lactose, aumento das frações do soro sanguíneo no leite, desequilíbrio salino, aumento no pH e diminuição da estabilidade das proteínas do leite fato que compromete a qualidade final do produto (SILVA, 1999; BUENO, 2005).

O processo inflamatório da glândula mamária causa lesões nas células secretoras que se tornam menos eficientes, reduzindo assim a produção. O metabolismo celular também é alterado, prejudicando a síntese dos componentes do leite (CERÓN-MUÑOZ et al., 2002). Há aumento na permeabilidade dos vasos sanguíneos e da rota paracelular de secreção dos constituintes do sangue no leite (MOUSSAOUI et al., 2002; SILVA, 1999).

Além da diminuição na produção leiteira, o leite mastítico representa sério problema tecnológico para as indústrias beneficiadoras por possuírem um número aumentado de células somáticas, diminuição no teor de caseína e aumento nas proteínas do soro, dentre outras anormalidades. As alterações na composição são responsáveis por diminuição no rendimento industrial, baixa qualidade dos fermentados e diminuição na vida de prateleira dos derivados lácteos (PRESTES et al., 2003).

Os entraves à exploração leiteira, não se constituem só pelas perdas econômicas provocadas pela redução na produção, como também por alterações dos principais componentes do leite e pela diminuição da vida produtiva dos animais, conseqüente ao comprometimento dos quartos mamários afetados (DOMINGUES et al., 2002).

Esta doença pode ser causada por agentes físicos ou químicos, mas na maioria dos casos, a inflamação é resultado de uma infecção microbiana. Diversos microrganismos podem

causar mastite, porém os agentes bacterianos são responsáveis por 90% dos casos (DUVAL, 1997; LADEIRA, 2001).

A prevalência da doença no Brasil é variável. Langenegger et al. (1970) encontraram índice de 20% no Rio de Janeiro; Fonseca (1992) encontrou 38% de positividade em rebanhos produtores de leite tipo B em São Paulo e nos estados de Minas Gerais e São Paulo, a prevalência foi de 71% em estudo realizado por Costa et al. (1999).

Harrop et al. (1975), avaliaram a incidência da mastite bovina em 866 vacas procedentes do Agreste Meridional de Pernambuco e encontraram 338 vacas reagentes ao CMT (39,0%) e 275 animais (31,2%) estavam com infecções no úbere detectadas pelo exame bacteriológico.

Barbalho e Mota (2001) encontraram 104 amostras positivas para mastite subclínica, perfazendo 60,5% do total de 172 amostras de leite analisadas procedentes da Região Metropolitana do Recife e Agreste do estado de Pernambuco.

Em Pernambuco, Mota et al. (1999) e Santos et al. (2003) demonstraram que o índice de mastite subclínica em alguns rebanhos leiteiros pode chegar até 80% dos quartos mamários, dependendo do tipo de exploração leiteira.

Reis et al. (2003) relataram que a forma subclínica é a mais prejudicial pela falta de sintomas ou sinais, fato que determina perdas econômicas maiores, devido à frequência da persistência do processo.

Bueno et al. (2002) verificaram as frequências de mastite clínica e subclínica em cinco propriedades da região de Pirassununga-SP e obtiveram frequências médias de 7,46% e 63,68%, respectivamente.

A mastite subclínica apresenta prevalência muito superior à clínica e no Brasil, a maioria dos casos em bovinos leiteiros ocorre na forma subclínica (BRABES et al., 1999; SANTOS et al., 2003; FREITAS et al., 2005).

Quanto à forma de transmissão a mastite pode ser do tipo contagiosa ou ambiental. A mastite contagiosa caracteriza-se por apresentar baixa incidência de casos clínicos e alta incidência de casos subclínicos, geralmente é de longa duração, transformando-se em um processo infeccioso crônico e apresenta alta contagem de células somáticas (CCS). Esse tipo de mastite é causado por patógenos cujo *habitat* preferencial é o interior da glândula mamária e a superfície da pele dos tetos e é transmitida principalmente durante a ordenha. Os principais agentes contagiosos são *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus spp*, *Streptococcus agalactiae* e *Corynebacterium bovis* (FIGUEIREDO, 1995; COSTA, 1998; FREITAS et al., 2005).

A mastite contagiosa é transmitida quase que exclusivamente durante a ordenha e para que haja a transmissão é necessário que exista um elemento de ligação entre um quarto infectado e um sadio. Segundo Amaral et al. (2004), a ordenhadeira mecânica, a mão do ordenhador, práticas de higiene e lesões nos tetos são fatores importantes que expõem a superfície dos tetos aos microrganismos patogênicos contagiosos sendo esses microrganismos transmitidos de animais infectados para não infectados durante o processo de ordenha.

A mastite ambiental caracteriza-se por alta incidência de casos clínicos, geralmente de curta duração, com manifestação aguda e maior ocorrência no pré e pós-parto imediato. Apesar de menos freqüente, é muito importante por ser de difícil tratamento podendo ocorrer morte do animal como resultado de septicemia ou toxemia (ERB et al., 1984; ERSKINE et al., 1988; SANTOS; FONSECA, 2007). É causada por agentes que vivem preferencialmente no habitat da vaca, em locais que contenha esterco, urina, barro e matéria orgânica (FIGUEIREDO, 1995; FREITAS et al., 2005). A infecção ocorre de preferência no período entre as ordenhas, destacando-se a *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis* e *Klebsiella* spp como os principais agentes envolvidos (COSTA, 1998 GARINO Jr. et al., 2000; SANTOS; FONSECA, 2007).

O exame microbiológico é considerado o método laboratorial padrão para o diagnóstico da mastite bovina e seu principal objetivo é oferecer resultados seguros de forma que permitam a ação de medidas específicas de controle direcionadas para o ambiente ou para a higiene da ordenha que podem ser indicadas de acordo com o padrão de infecção encontrado (BRITO et al., 1999).

Na dependência da intensidade da resposta inflamatória a mastite poderá apresentar-se de forma clínica diagnosticada por alterações no úbere decorrentes da inflamação e por modificações da secreção láctea com presença de grumos, pus ou sangue e da forma subclínica que é diagnosticada por testes baseados no conteúdo celular do leite (MENDONÇA et al., 1999; LADEIRA, 2001).

O diagnóstico da mastite clínica é realizado pela inspeção e palpação com base nas alterações inflamatórias do úbere pela dor, às vezes rubor, e por alterações macroscópicas do leite, presença de coágulos, grumos e pus visualizado nos primeiros jatos da ordenha com auxílio da caneca telada ou de fundo escuro. A visualização de grumos no leite é decorrente de alterações por depósito de leucócitos. O contraste do fundo negro da caneca com os grumos facilita a visualização de alterações e o diagnóstico precoce (HIRSH; ZEE, 2003; RIBEIRO et al., 2003).

Um dos testes mais utilizados para o diagnóstico da forma subclínica a campo, aceito internacionalmente é o “California Mastitis Test” (CMT), idealizado por Schalm e Noorlander (1957).

O CMT consiste na reação do leite com um detergente aniônico que promove a liberação de DNA das células somáticas, levando a formação de um composto gelificado correspondente à quantidade de células presentes (ANDRADE, 1998). Pianta (1997) relatou que o CMT é um teste que apresenta boa sensibilidade, além de facilidade de ser realizado ao “pé da vaca” momentos antes da ordenha.

De acordo com Fonseca e Santos (2000), o resultado do teste é avaliado em função do grau de gelatinização ou viscosidade da mistura de partes iguais de leite e reagente, sendo o teste realizado em bandeja apropriada. Os resultados são expressos em escores: negativo, traços, uma, duas ou três cruces, os quais apresentam correlação relativamente boa com a contagem de células somáticas da amostra.

Outra forma de diagnóstico muito utilizada é a Contagem de Células Somáticas (CCS) que vem sendo realizada por Laboratórios da Rede Brasileira de Controle da Qualidade do Leite que aos poucos se instalam em regiões do Brasil com objetivo de melhorar a qualidade do leite e monitorar a situação do rebanho leiteiro. Diversos estudos são realizados com intuito de estabelecer os limites fisiológicos para classificar a glândula mamária como saudável ou infectada em relação à CCS (BUELOW et al., 1996; DELILLEUX et al., 1999; DOHOO, 2001; BEAUDEAU et al., 2002). A CCS do leite proveniente de animais sadios é normalmente menor que 200.000 cel./ml e quando o processo inflamatório se instala este número tende a aumentar para níveis mais elevados que o valor estabelecido como normal (HARMON, 2001; SANTOS; FONSECA, 2007).

Alguns países impõem limites máximos de CCS no leite do rebanho. Nos Estados Unidos esse limite é de 750.000 cel./mL enquanto na União Européia, Nova Zelândia e Austrália este valor é de 400.000 cel./mL (EDMONDSON, 2002; SANTOS, 2002).

No Brasil, a adaptação da lei que estipula valores referentes à CCS acontece de forma gradual com valor máximo inicial para CCS de 1.000.000 cel/mL e previsão de decréscimo para 400.000 cel/mL até 2011 (SANTOS, 2002; BRASIL, 2002).

Os programas de controle da mastite objetivam reduzir sua prevalência em níveis economicamente aceitáveis, uma vez que sua erradicação não se apresenta como uma meta viável (NATIONAL MASTITIS CONCIL, 1978; PYORALA, 2002; PRESTES et al., 2003).

O controle desta afecção em uma propriedade leiteira deve ter como princípio básico a limpeza e higienização das instalações, utensílios e equipamentos, higiene pessoal do

ordenhador, realização dos testes da caneca de fundo escuro, Califórnia Mastitis Test (CMT), contagem de células somáticas (CCS) e testes microbiológicos (VEIGA, 1998).

As estratégias de controle das mastites baseiam-se em medidas preventivas tais como utilização de substâncias germicidas nas tetas antes e após a ordenha, antibioticoterapia no período de secagem, eliminação dos casos crônicos, tratamento dos casos clínicos durante a lactação e o adequado funcionamento dos equipamentos de ordenha (PHILPOT; NICKERSON, 1992; COSTA et al., 1999).

Um adequado manejo de ordenha pode diminuir o número de animais acometidos por mastite clínica e subclínica, reduzir a taxa de novas infecções, melhorar a CCS do rebanho e a qualidade do leite produzido. Isto trará benefícios diretos aos produtores de leite, indústrias e consumidores (RUPP et al., 2000). Este mesmo autor afirma que o primeiro passo do programa de controle é verificar o "*status*" de mastite do rebanho antes de qualquer alteração do manejo e que um dos pontos mais importantes é conscientização dos produtores das perdas econômicas e educação sanitária dos tratadores e ordenhadores. Um ponto crucial na profilaxia é a higiene do ordenhador. Suas mãos são o grande agente transmissor de bactérias para o úbere, o leite e todo o material utilizado (DINGWELL et al., 2004).

Rupp et al. (2000) acrescentam ainda que a ordenha é um dos momentos mais importantes da atividade leiteira por constituir-se na medida mais eficaz de controle da mastite quando realizada de forma correta e higiênica, possibilitando desta forma a melhoria da qualidade do leite.

O sucesso destas estratégias pode apresentar limitações, principalmente quando se trata de mastite causada por *S. aureus*, provavelmente em consequência dos fatores de virulência relacionados ao processo de infecção, da importância dos diferentes reservatórios desse patógeno e do mecanismo de dispersão. Então, mesmo que medidas de controle sejam implementadas, novas infecções continuam a ocorrer em virtude de fontes exógenas à glândula mamária, impossibilitando a erradicação das mastites causadas por este agente (ZADOKS et al., 2002).

### 3.3. Estafilococos

Em 1880, Ogston, um pesquisador norte-americano, descreveu uma bactéria que ao microscópio apresentava-se em forma de cocos agrupados em cachos, relacionando-a a várias patologias humanas. Em 1882, essa bactéria foi denominada *Staphylococcus*, do grego *Staphyle* – cachos de uva – e *coccus* – grãos (BAIRD PARKER, 1990).

Morfológicamente, caracterizam-se como cocos Gram positivos, imóveis, apresentam metabolismo respiratório e fermentativo, atuam sobre carboidratos com produção de ácidos são aeróbias e anaeróbias facultativas. Podem crescer entre 7 a 48°C com temperatura ótima entre 35 a 40°C (LAMBE JR., 1991).

O gênero *Staphylococcus* foi separado em dois grandes grupos (coagulase positivo e coagulase negativo) com base na sua capacidade de coagular o plasma sanguíneo pela produção de estafilocagulase. Loeb (1903) foi o primeiro a demonstrar a capacidade do *Staphylococcus* spp em coagular o plasma, utilizando o plasma de ganso (FOSTER et al., 1997).

Os *Staphylococcus* spp são os agentes etiológicos mais isolados em mastites (ALMEIDA, 1997; BRITO et al., 2002; SANTOS et al., 2003; RABELLO, 2003). Nesse gênero, a espécie *Staphylococcus aureus* é a mais prevalente nas infecções em vacas leiteiras (BOOTH, 1995; BRAMLEY et al., 1996; BRITO et al., 1999; BRITO et al., 2001).

Beloti et al. (1997) estudaram 503 vacas no estado do Paraná, realizaram o “Califórnia Mastitis Teste” e encontraram uma positividade de 29,82% do total de 295 quartos mamários. O *Staphylococcus aureus* foi isolado em 17,95% das amostras e os coagulase negativos estavam presentes em 12,54%.

Freitas e Magalhães (1990) examinaram 2.317 vacas em lactação, provenientes de 86 propriedades da bacia leiteira do estado do Rio de Janeiro e isolaram *Staphylococcus aureus* de 229 (41,94%) das amostras de leite analisadas.

Animais portadores podem constituir fonte de infecção permanente, permitindo a persistência do *Staphylococcus aureus* durante toda a fase de lactação (FERREIRA et al., 2006). Brabes et al. (1999) relataram que em levantamentos epidemiológicos nacionais e internacionais, o *Staphylococcus aureus* está presente em cerca de 50% das infecções da glândula mamária dos bovinos leiteiros. Os quartos mamários infectados, a pele do úbere e dos tetos são os principais sítios de localização do *Staphylococcus aureus*. Entretanto este agente pode ser isolado em outros locais como sala de ordenha e nos bocais das ordenhadeiras, ressaltando a importância do manejo durante a ordenha na prevenção de sua transmissão (FERREIRA et al., 2006; CUNHA et al., 2006).

O *S. aureus* é capaz de causar infecções de longa duração, com tendência a se tornarem crônicas, com baixa taxa de cura e grande perda na produção de leite (SABOUR et al., 2004). Vários fatores podem interferir na cura bacteriológica quando se utiliza a terapia com antibióticos, seja devido ao estágio da ocorrência da infecção ou à presença de bactérias em abscessos, além da incapacidade de defesa das células (DINIZ et al., 1998).

Recentemente alguns autores consideram os SCN como agentes mais isolados de casos de mastite bovina (WAAGE et al., 1999; FREITAS et al., 2005; CUNHA et al., 2006).

Com relação aos *Staphylococcus* coagulase negativos, diversos estudos foram realizados quanto a prevalência destes agentes em rebanhos leiteiros. Nos EUA, a variação das infecções por SCN no pré e pós parto foi de 11 a 57,8% em estudos realizados no pré e pós parto (MATTHEWS et al., 1992). No Brasil, Pardo et al. (1998) e Laffranchi (2000) encontraram 35,29% e 68,05% de ECN respectivamente.

As espécies de *Staphylococcus* coagulase negativas, comumente isoladas de leite bovino, são consideradas como patógenos secundários e podem causar reações inflamatórias moderadas na glândula mamária (BRAMLEY et al., 1996). Em pesquisa realizada por Benites et al. (2001) sobre o aspecto microbiológico do parênquima mamário de vacas leiteiras submetidas ao abate, das 140 amostras analisadas, 54,29% pertenciam ao grupo dos *Staphylococcus* coagulase negativo.

Sampimon et al. (2007) estudaram a prevalência de SCN em rebanhos da Holanda no período de 1999 a 2004 e encontraram valores para casos de mastite subclínica de 16,2% em 1999 e 42,2% em 2004.

No aspecto da persistência dos SCN ao longo da lactação, trabalhos realizados em diversas regiões do mundo mostraram diferentes resultados. Trindade et al. (1990) e Matthews et al. (1992) verificaram que anteriormente ao parto os índices de infecções por SCN eram altos e que a partir do início da lactação diminuíram em frequência.

Nicolau et al. (1996) compararam a contagem de leucócitos por mililitro de leite, dos quartos mamários acometidos por estafilococos coagulase negativos com a dos acometidos por estafilococos coagulase positivos e encontraram o dobro da contagem média de leucócitos para os estafilococos coagulase positivos em relação aos coagulase negativos, caracterizando assim a resposta celular mais branda destes agentes. Entretanto Ward e Schultz (1972) destacaram a importância da patogenicidade dos estafilococos coagulase negativos com respostas celulares intensas e declínio da produção de leite.

Freitas et al. (2005) e Cunha et al. (2006), em estudos realizados no Nordeste do Brasil citam que os SCNs foram os agentes mais prevalentes nas mastites subclínicas.

Além de proporcionar prejuízos à indústria leiteira, os microrganismos isolados nos casos de mastites proporcionam riscos à Saúde Pública. Sabe-se que a intoxicação estafilocócica não é de notificação compulsória e desta forma é inviável precisar a sua real incidência. Mead et al. (1999) estimaram nos EUA a ocorrência de 185.060 casos anuais. Segundo Fagundes e Oliveira (2004), no Brasil não existem estatísticas disponíveis sobre o assunto, entretanto são freqüentes os casos de doenças associadas ao consumo de leite contaminado. De acordo com estes autores o *S. aureus* encontra-se amplamente distribuído nos rebanhos leiteiros, sendo que a probabilidade de contaminação do leite cru com a conseqüente produção de enterotoxinas é elevada.

Ainda em relação à Saúde Pública, vários estudos foram realizados no Brasil demonstrando a importância dos *Staphylococcus* produtores de enterotoxinas responsáveis por toxinfecções alimentares (FREITAS; MAGALHÃES, 1990; BRABES et al., 1999; CARDOSO; SILVA, 2000; FAGUNDES; OLIVEIRA, 2004; ZSCHÖCK et al., 2004; SÁ et al., 2004; SILVA et al., 2005).

Até recentemente, considerava-se que a produção de enterotoxinas era restrita ao grupo das espécies coagulase positiva (*Staphylococcus aureus*), porém Valle et al. (1990) descreveram que outros estafilococos produtores de coagulase como *Staphylococcus hyicus* e *Staphylococcus intermedius* também possuíam essa característica. Outro estudo evidenciou que espécies coagulase negativas como *Staphylococcus xylosum*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus sciuri* e *Staphylococcus lentus* são também capazes de produzir toxinas em condições laboratoriais (PEREIRA et al., 2001).

Os fatores que contribuem para a elevada freqüência desses surtos incluem a baixa qualidade do leite cru, além da sua manipulação indevida desde a fazenda produtora até o comércio varejista (SENA, 2000). O período de incubação da intoxicação estafilocócica é curto, variando de 15 minutos a 6 horas após a ingestão do alimento contaminado (BALABAM; RASOOLY, 2000; CARMO, 2001).

### **3.6.Desinfetantes no controle das mastites**

O termo desinfetante surgiu no século dezenove quando foi observado que certos eflúvios ou emanações misteriosas eram responsáveis por causar doenças e que estes microrganismos causadores destas enfermidades podiam ser combatidos com a utilização de substâncias químicas como enxofre. A definição oficial de desinfecção pela “American Public

Health Association” (1950), “US Public Health Service” and “British Ministry of Health” é a morte de microrganismos patogênicos pela aplicação direta de meios químicos ou físicos (BLOCK, 1991).

A desinfecção é um dos mais importantes aspectos de prevenção de enfermidades e neste contexto muitos desinfetantes foram desenvolvidos especificamente para a prevenção das doenças na indústria leiteira (BODDIE et al., 1997).

Os programas de controle da mastite objetivam reduzir sua prevalência em níveis economicamente aceitáveis, uma vez que sua erradicação não se apresenta como uma meta viável (NATIONAL MASTITIS CONCIL, 1978). Um dos métodos mais efetivos para prevenir novas infecções é a realização da anti-sepsia pré e pós-ordenha (COSTA et al., 1993).

Desta forma, a utilização de soluções anti-sépticas tendem a controlar e até mesmo diminuir os riscos de novas infecções da glândula mamária. Entretanto, alguns desinfetantes possuem pouca eficiência quando na presença de matéria orgânica, sujidades ou urina fatores que dificultam a sua atuação (PANKEY et al., 1984; QUINN, 1991).

Vários trabalhos demonstraram a eficiência dos desinfetantes na redução dos casos de mastite subclínica quando utilizados de maneira adequada (GOLDBERG et al., 1994; JONES, 1998; BRITO, 2000).

Estudo realizado por Oliver et al. (1992) demonstraram que a anti-sepsia dos tetos antes e depois da ordenha com produtos a base de dióxido de cloro foi efetivo na prevenção de infecção intramamária por *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus uberis*.

Com o sucesso desta prática na redução de novas infecções intramamárias surgiram com o tempo, várias bases de soluções desinfetantes em diversas concentrações (NATIONAL MASTITIS CONCIL, 2004).

Os princípios ativos mais utilizados para desinfecção dos tetos são iodo, clorexidina, ácido sulfônico, cloro, peróxidos, lauridina e ácido cloroso. Com objetivo de diminuir a irritação e condicionar a pele dos tetos, são utilizadas algumas bases e emolientes na formulação desses germicidas, como a glicerina, lanolina, propilenoglicol, sorbitol, óleos vegetais, minerais e colágeno (FONSECA; SANTOS, 2001).

Ribeiro (1996) concluiu que um dos principais fatores envolvidos na prevenção de novas infecções é a realização da anti-sepsia adequada pós-ordenha, com soluções preparadas de preferência com emolientes (lanolina ou glicerina 5-10%), evitando-se o acúmulo de matéria orgânica.

Os melhores resultados no “pós dipping” têm sido obtidos com as seguintes concentrações de compostos: iodo - 0,7 a 1,0%, clorexidina - 0,5 a 1,0% e cloro - 0,3 a 0,5% (4% hipoclorito de sódio). No pré "dipping", os produtos tradicionalmente utilizados são hipoclorito de sódio a 2%, iodo a 0,3% e clorexidina a 0,3%. Em ambos os casos deve-se fazer a imersão completa dos tetos (FONSECA; SANTOS, 2001).

Costa (1998) verificou que as amostras de *Staphylococcus* spp apresentaram resistência *in vitro* quando testadas frente ao cloro, o mesmo sendo verificado frente a *Streptococcus* spp. A eficácia de clorexidina e cloro frente as cepas de *Corynebacterium* spp sofreu interferência na presença da matéria orgânica, sendo portanto menor quando comparada com os produtos a base de iodo.

Na maioria das propriedades, agentes desinfetantes são escolhidos por hábito de uso, facilidade de aplicação ou preço. Entretanto, devem-se avaliar as praticidades e as limitações de cada desinfetante, dado que o uso inadequado, por períodos prolongados e baixas concentrações dos desinfetantes levam a uma seleção natural de cepas resistentes em uma população microbiana. Desta forma testes periódicos de avaliação da eficácia *in vitro* destes produtos devem ser realizados para auxiliar o produtor quanto ao uso correto destes produtos (GUNNING; SHEPHERD, 1996; PEDRINI; MARGATHO, 2003).

### **3.7. Antibióticos no controle das mastites**

Com o progresso tecnológico na área da farmacologia antimicrobiana, diversos problemas foram solucionados e outros surgiram, entre eles, o uso inadequado de drogas no intuito de tratar doenças bacterianas que acometiam o rebanho leiteiro. Este fato resultou em resistência bacteriana devido ao uso indiscriminado de antibióticos (MOTA et al., 2002).

As decisões terapêuticas são comumente realizadas de forma empírica ou baseadas em informações prévias de sensibilidade para o rebanho em questão, pois raramente os médicos veterinários dispõem de recursos como à identificação microbiana, e a susceptibilidade dos agentes para se tomar decisões terapêuticas (OWENS et al., 1997).

A seleção do antimicrobiano apropriado é essencial, tanto do ponto de vista da saúde do animal, quanto da produtividade da glândula mamária. Os resultados dos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos auxiliam o veterinário na escolha do medicamento apropriado (FRANCIS et al., 1989; BRAMLEY et al., 2000).

Para a melhor indicação terapêutica, o ideal é que sejam feitos cultivo, isolamento e antibiograma do agente etiológico da mastite (LANGONI, 1995).

Os antimicrobianos mais recomendados para o tratamento da mastite são: amoxicilina, ampicilina, penicilina, enrofloxacina, estreptomicina, gentamicina, oxitetraciclina, sulfamerazida e tetraciclina (ANDREI, 1999).

Deve-se, entretanto, considerar que nem sempre os resultados “*in vitro*” podem ser totalmente eficazes, pois vários fatores podem interferir no sucesso do tratamento tais como, uma reação tecidual de fibrose, a subdosagem e a produção de leite que diluem o medicamento e dificulta a manutenção de níveis terapêuticos, entre outros fatores (COSTA, 1998).

A resposta ao tratamento de casos de mastite clínica na lactação varia muito; foram obtidas taxas de 40% a 70% de acordo com vários estudos, devido às diferenças na susceptibilidade de vários microrganismos às drogas, duração da infecção antes do tratamento, idade do animal e grau de envolvimento do tecido da glândula (NATZKE, 1981).

Costa et al. (1997) avaliaram a eficácia do tratamento da mastite clínica e subclínica, com base no resultado do perfil de sensibilidade *in vitro*. Para *Staphylococcus* spp sensíveis a gentamicina, a taxa de cura foi de 94,8%; resultados ainda superiores (95,4%), foram obtidos com a cloxacilina com média de taxa de cura de 86,84%.

O *Staphylococcus aureus* possui vários fatores de virulência que contribui para a sua persistência no tecido mamário, como produção de toxinas extracelulares e enzimas (SANTOS et al., 2003; LEE, 2003). De acordo com Hamill et al. (1986), os *Staphylococcus* sp aderem às células endoteliais por meio de receptores de adesinas e são fagocitados por essas. O ambiente intracelular protege os *Staphylococcus* sp dos mecanismos de defesa do hospedeiro, assim como dos efeitos dos antibióticos. Segundo Lowy (1998) estes fatores podem aumentar a sobrevivência bacteriana contribuindo para o desenvolvimento de infecção persistente ou recorrente.

De acordo com Fagundes e Oliveira (2004), *Staphylococcus aureus* é a bactéria causadora de mastite de tratamento mais difícil devido à elevada resistência aos antibióticos. A relação entre o uso de antimicrobianos e a seleção e disseminação de cepas resistentes é aceito internacionalmente e foi descrita pela primeira vez por Lepper em 1954 (FREITAS et al., 2005).

As infecções por bactérias multirresistentes em humanos e animais geralmente são mais difíceis de serem tratadas, aumentando os custos do tratamento quando comparadas às causadas por bactérias suscetíveis (AMYES; GEMMEL, 1997). No Brasil, mais de 70% das cepas de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* mostram-se resistentes às penicilinas, seja em ambiente hospitalar ou na comunidade. O uso destes antimicrobianos não

é mais indicado em infecções por estes microrganismos mesmo que benignas ou de natureza extra-hospitalar (COSTA et al., 1994).

Brito et al. (2001) comprovaram que os *Staphylococcus aureus* isolados de infecções intramamárias bovinas no Brasil (clínicas e subclínicas) foram sensíveis a cefalotina, eritromicina, gentamicina, norfloxacin e oxacilina, 91% resistentes à tetraciclina e a tilosina e 65% a ampicilina e a penicilina e 99% à neomicina. Esses autores afirmam que a resistência à oxacilina é infrequente entre espécimes isolados de glândula mamária bovina. Corrêa (2003) analisou 95 cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva isoladas de leite mastítico bovino e observou que a sulfonamida apresentou o mais alto grau de resistência (80,21%), seguida pela ampicilina (78,94%), penicilina (77,98%) e lincomicina (71,58%). Duas cepas apresentaram resistência a todas as drogas testadas e 48 cepas (50,50%) apresentaram resistência à no mínimo oito drogas. Somente a gentamicina (18,95%) e o sulfametoxazol-trimetropim (24,21%) apresentaram baixos níveis de resistência.

Freitas et al. (2005) avaliaram o perfil de suscetibilidade de 59 espécimes de *Staphylococcus* coagulase positiva isoladas de leite mastítico no estado de Pernambuco e verificaram 100% de sensibilidade à vancomicina e 96% à norfloxacin. Entretanto, observaram cepas com resistência múltipla para seis a nove antibióticos simultaneamente e concluíram que o percentual de multirresistência é preocupante, pois muitos dos antibióticos disponíveis não teriam efeito sobre estes microrganismos dificultando o tratamento dos animais.

Martins et al. (1998) associaram o agravamento da resistência bacteriana ao uso freqüente e indiscriminado de antibióticos e aos mecanismos de transferência de resistência entre os microrganismos. O surgimento de amostras de *Staphylococcus aureus* multirresistentes nas últimas décadas foi relacionado com a pressão seletiva exercida por antimicrobianos (FAGUNDES; OLIVEIRA, 2004).

#### 4. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, M. A. C. **Prevalência de mastite subclínica em bovinos por *Staphylococcus spp* e *Streptococcus spp* na micro região de Garanhuns, Pernambuco.** Recife:

Universidade Federal Rural de Pernambuco, 1997. 48p.

AMARAL, L.A et al. Qualidade da água em propriedades leiteiras como fator de risco à qualidade do leite e à saúde da glândula mamária **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.71, n.4, p.417-421, out./dez. 2004

AMMON, A. Surveillance of enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC) infections and haemolytic uraemic syndrome (HUS) in Europe. **Eurosurveillance**, v.2, n.12, p.91-95, 1997.

AMYES, B.G.S.; GEMMEL, C.G. Antibiotic resistance. Review article. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 46, p. 436-470, 1997.

ANDRADE, M. A. Mastite bovina subclínica: prevalência, etiologia e testes de sensibilidade a drogas antimicrobianas. **Hora Veterinária**, Porto Alegre, v.28, n.1, p.29-42, 1998.

ANDREI, E. **Compêndio veterinário: dicionário brasileiro de medicamentos veterinários.** 30. ed. São Paulo: Andrei. 1999. p.804-805.

BALABAN, N.; RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxin: a review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, . v. 61, p. 1-10, 2000.

BARBALHO, T. C. F. MOTA, R. A. Isolamento de agentes bacterianos envolvidos em mastite subclínica bovina no Estado de Pernambuco. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal** v. 2, n. 2, 2001

BEAN, N.H. et al. Surveillance for foodborne disease outbreaks – United States, 1988 – 1992. **Journal of Food Protection**, Ames, v.60, n.10, p.1265-1286, 1997.

BEAUDEAU, F.; FOURICHON, C.; SEEGER, H. Risk of clinical mastitis in dairy herds with a high proportion of low individual milk somatic-cell counts. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 53, p. 43-54, 2002.

BELOTI, V. et al. Estudo da mastite subclínica em rebanhos leiteiros no norte do Paraná. **Semina**, Londrina, v.18, p.45-53, 1997.

BENITES, N. R. et al. Etiologia e Histopatologia de mastites bovinas de ocorrência espontânea. Revista **Napgama**, São Paulo, n.1, v.4 p.3-8, 2001.

BLOCK, S.S. Definition of terms In: BLOCK, S.S. **Desinfection, sterilization and preservation**. 4. ed. London: Lea & Febiger, 1991. p.18-24.

BODDIE R. L.; NICKERSON, S. C.; ADKINSON, R. W. Efficacies of teat germicides containing 0.5% chlorhexidine and 1% iodine during experimental challenge with *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 80, p. 2809-2814, 1997.

BONFOH, B. et al. Microbiological quality of cow's milk taken at different intervals from the udder to selling point in Bamako (Mali). **Food Control**, Guildford, v.14, n.7, p.495-500, 2003.

BOOTH, J.M. Progress in the control of mastitis. In: INTERNATIONAL MASTITIS SEMINAR, **Tel Aviv. Proceedings...** Tel Aviv: International Dairy Federation, n.3, p.3-11,1995.

BRABES, K. et al. Participação de espécies coagulase positivas e negativas produtoras de enterotoxinas de gênero *Staphylococcus* na etiologia de casos de mastite bovina em propriedades de produção leiteira dos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Revista Napgama**, São Paulo, v.3, p.4-11, 1999.

BRAIRD-PARKER, A. C. The Staphylococci: an introduction. **Journal Applied Bacteriology**, Oxford, v.19, p.15-85, 1990.

BRAMLEY, A.J. J.S. et al. Current Concepts of Bovine Mastitis. **National Mastitis Council**, 4th ed., Madison, Wisconsin, 1996. 64p.

BRASIL Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem animal Brasília, DF 1997.

BRASIL Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 51 de 18 de setembro de 2002. Regulamento técnico 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**, Brasília, DF, 18 de setembro de 2002. Seção 3. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/das/dipoa/in51.htm>>. Acesso em: 24 nov. de 2007.

BRITO, M. A. V. P. et al. Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 51, n.2, p. 33-35, abr. 1999.

BRITO, M. A. V. P.; CAMPOS, G. M. M. de; BRITO, J. R. F. Esquema simplificado para identificação de estafilococos coagulase-positivos isolados de mastite bovina. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n.1, p-79-82, 2002.

BRITO, M.A.V.P. **Resíduos de antimicrobianos no leite**. Juiz de Fora, MG: Embrapa Gado de Leite, 2000. 28p. (Embrapa, gado de leite. Circular técnica, 60).

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

BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J. R. F.; 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, 1999.

BUELOW, K. L. et al. Effect of milk sample collection strategy on the sensitivity and specificity of bacteriologic culture and somatic cell count for detection of *Staphylococcus aureus* intramamary infection in dairy cattle. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam v.16 p. 1-8, 1996.

BUENO V. F. F. et al. Mastite bovina clínica e subclínica, na região de Pirassununga, SP: Frequências e redução na produção. **Ciência Animal Brasileira**, v. 3, n. 2, p. 47-52, jul./dez. 2002

BUENO, V.F.F. et al. Contagem celular somática: relação com a composição centesimal do leite e período do ano no Estado de Goiás. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.4, p.848-854, jul/ago. 2005.

CAMPOS, M. M. C. Avaliação de mastite bovina enfocando o Califórnia Mastitis Test, diagnóstico microbiológico sensibilidade in vitro. Ceará, **Universidade Federal do Ceará**, 2000. 105p.

CARDOSO, H. F. T.; CARMO, L. S.; SILVA, N. Detecção da toxina-1 da síndrome do choque tóxico em amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 52, p. 7-10, 2000.

CARMO, L. S. et al. Staphylococcal food poisoning in Minas Gerais State (Brazil). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 47, p. 113-122, 1995.

CARMO, L. S. et al. *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enteritidis* present em food implicated em food poisoning. **Revista de Microbiologia**. v. 227, p. 122-125, 1996.

CARMO, L.S. Produção e purificação em grande escala das enterotoxinas estafilocócicas SEA, SEB, SEC<sub>2</sub>, SED e TSST-1 para uso em ensaios imuno-enzimáticos. 2001. 254f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

CERÓN-MUÑOZ, M. et al. Factors affecting somatic cells count and their relations with milk and milk constituent yield in buffaloes. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.85. p.2885-2889, 2002.

CERQUEIRA, M.M.O.P. et al. Avaliação da qualidade do leite estocado em tanque de imersão e expansão por 48 horas. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.54, n.309, p.251-254, 1999a.

CERQUEIRA, M.M.O.P. et al. Fatores determinantes na qualidade do leite: estudo de uma indústria de laticínios. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.54, n.309, p.241-245, 1999b.

CHYE, F.Y. et al. Bacteriological quality and safety of raw milk in Malaysia. **Food Microbiology**, v.21, n.5, p.535-541, 2004.

CORRÊA, I. **Resistência a drogas antimicrobianas de cepas de *Staphylococcus coagulase positiva de leite mastítico bovino***. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2003. 58p.

COSTA E. O. A importância econômica da mastite infecciosa bovina. *Com. Cient. Fac. Méd. Vet. Zoot. Univ. São Paulo*, 15:21-6, 1991

COSTA, E. O. et al. Influência da desinfecção mamária pós-ordenha na ocorrência de mastite bovina. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE MEDICINA VETERINÁRIA EM LÍNGUA PORTUGUESA, 1993, Salvador, **Anais...** Salvador, 1993. p.220.

COSTA, L. M. et al. Análise da sensibilidade do *Staphylococcus aureus* hospital aos antimicrobianos no período 1988-1993. In: CONGRESSO BRASILEIRO E INFECTOLOGIA, 8., 1994, Porto Alegre, **Resumo**. Porto Alegre: 1994. p. 87.

COSTA, E.O. et al. Influência da suplementação de selênio na incidência de mastite. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro v.19, p.169-172, 1997.

COSTA, E.O. Importância da mastite na produção leiteira do Brasil. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**. v. 1, p.3-9, 1998.

COSTA, E. O. et al. Mastite subclínica: prejuízos causados e os custos de prevenção em propriedades leiteiras. **Napgama**, São Paulo, n.2, p.16-20, 1999.

COSTA, E. O. Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite (PNMQL). **Napgama**, São Paulo, n.2, p.18-21, 2005.

COWDEN, J.M. et al. Outbreaks of foodborne infectious intestinal disease in England and Wales: 1992 and 1993. **Communicable Disease Report**, v.5, n.8, p.109-117, 1995.

CULLOR, J. S. The control, treatment, and prevention of the various types of bovine mastitis. **Veterinary Medicine**, Lenexa, p.571-579, 1993.

CUNHA, A. P. et al. Perfil de sensibilidade antimicrobiana de agentes contagiosos e ambientais isolados de mastite clínica e subclínica de búfalas. **Arquivo Instituto de Biologia**, São Paulo, v.73, n.1, p.17-21, 2006.

DE BUYSER, M.L. et al. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialized countries. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.67, n.1-2, p.1-17, 2001.

DE FREITAS, M. A. Q.; MAGALHÃES, H. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus aureus* isolados de vacas com mastite. **Revista de Microbiologia**, São Paulo v. 21, p. 315-319, 1990.

DELILLEUX, J. et al., Methods for estimating areas under receiver operating characteristics curves: illustration with somatic-cell scores in subclinical intramammary infections. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v.41, p. 75-88, 1999.

DINGWELL R.T. et al. Association of cow and quarter-level factors at drying-off with new intramammary infections during the dry period. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 63 p. 75-89, 2004.

DINIZ, M.A.P.R. et al. Tratamento de mastite subclínica e clínica, em vacas lactantes, com ácido acetilsalicílico, mastenzin e associação mastenzin com ácido acetilsalicílico. **Hora Veterinária**, Porto Alegre n.18, p.27-33, 1998.

DOHOO, I. R. Setting SCC cutpoints for cow and herd interpretation In: ANNUAL MEETING NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 40., 2001, Reno, **Proceedings Madison**: National Mastitis Council, 2001. p. 10-18.

DOMINGUES, P. F. et al. Relação entre a mastite e estágio de lactação, idade, retenção de placenta e metrite em vacas leiteiras. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 24, n.1, p.22-26, 2002.

DUVAL, J. **Treating mastitis without antibiotics**. 1997. EAP Publication 69.

EDMONDSON, P. W. Estratégias para a produção de leite de alta qualidade. In: CONGRESSO PANAMERICANO DE QUALIDADE DO LEITE E CONTROLE DE

MASTITE, 2., 2002, Ribeirão Preto. **Anais...** São Paulo: Instituto Fernando Costa, 2002. p. 61-69.

ERB, H.N. et al. Rates of diagnosis of six diseases of Holstein cows during 15-day, 21-day, and 30-day interval. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.45, n. 333-335, 1984.

ERSKINE, R. J. et al. Incidence and types of clinical mastitis in dairy herds with high and low somatic cells counts. **Journal American Veterinary Medicine Association**, Shaumburg, v.6, n.192, p-761-765, 1988.

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

FERREIRA, L. M.et al. Variabilidades fenotípica e genotípica de estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas em casos de mastite subclínica bovina. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.4, p-1228-1234, 2006.

FIGUEIREDO, J.B. Mamite bovina: visão panorâmica de uma doença complexa. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 1995, Belo Horizonte: **Anais:...** Belo Horizonte **CBRA**, 1995. v.11.

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

FONSECA, L. F. L. **Estudo da prevalência da mastite bovina e sua relação com práticas de manejo, higiene e terapia em fazendas produtoras de leite tipo B no estado de São Paulo**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1992. 148p.

FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M. V. **Qualidade do leite e controle de mastite**. São Paulo: Lemos Editorial & Gráficos Ltda. 2001, 175 p.

FOSTER, G. et al. *Staphylococcus lutrae* sp. nov., New Coagulase-positive Species isolated from otters. **International Journal of Bacteriology**, Whashington, US, v.47, n.3, p.724-726, 1997.

FRANCIS, P. G. Mastitis Therapy. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária** v.154, p.302-311, 1989.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAFF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2000, 182p.

FREITAS, M.A.Q. Mastite bovina: importância e controle. Circular técnica pesagroriaa, n. 11, p.14, 1998.

FREITAS, M.A.Q.; MAGALHÃES, H. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus aureus* isolados de vacas com mastite. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.21, p.315-19, 1990.

FREITAS, M.F.L. et. al. Perfil da Sensibilidade *in vitro* de *Staphylococcus* coagulase positivos isolados de leite de vacas com mastite no Agreste do Estado de Pernambuco **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v.72, n.2, p.171-177, 2005.

GARINO JR, F. et al. Avaliação da susceptibilidade “in vitro” aos antimicrobianos e pesquisa de produção de b-lactamase de cepas de *E. coli*, isoladas de mastite bovina. **Revista Napgama**, São Paulo, v. 3, n. 2, p. 19-22, 2000.

GOLDBERG, J. J. et al. Evaluation of a 1 percent iodophor postmilking teat sanitizer. **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 77, n. 33, p. 740-747, 1994.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. **Higiene e vigilância sanitária dos alimentos**. São Paulo: Varela, 2001. 629p.

GONZÁLEZ, F.H.D. Composição bioquímica do leite e hormônios da lactação. In: \_\_\_\_\_DÜRR, J.W.; FONTANELI, R.S. (ed.) **Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras**. Porto Alegre: UFRGS, p. 5-22, 2001.

GUNNING R.F.; SHEPHERD P.A. Outbreak of bovine *Mycoplasma bovis* mastitis. **Veterinary Record**, London, v. 139 p.23-24, 1996.

HAMILL, R. J.; VANN, J.M.; PROCTOR R.A. Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by culture bovine aortic endothelial cells: models for postadherence events in endovascular infections. **Infection Immunology**, v. 54, p. 833-836, 1986.

HARMON, R. J. Somatic cell counts a primer In: ANNUAL MEETING NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 2001 p. 3-9.

HARROP, M. H. V. et al. Incidência de mastite bovina na bacia leiteira da zona do Agreste Meridional de Pernambuco. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 10, p. 65-67, 1975.

HIRSH, D.C.; ZEE, Y.C. **Microbiologia veterinária**. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 2003. 446p.

JONES, G. M. Milking practices recommended to assure milk quality and prevent mastitis. Dairy Science: Virginia Cooperative Extension, 1998. p.404-227.

KLOSS, W. E.; LAMBE, JR., D. W. *Staphylococcus*. In: BALOWS, A **Manual of Clinical Microbiology**. 5 ed. Washington, D. C.:Am. Soc. Microbiol., 1991. p.1500-1510.

LADEIRA, S.R.L. Mastite bovina. **In: Doenças de ruminantes e eqüinos**. São Paulo: Liv. Varela, 2001. v. 1, 426 p.

LAFFRANCHI, A. Etiologia das infecções intramamárias em vacas primíparas ao longo dos primeiros quatro meses de lactação. 2000. 37f. Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

LANGENEGGER, H. et al. Estudo da incidência de mastite bovina na bacia leiteira do Rio de Janeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v.5, p.437, 1970.

LANGONI, H. et al. Aspectos etiológicos na mastite bovina: flora bacteriana aeróbica. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro v. 20, p. 204-209, 1998.

LANGONI, H. et al. Etiologia e sensibilidade bacteriana da mastite bovina subclínica. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte v. 43, p. 507-515, 1991.

LANGONI, H. **Etiologia da mastite bovina subclínica e clínica**: Perfil da sensibilidade microbiana, controle e repercussão na produção leiteira e na saúde pública. 1995. 200p. Tese (Livre-Docência) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu.

LEE, J. H. Methicillin (oxacilin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 69, p-6489-6494, 2003.

LOWY, F.D. *Staphylococcus aureus* infections. **New England Journal Medicine**, v. 339, n.8, p. 520-532, 1998.

MARTINS, S.C.S.;FELIX, P. R. ; NASCIMENTO, G. G. F. Isolamento e caracterização de bactérias de diferentes ambientes hospitalares. Perfil da sensibilidade a quimioterápicos. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.12, n.56, p.45-48, 1998.

MATTHEWS, K.R.; HARMON, R.J.; LANGLOIS, B.R. Prevalence of *Staphylococcus* species during the periparturient period in primiparous and multiparous cows. **Journal Dairy Science**, Champaign, v.75, p.1835-1839, 1992.

MEAD, P. S. et al. Food-related illness and death in the United States. **Emerging Infectious Disease**, Atlanta, v. 5, p. 607-625, 1999.

MENDONÇA, C. L.; FIORAVANT, M. C. S.; SILVA, J. A. B. A. Etiologia da mastite bovina. **Veterinária Notícias**, v. 5, n. 1, p. 107-118, 1999.

MOTA, R.A. et al. Etiologia e sensibilidade antimicrobiana in vitro das bactérias isoladas do leite de cabras com mastite procedentes da Região Metropolitana do Recife-PE. In: CONGRESSO PERNAMBUCANO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 4., 2002, Recife. **Anais...** Recife, 2002. p.233-235.

MOTA, R.A.; SÁ, M.E.P.; OLIVEIRA, A.A.F. et al. Mastite bovina por *Prototheca zopfii* no estado de Pernambuco, Brasil. In: ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITE, 3, 1999, Botucatu. **Anais...** Botucatu: UNESP, 1999. p.162.

MOUSSAOUI, F. et al. Mechanisms involved in milk endogenous proteolysis induced by a lipopolysaccharide experimental mastitis. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.85. p.2562-2570, 2002.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL **Current concepts of bovine mastitis**. 2 ed. Whashington, DC, 1978.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL Recommended protocols for evaluating efficacy of postmilking teat germicides: **annual meeting proceedings**. 2004. p.179-399.

NATZKE, R.P. Elements of mastitis control. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.64, p.1431-442, 1981.

NICOLAU, E. S. *et al.* In. uência da mastite subclínica estafilocócica sobre as características físico-químicas e celulares do leite. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 16, p. 35-38, 1996.

NOUT, M. J. R. Fermented foods and food safety. **Food Ressearch International**. v. 27, n. 7, p. 291-298, 1994.

OLIVER, S.P. *et al.* Prevention of bovine mastitis by premilking teat disinfectant containing chlorous acid and chlorine dioxide. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.76, p.287-292, 1992.

OWENS, W.E., *et al.* Comparison of success of antibiotic therapy during lactation and results of antimicrobial susceptibility tests for bovine mastitis. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.80, p.313-317, 1997.

PANKEY, J. W. W. R. J. *et al.* Update on postmilking teat antisepsis **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 67 p.1336, 1984.

PARDO, P.E. *et al.* Etiologia das infecções intramamárias em vacas primíparas no período pós-parto. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.18, p.115-118, 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**, São Paulo, v.70, n.4, p.391-395, out./dez., 2003

PEREIRA, M. L. ; CARMO, L. S. ; PEREIRA, J. L. Comportamento de estafilococcus coagulase negativos produtores de enterotoxinas em alimentos experimentalmente inoculados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, p. 171-175, 2001.

PHILPOT, W.N. Qualidade do leite e controle de mastite: passado, presente e futuro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE E CONTROLE DE MASTITE. 2002. Ribeirão Preto, **Anais...** Ribeirão Preto: Instituto Fernando Costa, 2002. p.23-37.

PHILPOT, W.N.; NICKERSON, S.C. Mastitis: counter attack. Naperville: Babson Bros, 1992. 150p.

PIANTA, C. **Mastite Bovina**: informações ao produtor. Porto Alegre:FEPAGRO, 1997. (Circular técnica nº 15).

PINHEIRO de SÁ M. E. et al. Importância do *Staphylococcus aureus* nas mastites subclínicas: pesquisa de enterotoxinas e toxina do choque tóxico, e a relação com a contagem de células somáticas **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 41 p. 320-326, 2004.

PRESTES, D. S.; FILATI, A.; CECIM, M. S. Suscetibilidade à mastite: fatores que a influenciam- uma revisão. **Revista Faculdade Zootecnia Veterinária e Agronomia**, Araguaiana, v.9, n.1, p-48-59, 2003.

PYORALA, S. New strategies to prevent mastitis. **Reproduction in domestic animals**, Belfast, v.37, n.4, p.211-216, 2002.

QUINN, P. J. et al. **Clinical veterinary microbiology**. London: Wolfe Publishing, 1994. 648p.

RABELLO, R.F. **Susceptibilidade aos antimicrobianos e diversidade genética de amostras de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* isoladas de casos de**

**mastite subclínica no Estado do Rio de Janeiro.** Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2003. 100p.

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

RIBEIRO, A. R. **Influencia da anti-sepsia dos tetos na ocorrência de mastite bovina.** 1996 Dissertação de Mestrado Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

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

RIEDEL, G. **Controle sanitário dos alimentos** 2. ed. São Paulo:Atheneu, 1992. p.173.

RUPP, R.; BEAUDEAU, F.; BOICHARD, D. Relationship between milk somatic-cell counts in the first lactation and clinical mastitis occurrence in the second lactation of French Holstein cows. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam v. 46, p. 99-111. 2000.

SABOUR, P.M. et al. Molecular Typing and Distribution of *Staphylococcus aureus* Isolates in Eastern Canadian Dairy Herds. **Journal of Clinicate Microbiology**, Washington, v.42, p.3449-3455, 2004.

SAMPIMON, O. C. et al. Sensitivity to various antibiotics of coagulase negative staphylococci isolated from samples of milk from Dutch dairy cattle. **Tir Diergeneeskd**; 2007

SANTOS, F. G. B. et al. Tipagem molecular de *Staphylococcus aureus* isolados do leite de vacas com mastite subclínica e equipamentos de ordenha procedentes do estado de Pernambuco. **Revista Nappama**, São Paulo, v. 6, n. 1, p. 19-23, 2003.

SANTOS, M.V. Efeito da mastite sobre a qualidade do leite e dos derivados lácteos In: CONGRESSO PANAMERICANO DE QUALIDADE DO LEITE E CONTROLE DE MASTITE, 2. 2002. Ribeirão Preto. **Anais...** São Paulo: Instituto Fernando Costa, 2002

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

SCHALM, O. W.; NOORLANDER, D. O. Experimental and observation lading to development of California Mastitis Test. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Chicago, v. 139, p. 199-204, 1957.

SENA, M.J. **Perfil epidemiológico, resistência a antibióticos e aos conservantes nisina e sistema lactoperoxidase de *Staphylococcus* sp. isolados de queijos coalho comercializados em Recife-PE**. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000, 75 f.

SHLAES, D. M. et al. Society of Healthcare Epidemiology of America and Infectious Diseases Society of America Joint Committee on the Prevention of Antimicrobial Resistance Guidelines for the prevention of antimicrobial resistance in hospitals. **Clinical Infectious Diseases**, v. 25, p. 584-599, 1997.

SILVA, E. R.; CARMO, L. S.; SILVA, N. Detection of the enterotoxins A, B, and C genes in *Staphylococcus aureus* from goat and bovine mastitis in Brazilian dairy herds. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 106, p. 103-107, 2005.

SILVA, N. et al. Produção da toxina-1 da síndrome do choque tóxico por *Staphylococcus aureus* isolados de leite bovino em Minas Gerais **Revista Nappama**, São Paulo, ano 2, n. 5, p. 12-14, 1999.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 1997, p.295

SIMONE, E. et al. Investigations of foodborne diseases by food inspection services in the Netherlands, 1991 to 1994. **Journal of Food Protection**, Ames, v.60, n.5, p.442-446, 1997.

SOUSA, R. M. et al. Estudo comparativo entre o exame bacteriológico e métodos indiretos para detecção da mastite bovina subclínica. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 1996, Goiânia. **Anais...** Goiânia, 1996. p.122.

STAMFORD T. L. M et al. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus* spp isolados de leite *in natura* **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v.26, n.1 jan/mar. 2006

TAMINE, A.Y.; ROBINSON, R.K. *Yogur: Ciencia y tecnologia*. Zaragoza: Editorial Acribia, 1991. 368p.

TRINDADE, P., NICKERSON, S. C., ALLEY, T. K. Prevalence of intramamary infection and teat canal colonization in umbred and primigravid dairy heifers. **Journal of Dairy Science**, Champaign v.73, p.107-114, 1990.

VALLE, J. et al. Enterotoxin production by staphylococci isolated from healthy goats. **Applied and Environmental Microbiology**, Whashington, US, v. 56, p. 1323-1326, 1990.

VEIGA, V.M.O. **Diagnóstico da mastite bovina**. Juiz de Fora:Embrapa/CNPGL, 1998. (Circular técnica nº 51).

VERAS, J.F. et al. Levantamento de surtos de toxinfecção alimentar envolvendo leite e produtos derivados no estado de Minas Gerais, Brasil. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, p. 218, 2003.

WAAGE, S. et al. A. Bacteria associated with clinical mastitis in dairy heifers. **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 82, n. 4, p. 712-719, 1999.

WALDNER, D.N. et al. **Managing milk composition: normal sources of variation**. Acesso em 20 nov. 2007. Disponível em em: [www.osuextra.com](http://www.osuextra.com)

WARD, P.D. et al. histopatological study of the effects of highly purified staphylococcal alpha and beta toxins on the lactating mammary gland and skin of the rabbit. **Journal of Comparative Pathology**, Edinburgh, v. 89, p.169-177, 1979.

ZADOKS, R. N., W. B. et al. 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. **Journal of Clinical Microbiological** v. 40 p. 3894-3902, 2002.

ZSCHÖCK, M.; RIBE, K.; SOMMERHÄUSER, J. Ocurrência and clonal relatedness of *seclst*-gene positive *Staphylococcus aureus* isolated of quartermilk samples of cows suffering from mastitis. **Letters in Applied Microbiology**, United Kingdom, v. 38, p. 493-498, 2004.

## 5. ARTIGOS

### 5.1. Participação dos *Staphylococcus* spp na etiologia das mastites em bovinos leiteiros no estado de Pernambuco

**RESUMO:** Objetivou-se com este trabalho estimar a ocorrência de bactérias do gênero *Staphylococcus* na etiologia da mastite bovina no estado de Pernambuco. Foram coletadas 1080 amostras de leite procedentes de 15 propriedades situadas em municípios da Região Metropolitana do Recife, Agreste e Zona da Mata do Estado de Pernambuco. Alíquotas de leite foram semeadas em ágar base enriquecido com 5% de sangue ovino e incubadas a 37°C, realizando-se leituras após 24 e 48h. Para identificação bacteriana foram observadas as características morfológicas das colônias além das características morfotintórias à técnica do Gram. Foram realizadas provas bioquímicas como produção de coagulase livre, DNase, catalase, provas de produção de acetoina, fermentação da glicose (anaerobiose) e do manitol (aerobiose e anaerobiose). Das 1080 amostras analisadas, 740 (68,5%) foram positivas ao exame microbiológico e 340 (31,5%) foram negativas. Das amostras positivas, isolaram-se bactérias do gênero *Staphylococcus* em 291 (39,3%), das quais, 170(58,4%) foram classificadas como *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN), 84(28,9%) como *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) e 37(12,7%) como *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP). Os resultados obtidos neste estudo demonstram a elevada participação do gênero *Staphylococcus* na epidemiologia das mastites bovina na região estudada e sugerem a necessidade da capacitação de profissionais para a realização do controle e profilaxia adequados das mastites contagiosas.

Palavras-chave: glândula mamária, microbiologia, epidemiologia, mastites, bovinos.

**Participation of *Staphylococcus* spp in the etiology of mastitis in dairy cows in the state of Pernambuco (Brazil)**

**ABSTRACT:** The purpose of this work was to quantify the occurrence of *Staphylococcus* bacteria in the etiology of bovine mastitis in the state of Pernambuco (Brazil). A total of 1,080 samples were collected from 15 farms located in the Zona de Mata, Agreste, and Metropolitan Recife Regions of Pernambuco. Milk in portions of 10 $\mu$ L were spread on an agar base enriched with 5% sheep's blood and incubated in at 37°C, with readings made at 24 and 48 hours. The morphological characteristics of the colonies were used to identify the bacteria, as well as the morphotintorian characteristics, using the Gram technique. Biochemical tests were made with the production of the free coagulase, DNase, catalysis, acetoin production, glucose fermentation (anaerobiose), and manitol (aerobiose and anaerobiose). Of the 1,080 samples analyzed, 740 (68.5%) were positive upon microbiological examination and 340 (31.5%) negative. The *Staphylococcus* bacteria were isolated in 291 (39.3%) of the samples. Of these, 170 (58.4%) were classified as coagulase negative *Staphylococcus* (SCN), 84 (28.9%) as *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) and 37(12.7%) as coagulase positive *Staphylococcus* (SCP). The results of the present study indicated that *Staphylococcus* spp has a high participation in the epidemiology of bovine mastitis in the region selected and suggests that medium and long-term training take place to prepare specialists to control and prevent contagious mastitis.

**Key words:** mammary gland, microbiology, epidemiological, mastitis, cows.

## INTRODUÇÃO

Entre os processos infecciosos da glândula mamária que interferem na qualidade do leite, destaca-se a mastite que é considerada uma das principais enfermidades que causam prejuízos à indústria leiteira, apesar dos inúmeros esforços voltados para o seu controle (PEDRINI; MARGATHO, 2003; FREITAS et al., 2005). É uma enfermidade plurietiológica e multifatorial que acomete a maior parte do rebanho leiteiro e causa problemas em toda cadeia produtiva, inclusive ao consumidor que poderá ter um produto final de qualidade inferior (COSTA, 1999).

Estudos epidemiológicos sobre a etiologia da mastite bovina revelam que os microrganismos de origem contagiosa são os mais prevalentes e entre estes, o gênero *Staphylococcus* destaca-se por possuir maior frequência em casos clínicos e subclínicos da doença, sendo o *Staphylococcus aureus* a espécie de maior relevância para a indústria leiteira (ZSCHÖCK et al., 2000).

De acordo com Pinheiro Sá et al. (2004) os estafilococos são importantes agentes causadores de mastites, sendo o *Staphylococcus aureus*, responsável por mastites clínicas e subclínicas. As taxas de isolamento são variáveis, contudo o mesmo tem sido considerado como de maior significado nas infecções intramamárias, além de possuir o tratamento mais difícil devido à elevada resistência aos antibióticos (FAGUNDES e OLIVEIRA, 2004). O índice de isolamento do *Staphylococcus aureus* pode ser diferente de acordo com a literatura consultada, variando entre 9,1 e 85% (NADER FILHO, 1985; LANGENEGGER et al., 1986; DE FREITAS, 1990; BELOTI et al., 1997).

As espécies coagulase negativas comumente isoladas no leite bovino são consideradas como patógenos secundários e podem causar reações inflamatórias moderadas na glândula mamária (BRAMLEY et al., 1996). Em pesquisa realizada por Benites et al. (2001) sobre o aspecto microbiológico do parênquima mamário de vacas leiteiras submetidas ao abate, das 140 amostras analisadas, 54,29% pertenciam ao grupo dos *Staphylococcus* coagulase negativo.

Além de proporcionar prejuízos à indústria leiteira, os microrganismos isolados nos casos de mastites proporcionam riscos à Saúde Pública. Sabe-se que a intoxicação estafilocócica não é de notificação compulsória e desta forma é inviável precisar a sua real incidência. Mead et al. (1999) estimaram nos EUA a ocorrência de 185.060 casos anuais. Segundo Fagundes e Oliveira (2004), no Brasil não existem estatísticas disponíveis sobre o assunto, entretanto são frequentes os casos de doenças associadas ao consumo de leite contaminado. De acordo com este mesmo autor o *S. aureus* encontra-se amplamente

distribuído nos rebanhos leiteiros, sendo que a probabilidade de contaminação do leite cru com a conseqüente produção de enterotoxinas é elevada.

Um dos principais indicadores de enterotoxigenicidade é o teste da coagulase, porém alguns estafilococos coagulase negativa são produtores de enterotoxinas e estes dados são importantes para a Saúde Pública devido aos riscos de intoxicações (UDO et al., 1999; RAPINI et al., 2003).

Ainda em relação à Saúde Pública, vários estudos foram realizados no Brasil demonstrando a importância dos *Staphylococcus* produtores de enterotoxinas responsáveis por toxinfecções alimentares (DE FREITAS; MAGALHÃES, 1990; BRABES et al., 1999; CARDOSO; SILVA, 2000; FAGUNDES; OLIVEIRA, 2004; ZSCHÖCK et al., 2004; PINHEIRO DE SÁ et al., 2004; SILVA; CARMO; SILVA, 2005).

Considerando a importância desta enfermidade e a carência de dados epidemiológicos na região estudada, objetivou-se com este trabalho estudar a participação dos *Staphylococcus* spp na etiologia de casos de mastite bovina em propriedades leiteiras no estado de Pernambuco, contribuindo desta forma com informações epidemiológicas que poderão auxiliar no diagnóstico da situação e no controle desta doença.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Foram analisadas 1080 amostras de leite bovino de quartos mamários procedentes de 15 propriedades de exploração leiteira situadas nos municípios da Região Metropolitana do Recife, Agreste e Zona da Mata do estado de Pernambuco. Os rebanhos eram constituídos de animais de várias raças, idades e encontravam-se em diferentes estágios de lactação. Eram criados em sistema intensivo ou semi-intensivo e submetidos à ordenha mecânica e/ou manual.

As amostras foram coletadas após prévia lavagem do teto com água e sabão, secagem com papel toalha e anti-sepsia do óstio com álcool a 70°GL. Coletaram-se 5 mL de leite em frascos com tampa rosqueável, esterilizados e previamente identificados com o nome ou número do animal e quarto mamário, sendo devidamente enviadas ao laboratório em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável para o processamento.

Alíquotas de leite foram semeadas em ágar base enriquecido com 5% de sangue ovino e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C, realizando-se leituras após 24, 48h e 72 h, observando-se as características morfológicas das colônias como tamanho, tipo, coloração e

presença de hemólise. Ao microscópio foram observadas a disposição das células e características morfológicas à técnica do Gram (CARTER, 1998).

Para a identificação dos isolados de *Staphylococcus* spp foram realizadas provas bioquímicas como produção de coagulase livre, DNase e catalase, segundo Silva et al. (1997). As provas de produção de acetoina, fermentação da glicose (anaerobiose) e do manitol (aerobiose e anaerobiose) foram realizadas de acordo com Mac Faddin (1980).

Após a realização das provas, os isolados foram classificados em *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), quando positivo em todos os testes, *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP), quando positivo para a produção da coagulase, fermentação da glicose em anaerobiose e catalase, mas negativo em algum dos outros testes. Em *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN) quando a bactéria não coagulava o plasma de coelho, apresentava características de estafilococos na técnica de coloração de Gram, fermentava a glicose em anaerobiose e produzia a catalase (BAIRD-PARKER, 1990).

A análise estatística utilizada foi do tipo descritiva, calculando-se as frequências absoluta e relativa dos isolados de acordo com Sampaio (1998).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 1080 amostras analisadas, 740 (68,5%) foram positivas ao exame microbiológico, enquanto que 340 (31,5%) foram negativas. Das amostras positivas, isolaram-se bactérias do gênero *Staphylococcus* em 291 (39,3%). Costa et al. (2000) em levantamento realizado sobre a etiologia das mastites bovinas nas sete principais bacias leiteiras do Estado de São Paulo, verificaram que microrganismos do gênero *Staphylococcus* apresentaram alto índice de ocorrência em todas as regiões estudadas. Barbalho e Mota (2001) avaliaram 104 amostras de leite provenientes de 43 animais e demonstraram que as bactérias do gênero *Staphylococcus* spp foram isoladas em 50 amostras, correspondendo a 38,8%, valor este similar ao encontrado neste estudo. Os mesmos autores relataram que este patógeno continua sendo o agente mais frequentemente isolado neste tipo de infecção, representando grande importância epidemiológica e clínica nas mastites bovinas. Segundo revisão realizada por Freitas et al. (2005), bactérias deste gênero possuem vários fatores de virulência contribuindo desta forma para sua persistência no tecido mamário e, embora medidas preventivas que visam o controle das mastites sejam amplamente praticadas, as mastites causadas por este patógeno ainda são bastante frequentes.

Dos 291 isolados, 170(58,4%) foram classificadas como *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN), 84(28,9%) como *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) e 37(12,7%) como *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP). Pitkälä et al. (2004) observaram que o agente etiológico mais prevalente nos casos de mastite bovina na Finlândia foi o SCN com (49,6%) percentual que aproxima-se do encontrado neste estudo para os SCN. Recentemente, os estafilococos coagulase negativa têm recebido maior destaque como agentes causadores de infecções intramamárias em bovinos leiteiros em todo o mundo (HARMON & LANGLOIS, 1989; BRAMLEY et al., 1996; GENTILINI et al., 2002).

Com relação aos *Staphylococcus* coagulase negativos, diversos estudos foram realizados quanto a prevalência destes agentes em rebanhos leiteros. Nos EUA, a variação das infecções por SCN no pré e pós parto foi de 11.0 a 57.8% (MATTHEWS et al., 1992). No Brasil, Pardo et al. (1998) e Laffranchi (2000) encontraram 35.29% e 68,05% de ECN, respectivamente.

Em pesquisa realizada por Benites et al. (2001) sobre o aspecto microbiológico do parênquima mamário de vacas leiteiras submetidas ao abate, das 140 amostras analisadas, 54,29% pertenciam ao grupo dos *Staphylococcus* coagulase negativo.

Beloti et al. (1997) estudaram 503 vacas no estado do Paraná e encontraram uma positividade para a mastite em 29,82% do total de 295 quartos mamários. O *Staphylococcus aureus* esteve presente em 17,95% das amostras e os coagulase negativos em 12,54%.

A importância do gênero *Staphylococcus* spp ficou também evidente para Langoni et al. (1991) que trabalharam com 7902 e 850 amostras de leite e isolaram de *S.aureus* em 22,48% dos casos clínicos e em 11,38% dos subclínicos.

Brabes et al. (1999) relataram que em levantamentos epidemiológicos nacionais e internacionais, o *Staphylococcus aureus* está presente em cerca de 50% das infecções da glândula mamária dos bovinos leiteiros.

Segundo Brito et al. (1999) bactérias do gênero *Staphylococcus* ocupam um papel de destaque na etiologia das infecções intramamárias do gado leiteiro, sendo a espécie *S. aureus* considerada um patógeno primário e tem sido o agente mais frequentemente isolado tanto de infecções clínicas como subclínicas. Embora existam diferenças, às vezes marcantes, entre os resultados obtidos nos diferentes estudos, este agente pode ser considerado como o de maior prevalência na etiologia das mastites, atribuindo a estas diferenças, aspectos referentes à raça, idade, fatores ambientais e os de manejo na criação, além de que muitos casos tratam de estudos retrospectivos com números de amostras diferentes.

Considerando que a principal via de transmissão dessa bactéria são as mãos dos ordenhadores e equipamentos de ordenha, as medidas de controle e profilaxia para reduzir o índice de isolamento do *Staphylococcus* devem ser direcionadas para atuar no ponto crítico da disseminação desse agente que está relacionado ao processo de ordenha.

Alguns fatores de risco associados às mastites contagiosas foram identificados em 100% das propriedades visitadas neste estudo como a falta de informação dos ordenhadores sobre a doença, deficiências na realização do pré e pós-dipping, falta de lavagem e desinfecção das mãos, falta de controle de moscas e inexistência da linha de ordenha. Em 13,3% das propriedades, os animais com mastite clínica eram ordenhados no mesmo lote dos animais clinicamente sadios, constituindo como importante fonte de infecção.

A despeito da participação de bactérias do gênero *Staphylococcus* isolada das mãos de ordenhadores e equipamentos de ordenha, no processo inflamatório da glândula mamária de bovinos, Silveira Filho (2005), relataram a importância desta bactéria quando encontraram um mesmo perfil genotípico entre um isolado de *Staphylococcus aureus* procedente do equipamento de ordenha e de animais com infecção subclínica em um mesmo rebanho no estado de Pernambuco. Considerando os resultados obtidos neste estudo quanto a alta frequência de isolamento de *S. aureus* (39,3%), acredita-se que o controle das mastites só poderá obter sucesso com a implantação de medidas que instruem os ordenhadores por meio da educação continuada, além da adoção de outras medidas.

Santos e Fonseca (2006) destacam que do ponto de vista epidemiológico, a maior incidência de casos de mastite causada por agentes contagiosos no rebanho, indica falhas no sistema de ordenha, período onde geralmente ocorre a transmissão desses agentes durante a ordenha manual ou mecânica. Ainda de acordo com estes autores, os principais métodos indicados para o controle desta seriam a diminuição da exposição dos animais aos agentes (manejo de ordenha, treinamento dos ordenhadores, desinfecção das teteiras, desinfecção da superfície dos tetos), aumento da resistência imunológica da vaca e antibioticoterapia.

Outro aspecto importante observado neste estudo foi a utilização de antimicrobianos e desinfetantes de forma inadequada e por longos períodos sem a realização de testes laboratoriais que comprovem a eficácia do antibiótico utilizado no tratamento das mastites clínica e subclínica e também dos desinfetantes utilizados no “pré e pós-dipping”. Este fato pode comprometer o controle e a profilaxia das mastites causadas por *Staphylococcus* spp. pois, estes podem tornar-se resistentes em consequência do uso indiscriminado dos produtos. Em 20% das propriedades também foi observado a presença de mastite crônica fato que pode

estar associado ao tratamento inadequado dos casos clínicos e subclínicos com o emprego de drogas para as quais as bactérias são resistentes.

## **CONCLUSÃO**

Os resultados obtidos neste estudo demonstram a elevada ocorrência do gênero *Staphylococcus* na epidemiologia das mastites bovina na região estudada e sugerem a necessidade de treinamentos a médio e longo prazo para capacitar os profissionais para a realização do controle e profilaxia adequados das mastites contagiosas.

## REFERÊNCIAS

- BAIRD-PARKER, A.C. The *Staphylococci*: an introduction. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford v.19, p.15-85, 1990. Supplement.
- BARBALHO, T. C. F. MOTA, R. A. Isolamento de agentes bacterianos envolvidos em mastite subclínica bovina no Estado de Pernambuco. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal** v. 2, n. 2, 2001
- BELOTI, V. et al. Estudo da mastite subclínica em rebanhos leiteiros no norte do Paraná. **Semina Ciências Agrárias**, Londrina, v. 18, n. 1, p. 45-53, Mar.1997.
- BENITES, N.R. et al. Etiologia e histopatologia das mastites bovinas de ocorrência espontânea **Revista Núcleo de Apoio à Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira**. São Paulo, v.4, n.1, p. 3-8, 2001.
- BRABES, K. C. S. et al. Participação de espécies coagulase positivas e negativas produtoras de enterotoxinas do gênero *Staphylococcus* na etiologia de casos de mastite bovina em propriedades de produção leiteira dos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Napgama**, São Paulo, v. 2, n. 3, p. 4-5, 1999.
- BRAMLEY, A. J. et al. Current concepts of bovine mastitis. 4 ed. Madison: National Mastitis Council, 1996. 64p
- BRITO, M. A. V. P. et al. Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 51, n.2, p. 33-35. apr. 1999.

CARDOSO, H. F. T.; CARMO, L. S.; SILVA, N. Detecção da toxina-1 da síndrome do choque tóxico em amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte v.52, p.7-10, 2000.

CARTER G.R. Fundamentos de bacteriologia e micologia veterinária. São Paulo: Roca, 1988. 250 p.

COSTA, E. O. et al. Escore de CMT em relação ao nível de células somáticas em leite do tanque de refrigeração e percentual de mastite subclínica em propriedades leiteiras de São Paulo e Minas Gerais. **Napgama**, São Paulo, v. 3, n. 2, p. 14-18, 2000.

COSTA, E. O. et al. Mastite subclínica: prejuízos causados e os custos de prevenção em propriedades leiteiras. **Napgama**, São Paulo, n.2, p.16-20, 1999.

DE FREITAS, M. A. Q.; MAGALHÃES, H. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus aureus* isolados de vacas com mastite. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 21, p. 315-319 1990.

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

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

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

HARMON, R. J.; LANGLOIS, B. E. Mastitis due to coagulase negative *Staphylococcus* species. **Agri-Practice**, Santa Barbara, v.10, n.1, p.29-34, 1989.

LAFFRANCHI, A. Etiologia das infecções intramamárias em vacas primíparas ao longo dos primeiros quatro meses de lactação. 2000. 37f. Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

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

LANGONI, H. et al. Etiologia e sensibilidade bacteriana da mastite bovina subclínica **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 43, n. 6, p. 507-515, 1991.

MAC FADDIN, J.F. Biochemical test for identification of medical bacteria. 2. ed. Baltimore: Williams; Wilkins, 1980. 527p.

MAGALHÃES, H .R. et al. Influência de fatores de ambiente sobre a contagem de células somáticas e sua relação com perdas na produção de leite de vacas da raça Holandesa. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v.35, n.2, p.415-421, 2005.

MATTHEWS, K.R.; HARMON, R.J.; LANGLOIS, B.R. Prevalence of *Staphylococcus* species during the periparturient period in primiparous and multiparous cows. **Journal Dairy Science**, Champaign, v.75, p.1835-1839, 1992.

MEAD, P. S. et al. Food-related illness and death in the United States. **Emerging Infectious Disease**, Atlanta, v. 5, p. 607-625, 1999.

NADER FILHO, A. et al. Prevalência e etiologia da mastite bovina na região de Ribeirão Preto, São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Brasília, DF, v. 5. p. 53-56, 1985.

PARDO, P.E. et al. Etiologia das infecções intramamárias em vacas primíparas no período pós-parto. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.18, p.115-118, 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**, São Paulo, v.70, n.4, p.391-395, out./dez., 2003

PINHEIRO SÁ M. E. et al. Importância do *Staphylococcus aureus* nas mastites subclínicas: pesquisa de enterotoxinas e toxina do choque tóxico, e a relação com a contagem de células somáticas **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 41, p. 320-326, 2004.

PITKÄLÄ, A. et al.; Bovine Mastitis in Finland 2001 – prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. **Journal Dairy Scienc**, v. 87, p. 2433-2441, 2004.

RAPINI, LS. et al. Perfil antimicrobiano de cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas de leite cru de cabra, queijo e manipuladores. **Revista Higiene Alimentar**, v.17, p.162, 2003.

SAMPAIO, I.B.M. Estatística aplicada à experimentação animal. Belo Horizonte: UFMG, 1998. 221p.

SANTOS, M. V., FONSECA, L. F L. Estratégias para Controle de Mastite e Melhoria da Qualidade do Leite. Barueri : Editora Manole, 2006, v.1. p.314.

SILVA, E. R.; CARMO, L. S.; SILVA, N. Detection of the enterotoxins A, B, and C genes in *Staphylococcus aureus* from goat and bovine mastitis in Brazilian dairy herds. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 106, p. 103-107, 2005.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 1997 p.295.

SILVEIRA FILHO V. M. et al. Estudo epidemiológico molecular de *Staphylococcus aureus* associados à mastite bovina provenientes do estado de Pernambuco, Brasil. **Revista Nappama**, São Paulo, v.8, n.1, p.12-17, 2005.

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

ZSCHÖCK, M. et al. Detection of genes for enterotoxins (ent) and toxic shock syndrome toxin-1 (tst) in mammary isolates of *Staphylococcus aureus* by polymerase-chain-reaction. **International Dairy Journal**, Berling v. 10, p. 569-574, 2000.

ZSCHÖCK, M.; RIBE, K.; SOMMERHÄUSER, J. Ocurrence and clonal relatedness of *seclst*-gene positive *Staphylococcus aureus* isolated of quartermilk samples of cows suffering from mastitis. **Letters in Applied Microbiology**, United Kingdon, v. 38, p. 493-498, 2004.

## **5.2. Avaliação “*in vitro*” da eficácia dos desinfetantes comerciais utilizados no pré e pós-dipping frente a amostras de *Staphylococcus* spp isolados de mastite bovina**

**RESUMO:** objetivou-se com este estudo avaliar a sensibilidade “*in vitro*” de bactérias do gênero *Staphylococcus* frente a alguns desinfetantes comerciais utilizados no pré e pós dipping em vacas leiteiras. Foram testados um total de 60 isolados de *Staphylococcus* spp identificados em *S. aureus* (50) e *Staphylococcus* coagulase positiva (10) recuperados de glândulas mamárias de vacas com mastite subclínica procedentes das regiões Metropolitana do Recife, Agreste e Zona da Mata do Estado de Pernambuco. O estudo da eficácia dos desinfetantes utilizados no pré e pós-dipping foi realizado utilizando-se os seguintes princípios ativos: cloro (2,5%), iodo (0,57%), clorexidine (2,0%), amônia quaternária (4,0%) e ácido láctico em quatro tempos distintos (15”, 30”, 60” e 300”). Observou-se que 100% dos *S. aureus* foram sensíveis ao iodo, 93,3% sensíveis a clorexidine, 80% sensíveis a amônia, 35,6% sensíveis ao ácido láctico e 97,8% resistentes ao cloro no tempo de 60”. Com relação aos SCP, 100% dos isolados foram sensíveis ao iodo, 81,8% sensíveis a amônia quaternária, 99,9% sensíveis ao ácido láctico, 72,7% sensíveis a clorexidine e 100% resistentes ao cloro no tempo de 60”. Conclui-se que a maior atividade desinfetante *in vitro* foi verificada para o iodo e clorexidine para os *S. aureus* e do iodo e ácido láctico para dos SCP e que há necessidade de avaliação periódica dos desinfetantes utilizados nas propriedades leiteiras nas regiões estudadas, pois, existem variações no perfil de sensibilidade e resistência aos desinfetantes que podem comprometer os programas de controle da mastite bovina causada pelo *Staphylococcus* spp.

**Palavras chave:** desinfetantes, mastite, *Staphylococcus*, bovinos

***In vitro* evaluation of the efficacy of commercial disinfectants used in pre and post-dipping against *Staphylococcus* spp isolated from bovine mastitis.**

**ABSTRACT:** The goal of this research was to evaluate the *in vitro* sensibility of *Staphylococcus* bacteria to several commercially available disinfectants used in pre and post dipping. A total of 60 isolates of *Staphylococcus* spp, identified as *S. aureus* (50) and Positive coagulase *Staphylococcus* (10), were obtained from the mammary glands of dairy cows with subclinical mastitis in the regions of Metropolitan Recife, the Agreste and the Zona da Mata of the State of Pernambuco (Brazil). The study of the efficacy of the desinfectants used in the pre and post dipping was carried out using the following active ingredients: a chlorine base (2.5%), iodine (0.57%), chlorhexidine (2.0%), quaternary ammonium (4.0%), and lactic acid at four specific intervals (15", 30", 60", and 300"). One hundred percent of the *S. aureus* were found to be sensitive to iodine, 93.3% sensitive to chlorhexidine, 80% sensitive to ammonia, 35.6% sensitive to lactic acid, and 97.8% resistant to chlorine at the 60-minute interval. With respect to the SCP, 100% of the isolates were sensitive to iodine, 81.8% to quaternary ammonium, 99.9% sensitive to lactic acid, 72.7% sensitive to chlorhexidine and 100% resistant to chlorine at the interval of 60 minutes. It may be concluded that the greatest disinfectant activity *in vitro* was found to be with iodine and chlorhexidine for *S. aureus*, and with iodine and lactic acid for SCP. A further conclusion is that it is important to undertake a periodic evaluation of the disinfectants used on the dairy properties in the regions studied, given the variety of sensibilities and resistance to disinfectants used, which may prejudice the control of bovine mastitis caused by *Staphylococcus* spp.

**Key words:** disinfectants, mastitis, *Staphylococcus*, dairy cows.

## INTRODUÇÃO

A desinfecção é um dos mais importantes aspectos de prevenção de enfermidades e neste contexto muitos desinfetantes foram desenvolvidos especificamente para a prevenção das doenças na indústria leiteira (BODDIE et al., 1997).

Os programas de controle da mastite bovina incluem diferentes estratégias para reduzir a prevalência para níveis economicamente aceitáveis uma vez que a erradicação desta enfermidade não se mostra como uma meta viável (NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 1978; COSTA, 1991).

A infecção da glândula mamária dos bovinos pode ser controlada com a utilização de substâncias germicidas nas tetas antes e após a ordenha, antibioticoterapia no período de secagem, eliminação dos casos crônicos, tratamento dos casos clínicos durante a lactação e o adequado funcionamento dos equipamentos de ordenha (PHILPOT; NICKERSON, 1992).

Desta forma, a utilização de soluções antisépticas tendem a controlar e até mesmo diminuir os riscos de novas infecções da glândula mamária. Entretanto, os desinfetantes podem apresentar pouca eficiência quando na presença de matéria orgânica, sujidades ou urina, dificultando desta forma a atuação eficaz do produto (PANKEY et al., 1984; QUINN, 1991).

Os princípios ativos mais utilizados para desinfecção dos tetos são iodo, clorexidina, ácido sulfônico, cloro, peróxidos, lauridina e ácido cloroso. Com objetivo de diminuir a irritação e condicionar a pele dos tetos, são utilizadas algumas bases e emolientes na formulação desses germicidas, como a glicerina, lanolina, propilenoglicol, sorbitol, óleos vegetais, minerais e colágeno (SANTOS, FONSECA; 2006).

Costa et al. (1998) destacaram a importância do uso adequado dos desinfetantes no controle das mastites uma vez que a presença de matéria orgânica determinou acentuada diminuição na eficiência dos mesmos.

Vários trabalhos demonstraram a eficiência dos desinfetantes na redução dos casos de mastite subclínica quando utilizados de maneira adequada (GOLDBERG et al. 1994; FREITAS, 1998; JONES 1998; BRITO, 2000).

Diversas medidas devem ser tomadas durante o processo de ordenha para minimizar a transmissão de agentes causadores de mastites que podem ser transferidos ao leite depreciando sua qualidade microbiológica. Destacam-se a ordenhadeira, a mão do ordenhador e lesões nos tetos que são fatores importantes que expõem a superfície dos tetos aos microrganismos (AMARAL et al., 2004). A higienização prévia dos tetos previne doenças

como a mastite e é de grande importância para reduzir o número de microrganismos patogênicos no leite e melhorar as condições higiênicas do mesmo (NADER FILHO et al., 1982).

Considerando a importância da correta escolha do produto desinfetante para o uso na desinfecção dos tetos, realizou-se o presente trabalho com objetivo de determinar a eficiência dos princípios ativos: iodo, cloro, clorexidine, amônia quaternária e ácido láctico utilizados no pré e pós-dipping para controle de mastites bovinas causadas por *Staphylococcus* spp em propriedades leiteiras nas regiões Metropolitana do Recife, Agreste e Zona da Mata do estado de Pernambuco.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Foram estudadas 60 isolados de *Staphylococcus* spp recuperados de leite bovino de casos de mastite subclínica procedentes de 15 propriedades de exploração leiteira em 13 municípios da Região Metropolitana do Recife(02), Agreste(08) e Zona da Mata(03) do estado de Pernambuco. Os rebanhos eram constituídos de animais de várias raças, idades e encontravam-se em diferentes estágios de lactação, criados em sistema intensivo ou semi-intensivo, com sistemas de ordenhas mecânica e/ou manual.

As amostras de leite foram coletadas após prévia lavagem do teto com água e sabão, secagem com papel toalha e anti-sepsia do óstio do teto com álcool a 70°GL. Coletaram-se 5mL de leite, em frascos com tampa rosqueável, esterilizados e previamente identificados com o nome ou número do animal e quarto mamário, sendo devidamente enviadas, em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável, ao Laboratório de Doenças Infecto-Contagiosas da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

No laboratório, alíquotas das amostras de leite foram semeadas em placas de petri contendo ágar base enriquecido com 5% de sangue ovino e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C, realizando-se leituras após 24 e 48h, sendo observadas as características morfológicas das colônias como tamanho, tipo, coloração e presença de hemólise. Ao microscópio, foram observadas a disposição das células e características morfotintórias ao teste de Gram (CARTER, 1988).

Para a identificação dos isolados de *Staphylococcus* spp foram realizadas provas bioquímicas como produção de coagulase livre, DNase e catalase, segundo Silva et al. (1997). As provas de produção de acetoína, fermentação da glicose (anaerobiose) e do manitol (aerobiose e anaerobiose) foram realizadas de acordo com Mac Faddin (1980).

Após a realização dos testes, os isolados foram classificados em *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), quando positiva em todos os testes, *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP), quando positiva para a produção da coagulase, fermentação da glicose em anaerobiose e catalase, mas negativa em algum dos outros testes. (BAIRD-PARKER, 1990).

A determinação da eficácia dos desinfetantes utilizados no pré e pós-dipping foi realizado utilizando-se os seguintes princípios ativos: iodo na concentração de (0,57%), ácido láctico, clorexidine (2,0%), cloro (2,5%) e amônia quaternária (4,0%), sendo as diluições realizadas conforme orientação dos fabricantes.

Para a análise foram preparadas suspensões bacterianas homogêneas em solução salina estéril correspondendo ao tubo 1 da escala de Mc Farland.

A suspensão constituiu da solução desinfetante (0,8 mL) diluída de acordo com o fabricante e o leite estéril (0,2 mL). Posteriormente, adicionou-se a suspensão bacteriana (1,2 mL) e cronometrou-se os tempos (15", 30", 60" e 300") de exposição para então realizar repique em caldo Brain Heart Infusion (BHI).

A mistura foi incubada a 37°C durante 24 horas para verificar a turvação do meio, formação de película na superfície ou de precipitado no fundo dos tubos. Após a incubação, a suspensão foi repicada em meio sólido (ágar sangue) para confirmação da presença ou ausência do microrganismo testado frente aos diferentes anti-sépticos e tempo de exposição. A ausência do crescimento bacteriano nas placas indicou a eficácia do produto em questão (COSTA, 1998).

A análise estatística foi do tipo descritiva, calculando-se as frequências absoluta e relativa (SAMPAIO, 1998).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Nas figuras 1 e 2 encontram-se os resultados do perfil de sensibilidade e resistência dos *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* coagulase positiva frente as soluções de desinfetantes utilizadas para o pré e pós-dipping.

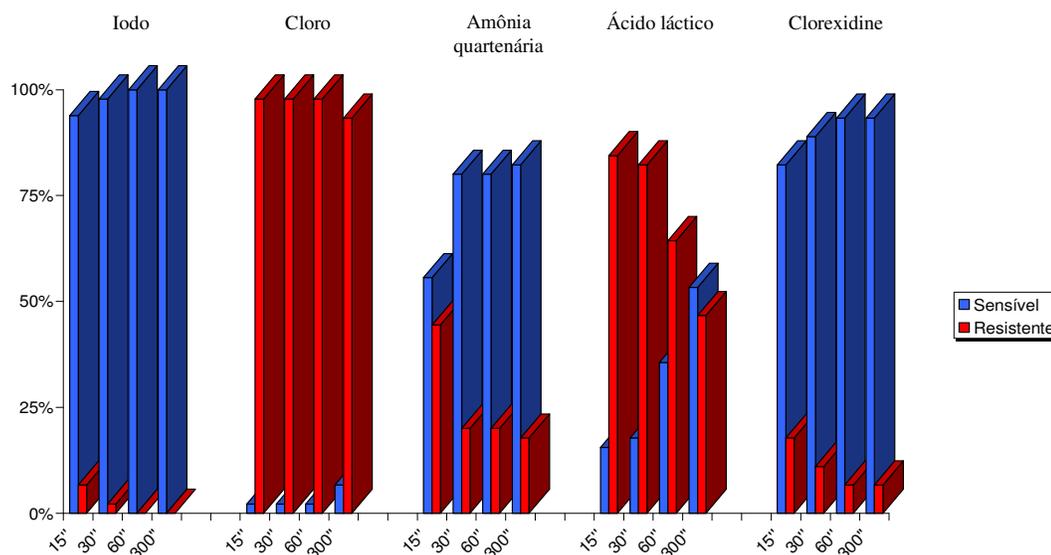


Figura 1 – Eficácia *in vitro* dos desinfetantes utilizados no pré e pós-*dipping* em propriedades leiteiras frente a isolados de *Staphylococcus aureus* em casos de mastite bovina na Região Metropolitana do Recife, Agreste e Zona da Mata do Estado de Pernambuco

O perfil de sensibilidade dos *Staphylococcus aureus* frente ao iodo nos tempos de 15'', 30'', 60'' e 300'' foi de 93,90%, 97,80%, 100,00% e 100,00%, respectivamente. Quanto ao cloro, observou-se que apenas 2,20%, 2,20%, 2,20% e 6,70% foram sensíveis nos diferentes tempos estudados. Já para a amônia quaternária, os isolados apresentaram 55,60%, 80,00%, 80,00% e 82,20%. Com relação ao ácido láctico, observou-se que 15,60%, 17,80%, 35,60% e 53,30% das amostras foram sensíveis. Ainda com relação ao clorexidine, observou-se que 82,20%, 88,90%, 93,30% e 93,30% dos isolados foram sensíveis nos tempos estudados.

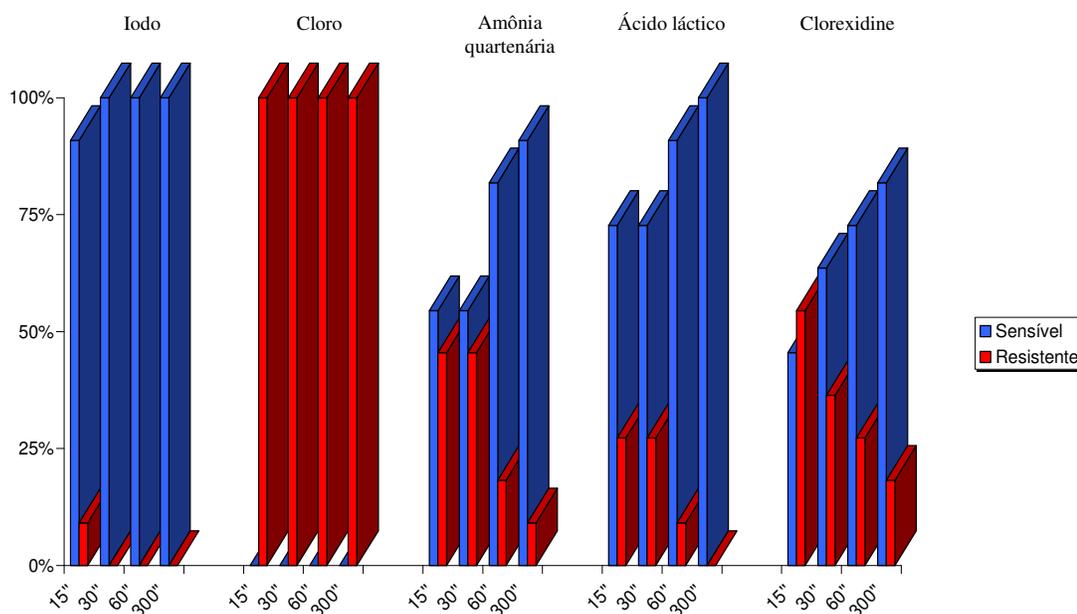


Figura 2- Eficácia *in vitro* dos desinfetantes utilizados no pré e pós-*dipping* em propriedades leiteiras frente a isolados de SCP em casos de mastite bovina na Região Metropolitana do Recife, Agreste e Zona da Mata do Estado de Pernambuco

O perfil de sensibilidade dos *Staphylococcus* Coagulase Positiva frente ao iodo nos tempos de 15", 30", 60" e 300" foi de 90,90%, 100,00%, 100,00% e 100,00%, respectivamente. Quanto ao cloro, observou-se que 100,00% dos isolados foram resistentes em todos os tempos estudados. Já para a amônia quaternária, os isolados apresentaram 54,50%, 54,50%, 81,80% e 90,90% de sensibilidade. Com relação ao ácido láctico, observou-se que 72,70%, 72,70%, 90,90% e 100,00% das amostras foram sensíveis. Ainda com relação ao clorexidine, observou-se que 45,50%, 63,60%, 72,70% e 81,80% dos isolados foram sensíveis nos tempos estudados.

Os resultados obtidos neste estudo indicaram maior atividade desinfetante *in vitro* do iodo e da clorexidine para os *Staphylococcus aureus* e iodo e ácido láctico para os SCP.

Resultados semelhantes foram obtidos por Pedrini e Margatho (2003) que analisaram microrganismos causadores de mastites contagiosa e ambiental e observaram que as soluções de iodo a 2% e a 1% apresentaram melhor desempenho contra todos os microrganismos testados, destacando-se também a ação da clorexidina que apresentou bons resultados *in vitro*. Jones (1998) relataram que soluções de iodo devem ser utilizadas em imersão de tetos em baixas concentrações (0,5% ou menos), uma vez que soluções a 1% de iodo podem deixar resíduos no leite.

Os resultados deste estudo também revelaram que a ação do iodo, ácido láctico e clorexidine foram maiores quanto maior o tempo de exposição. O clorexidine é bastante utilizado para o tratamento de infecções superficiais de tetos em vacas devido ao seu efeito cumulativo e contínuo, permanecendo na pele no mínimo por seis horas (SPINOSA et al., 2002), além disso atua na presença de matéria orgânica, é de fácil aplicação e econômico. De acordo com Phillips et al. (1991) quando comparado ao iodo, o clorexidine causa menor reação tecidual nas diluições recomendadas.

Os resultados obtidos para o desinfetante a base de cloro foram insatisfatórios, pois quase todas as amostras analisadas mostraram-se resistentes nos diferentes tempos de análise. Pedrini e Margatho (2003) relataram que o hipoclorito de sódio a 2% mostrou excelente eficácia contra todos os microrganismos testados, contudo essa concentração é extremamente irritante para a pele do animal. Constataram ainda que o hipoclorito de sódio a 0,5%, concentração recomendada para rotina, teve efeito antimicrobiano bastante reduzido, corroborando com os achados deste estudo.

De acordo com Amaral (2004), o uso do cloro como agente desinfetante é prática comum nas propriedades leiteiras do Brasil, uma vez que o produto apresenta baixo custo. Entretanto, tem como desvantagem sua menor estabilidade, além da não observação das recomendações e critérios de uso pelos produtores. Neste estudo, observou-se que 100% das amostras analisadas foram resistentes a este princípio ativo, sendo desaconselhada sua utilização nas práticas de pré e pós-dipping nas propriedades das regiões estudadas.

Costa et al. (1998) também realizaram estudo sobre a atividade do cloro frente a amostras de *Staphylococcus* spp e constataram resistência *in vitro* deste desinfetante e ressaltaram a importância do uso adequado uma vez que a presença de matéria orgânica determinou uma diminuição acentuada na eficiência do mesmo.

Ainda de acordo com Amaral (2004), o cloro utilizado na desinfecção das teteiras, demonstrou que o produto não foi eficiente na redução dos microrganismos presentes e atribuíram esse resultado a adesão das bactérias à superfície interna das teteiras que dificulta a ação do desinfetante. A concentração e o tempo de contato são fatores que podem interferir na ação do desinfetante (BESSEMS, 1998) e este binômio é fundamental para o sucesso do efeito desinfetante de compostos a base de cloro.

De acordo com Fonseca e Santos (2001) os melhores resultados no pós dipping têm sido obtidos com as seguintes concentrações de compostos: iodo - 0,7 a 1,0%, clorexidina - 0,5 a 1,0% e cloro - 0,3 a 0,5% (4% hipoclorito de sódio). No pré dipping, os produtos

tradicionalmente utilizados são hipoclorito de sódio a 2%, iodo a 0,3% e clorexidina a 0,3%. Em ambos os casos deve-se fazer a imersão completa dos tetos (SANTOS, FONSECA; 2006).

Pedrini e Margatho (2003) relatam que na maioria das propriedades estudadas os desinfetantes são escolhidos por hábito de uso, facilidade de aplicação ou preço. Estes dados corroboram com os obtidos nesse trabalho pois, a maioria das propriedades visitadas utilizavam o produto comercial de fácil aplicação e mais barato. Esses fatores aliados ao fato de nenhuma das propriedades visitadas realizarem testes laboratoriais para avaliar a eficiência das soluções desinfetantes utilizadas na rotina do processo de ordenha podem comprometer a eficácia desses produtos nas regiões estudadas

Os resultados obtidos por Costa et al. (1998) indicaram a importância da avaliação periódica dos desinfetantes utilizados nas propriedades, pois muitos não se mostraram eficazes para controlar os microrganismos mais prevalentes, tornando, desta forma, o gasto com o produto supérfluo, pois o mesmo já não atua de forma eficiente para os microrganismos testados.

## **CONCLUSÃO**

De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que a maior atividade desinfetante *in vitro* foi verificada para o iodo e clorexidina para os *S. aureus* e do iodo e ácido láctico para os SCP. Conclui-se também pela necessidade de avaliação periódica dos desinfetantes utilizados nas propriedades leiteiras nas regiões estudadas, pois existem variações no perfil de sensibilidade e resistência que podem comprometer os programas de controle da mastite bovina causada pelo *Staphylococcus* spp.

## REFERÊNCIAS

- AMARAL L.A. et al. Avaliação da eficiência da desinfecção de teteiras e dos tetos no processo de ordenha mecânica de vacas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 4 p. 173-177, out./dez. 2004.
- BAIRD-PARKER, A.C. The *Staphylococci*: an introduction. **Journal of Applied Bacteriology**, Washington, US, v.19, p.15-85, 1990.
- BESSEMS E. The effect of practical condition on the efficacy of disinfectants. *Int. Biodeter Biodegr.* 1998 41 (3-4); 177-183
- BODDIE R. L.; NICKERSON, S. C.; ADKINSON, R. W. Efficacies of teat germicides containing 0.5% chlorhexidine and 1% iodine during experimental challenge with *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 80, p. 2809-2814, 1997.
- BRITO, J. R. F. Contagem bacteriana de superfície de tetas de higienização, incluindo a ordenha manual com participação do bezerro para estimular a descida do leite. *Ver. Univ. Santa Maria*, v. 30, n. 5, 2000.
- CARTER, G.R. **Fundamentos de bacteriologia e micologia veterinária**. São Paulo: ROCA, 1988. 250p.
- COSTA E. O. A importância econômica da mastite infecciosa bovina. *Com. Cient. Fac. Méd. Vet. Zoot. Univ. São Paulo*, 15:21-6, 1991

COSTA E. O. et al. Avaliação *in vitro* dos desinfetantes utilizados na pós ordenha (teat dipping) para controle da mastite bovina **Rev. Nappama**, São Paulo ano 1 n. 1 p. 18-22 out. 1998.

FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M. V. **Qualidade do leite e controle de mastite**. São Paulo: Lemos Editorial & Gráficos Ltda. 2001, 175 p.

FREITAS, M. A. Q. **Mastite bovina**: importância e controle. (Circular Técnica Pesagroria, n. 11), p. 14, 1998.

GOLDBERG, J. J. et al. Evaluation of a 1 percent iodophor postmilking teat sanitizer. **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 77, n. 33, p. 740-747, 1994.

JONES, G. M. Milking practices recommended to assure milk quality and prevent mastitis. Dairy Science: Virginia Cooperative Extension, 1998 p. 404-227.

MAC FADDIN, J.F. **Biochemical test for identification of medical bacteria**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1980. 527p.

NADER FILHO A. et al. Efeito de várias medidas higiênico-sanitárias durante a ordenha na contagem microbiana do leite. **Revista Instituto Laticínios Cândido Tostes**, Juís de Fora, v. 37 p.13-15 1982.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL Current concepts of bovine mastitis. 2 ed. Washington, 1978.

PANKEY, J. W. W. R. J. et al. Update on postmilking teat antiseptics **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 67 p.1336, 1984.

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**, São Paulo, v. 70, n. 4, p. 391-395, out./dez. 2003.

PHILLIPS, M. F.; VASSEUR, P. B.; GREGORY, C. R. Chlorhexidine diacetate versus povidone-iodine for preoperative preparation of the skin: a prospective randomized comparison in dogs and cats. **Journal American Animal Hospital Association**, v. 27, p. 105-108, 1991.

PHILPOT, W. N. ; NICKERSON S. C. **Mastitis: Counter Attack**, Babson Bros. Co., Naperville IL.1992

QUINN, P. J. Disinfection and disease prevention in veterinary medicine. In: Disinfection, sterilization, and preservation. 4 th ed. Philadelphia: Lea & Febiger. 1991.

SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte:UFMG, 1998. 221p.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 1997 p.295.

SPINOSA, H. S.; GORNIK, S. L.; BERNADINI, M.M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002 p. 389-394.

### 5.3. Sensibilidade antimicrobiana “*in vitro*” dos *Staphylococcus* spp isolados no leite de vacas com mastite subclínica

**RESUMO:** objetivou-se com este estudo avaliar a sensibilidade antimicrobiana “*in vitro*” de 291 amostras de *Staphylococcus* spp isolados de amostras de leite de vacas com mastite subclínica, em 15 fazendas leiteiras localizadas na Região Metropolitana do Recife (A), Agreste (B) e Zona da Mata (C) do estado de Pernambuco. Dos 291 isolados, 170(58,4%) foram classificados como *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN), 84(28,9%) como *Staphylococcus aureus* e 37(12,7%) como *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP). Para o estudo do perfil de sensibilidade a antimicrobianos empregou-se a técnica de difusão em discos, foram avaliadas 16 drogas antimicrobianas utilizadas no tratamento das mastites. O antibiótico que apresentou melhor eficácia *in vitro* foi a associação entre neomicina + bacitracina + tetraciclina com percentuais de 98,4%, 99,3%, 89,7% para as regiões A, B e C respectivamente. O antibiótico menos eficaz foi a ampicilina que apresentou 56,5% de resistência para as amostras da região A, 72,8% para a região B e 71,8% na região C. Os resultados obtidos mostram a necessidade da realização periódica de testes de sensibilidade “*in vitro*” pois existem variações no perfil de sensibilidade e resistência que podem comprometer o tratamento do animal bem como os programas de controle da mastite bovina causada pelo *Staphylococcus* spp.

**Palavras chave:** leite, mastite, sensibilidade antimicrobiana, *Staphylococcus* spp

***In vitro* antimicrobial sensitivity to *Staphylococcus* spp isolates in dairy cows with subclinical mastitis.**

**ABSTRACT:** The goal of this research was to evaluate the *in vitro* antimicrobial sensibility of 291 samples of *Staphylococcus* spp, isolates from the mammary glands of dairy cows with subclinical mastitis in the regions of Metropolitan Recife (A), Agreste (B) and Zona da Mata (C) in the state of Pernambuco (Brazil). Of the 291 isolates, 170 (58.4%) were identified as negative coagulase *Staphylococcus* (SCN), 84 (28.9%) as *Staphylococcus aureus*, and 37 (12.7%) as positive coagulase *Staphylococcus* (SCP). To study sensitivity to antimicrobials, the diffusion in disks method was used with 16 antimicrobial drugs commonly employed in the treatment of mastitis. The most efficient antibiotic *in vitro* was the combination of neomicine + bacitracine + tetracycline with percentages of 98,4%, 99,3%, 89,7% for the A, B, and C regions, respectively. The least efficient was ampicillin, which was resistant to 56.5% of the isolates taken from region A, 72.8% from region B, and 71.8% from region C. These results indicate the need for periodic testing of sensitivity *in vitro*, as these variations can compromise both the treatment of animals as well as control programs for bovine mastitis caused by *Staphylococcus* spp.

**Key words:** milk, mastitis, antimicrobial sensitivity, *Staphylococcus* spp

## INTRODUÇÃO

A mastite bovina continua sendo um grande problema para a indústria leiteira, apesar das inúmeras pesquisas voltadas para o controle desta enfermidade (FREITAS et al., 2005).

Esta enfermidade da glândula mamária pode ser causada por inúmeros microrganismos, destacando-se o *Staphylococcus aureus* que é o patógeno contagioso mais frequentemente isolado do leite mastítico (LANGONI et al., 1998; ZSCHOCK et al., 2000; PINHEIRO SÁ et al., 2004).

O *S. aureus* é mundialmente reconhecido como causador de várias doenças (BEAN & GRIFFIN, 1990), sendo também uma das mais importantes causas de intoxicação alimentar (OMOE et al., 2002).

A mastite causa severas perdas econômicas decorrentes da redução da produção láctea (COSTA et al., 2000), perda da qualidade do leite (REIS et al., 2003) e pode ser considerada como sério problema para saúde pública (TYLER et al., 1992; CARDOSO et al., 1999).

Os programas voltados para o controle das mastites objetivam diminuir a prevalência da doença em níveis aceitáveis, uma vez que sua erradicação não é possível (Silva et al., 1998). Além das medidas higiênicas indicadas durante a ordenha para reduzir os índices de infecção da glândula mamária, a utilização de antibióticos é uma medida importante no controle das infecções intramamárias, além de eliminar prováveis fontes de infecção (ERSKINE et al., 1993).

Algumas características de virulência do *S. aureus* contribuem para a persistência desta bactéria no tecido mamário (SANTOS et al., 2003) e o uso inadequado de antibióticos no tratamento da doença pode gerar o aparecimento de cepas resistentes e comprometer a eficiência do tratamento (BARBERIO et al., 2002).

De acordo com Brito et al. (2001), diversos estudos sobre a sensibilidade antimicrobiana realizados no Brasil com patógenos envolvidos na mastite bovina demonstram um aumento crescente no padrão de resistência, principalmente para o *S. aureus*.

Tendo em vista a importância do tratamento das mastites como medida de controle da doença e considerando as possíveis variações regionais quanto ao perfil de sensibilidade antimicrobiana dos *Staphylococcus* spp objetivou-se com este estudo avaliar a sensibilidade dos isolados dos *Staphylococcus* spp a partir de quartos mamários de vacas com mastite subclínica no estado de Pernambuco frente aos antibióticos e quimioterápicos mais utilizados no tratamento das mastites.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 291 amostras de *Staphylococcus* spp isoladas de quartos mamários de vacas com mastite subclínica procedentes de 15 fazendas de exploração leiteira situadas em dois municípios da Região Metropolitana do Recife (A), oito do Agreste (B) e três da Zona da Mata (C) do Estado de Pernambuco. Os rebanhos eram constituídos de animais de várias raças, idades e encontravam-se em diferentes estágios de lactação, criados em sistema intensivo e semi-intensivo. O sistema de ordenha era mecânica e/ou manual.

As amostras de leite foram coletadas após prévia lavagem do teto com água e sabão, secagem com papel toalha e anti-sepsia do óstio do teto com álcool a 70°GL. Coletaram-se 5mL de leite, em frascos com tampa rosqueável, esterilizados e previamente identificados com o nome ou número do animal e quarto mamário, sendo devidamente enviadas, em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável, ao Laboratório de Doenças Infecto-Contagiosas da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

No laboratório, as amostras de leite foram semeadas em ágar base enriquecido com 5% de sangue ovino desfibrinado e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C, realizando-se leituras após 24 e 48h, sendo observadas as características morfológicas das colônias como tamanho, tipo, coloração e presença de hemólise. Ao microscópio foram observadas, disposição das células e características morfotintórias ao Teste de Gram (CARTER, 1988).

Para a identificação dos isolados de *Staphylococcus* spp, foram realizadas provas bioquímicas como produção de coagulase livre, DNase e catalase, segundo Silva et al. (1997). As provas de produção de acetoina, fermentação da glicose (anaerobiose) e do manitol (aerobiose e anaerobiose) foram realizadas de acordo com Mac Faddin (1980).

Após a realização dos testes, os isolados foram classificados em *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), quando positivo em todos os testes, *Staphylococcus* coagulase positivo (SCP), quando positivo para a produção da coagulase, fermentação da glicose em anaerobiose e catalase, mas negativa em algum dos outros testes. Em *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN) quando a bactéria não coagulava o plasma de coelho, apresentava características de estafilococos na técnica de coloração de Gram, fermentava a glicose em anaerobiose e produzia a catalase (BAIRD-PARKER, 1990).

Os testes de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* dos isolados foram realizados utilizando-se a técnica de difusão em ágar Mueller Hinton segundo Bauer et al. (1996). Utilizou-se os seguintes discos impregnados de antibióticos: amoxicilina (10 mcg), ampicilina (10 mcg), azitromicina (15 mcg), cefquinome (30 mcg), cephalonium (30 mcg),

ciprofloxacina (5mcg), cloxacilina (25 mcg), danofloxacina (10 mcg), enrofloxacina (5 mcg), eritromicina (15 mcg), florfenicol (30mcg), gentamicina (10 mcg), penicilina + novobiocina (10 mcg), sulfam (25 mcg) + trimetoprim (5 mcg), tobramicina (10 mcg) e tetraciclina (30 mcg) + neomicina (30 mcg) + bacitracina (10 mcg).

A análise estatística foi do tipo descritiva, calculando-se as frequências absoluta e relativa (SAMPAIO, 1998).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisados 291 isolados de *Staphylococcus* spp. recuperados de leite de vacas com mastite subclínica pertencentes à Região Metropolitana do Recife (A), Agreste (B) e Zona da Mata do estado de Pernambuco (C). Dos 291 isolados, 170 (58,4%) foram classificados como SCN, 37 (12,7%) como SCP e 84 (28,9%) como *S.aureus*. A distribuição dos isolados de acordo com sua classificação e com as regiões estudadas encontra-se na Tabela 1. Freitas et al. (2005) também verificaram que SCN foi o microrganismo mais isolado de leite de vacas com mastite subclínica no Agreste do estado de Pernambuco.

**Tabela 1-** Distribuição dos *Staphylococcus* spp isolados de casos de mastite subclínica, segundo classificação em SCN, SCP e *S. aureus* e regiões estudadas

| REGIÕES        | SCN                   | SCP                  | <i>S. aureus</i>     | TOTAL R        |
|----------------|-----------------------|----------------------|----------------------|----------------|
| A              | 55/62(88,7%)          | 6/62(9,7%)           | 1/62(1,6%)           | 62/291(21,3%)  |
| B              | 62/151(41,1%)         | 19/151(12,6%)        | 70/151(46,3%)        | 151/291(51,9%) |
| C              | 53/78(67,9%)          | 12/78(15,4%)         | 13/78(16,7%)         | 78/291(26,8%)  |
| <b>TOTAL C</b> | <b>170/291(58,4%)</b> | <b>37/291(12,7%)</b> | <b>84/291(28,9%)</b> | <b>291</b>     |

A - Região Metropolitana do Recife; B - Agreste; C - Zona da Mata; **Total R** - Total por região; **Total C** - Total por classificação

O perfil de sensibilidade, sensibilidade intermediária e resistência dos isolados de *Staphylococcus* spp. frente aos antibióticos testados encontra-se na Tabela 2, onde se observa que a associação neomicina+bacitracina+tetraciclina e a ciprofloxacina foram os antibióticos mais eficazes para os isolados da Região A, com o percentual de (98,4%), seguido dos antibióticos gentamicina e tobramicina (96,8%), danofloxacina e cephalonium (95,2%). Na região B, os antibióticos mais eficazes foram neomicina+bacitracina+tetraciclina com (99,3%), cefaquinome (92,7%) e cephalonium (91,4%). Na Região C, neomicina+bacitracina+tetraciclina (89,7%) e cephalonium (69,2%) foram os mais eficazes.

Em todas as regiões estudadas a associação neomicina+bacitracina+tetraciclina foi a mais eficaz para os isolados de *Staphylococcus* spp. recuperados de leite de vacas com mastite subclínica.

**Tabela 2-** Perfil de sensibilidade (S), sensibilidade intermediária (I) e resistência (R) dos isolados de *Staphylococcus* spp recuperados de leite de vacas com mastite subclínica na Região Metropolitana do Recife (A), Agreste (B) e Zona da Mata do estado de Pernambuco (C)

|              | A<br>n= 62   |              |       | B<br>n= 151  |              |       | C<br>n= 78   |              |       |
|--------------|--------------|--------------|-------|--------------|--------------|-------|--------------|--------------|-------|
|              | S            | R            | I     | S            | R            | I     | S            | R            | I     |
| <b>ENO</b>   | 92,0%        | 3,2%         | 4,8%  | 55,6%        | 11,9%        | 32,5% | 50,0%        | 28,1%        | 28,2% |
| <b>SUT</b>   | 85,5%        | 14,5%        | 0,0%  | 85,4%        | 9,3%         | 5,3%  | 59,0%        | 25,6%        | 15,4% |
| <b>DAN</b>   | 95,2%        | 0,0%         | 48,4% | 80,1%        | 1,3%         | 18,5% | 65,4%        | 11,5%        | 23,1% |
| <b>AMP</b>   | 43,5%        | <b>56,5%</b> | 0,0%  | 27,2%        | <b>72,8%</b> | 0,0%  | 28,2%        | <b>71,8%</b> | 0,0%  |
| <b>AZI</b>   | 85,5%        | 6,5%         | 8,0%  | 59,6%        | 17,9%        | 22,5% | 48,7%        | 30,8%        | 20,5% |
| <b>FLF</b>   | 93,5%        | 16,1%        | 48,4% | 82,1%        | 4,6%         | 13,2% | 60,3%        | 15,4%        | 24,4% |
| <b>AMO</b>   | 80,6%        | 11,3%        | 8,1%  | 60,3%        | 27,8%        | 11,9% | 57,7%        | 37,2%        | 5,1%  |
| <b>NBT</b>   | <b>98,4%</b> | 1,6%         | 0,0%  | <b>99,3%</b> | 0,7%         | 0,0%  | <b>89,7%</b> | 10,3%        | 0,0%  |
| <b>PNM</b>   | 80,6%        | 11,3%        | 8,1%  | 45,7%        | 53,6%        | 0,7%  | 37,2%        | 5,9%         | 3,8%  |
| <b>ERI</b>   | 61,3%        | 12,9%        | 25,8% | 21,9%        | 36,4%        | 41,7% | 17,9%        | 46,2%        | 35,9% |
| <b>GEN</b>   | 96,8%        | 1,6%         | 1,6%  | 76,2%        | 13,2%        | 10,6% | 67,9%        | 23,1%        | 9,0%  |
| <b>CIP</b>   | <b>98,4%</b> | 0,0%         | 1,6%  | 68,9%        | 5,3%         | 25,8% | 53,8%        | 14,1%        | 32,1% |
| <b>TOB</b>   | 96,8%        | 1,6%         | 0,0%  | 76,2%        | 10,6%        | 13,2% | 66,7%        | 24,4%        | 9,0%  |
| <b>CFQUE</b> | 90,3%        | 3,3%         | 6,4%  | <b>92,7%</b> | 3,3%         | 4,0%  | 64,1%        | 20,5%        | 15,4% |
| <b>CLX</b>   | 88,7%        | 11,3%        | 0,0%  | 86,6%        | 13,2%        | 0,0%  | 65,4%        | 34,6%        | 0,0%  |
| <b>CNM</b>   | 95,2%        | 3,2%         | 1,6%  | 91,4%        | 6,6%         | 2,0%  | <b>69,2%</b> | 23,1%        | 7,7%  |

**ENO** – Enrofloxacina; **SUT** – Clotrimoxazol; **DAN** - Danofloxacina; **AMP** – Ampicilina; **AZI** – Azitromicina; **FLF** – Florfenicol; **AMO** – Amoxicilina; **NBT** - Neomicina+Bacitracina+Tetraciclina; **PNM** – Penicilina+Novobiocina; **ERI** – Eritromicina; **GEN** – Gentamicina; **CIP** – Ciprofloxacina; **TOB** – Tobramicina; **CFQUE** – Cefquinome; **CLX** – Cloxacilina; **CNM** - Cephalonium

A associação neomicina+bacitracina+tetraciclina foi eficaz nas três regiões estudadas, pois é um medicamento recente e pouco utilizado. Na região C, no entanto, houve um menor percentual de sensibilidade em relação às regiões A e B, possivelmente devido à recente introdução e maior utilização desta associação no tratamento dos animais.

As associações entre antimicrobianos visam potencializar a ação dos mesmos, diminuir efeitos indesejáveis e aumentar o espectro de ação sobre os microrganismos. No caso da associação neomicina+bacitracina+tetraciclina, sabe-se que a bacitracina atua sobre bactérias Gram-positivas e pode ser associada à neomicina para aumentar seu espectro de ação, sendo a resistência bacteriana a bacitracina rara, embora possa ocorrer (SPINOSA, 1996).

A tetraciclina é bastante utilizada nos tratamentos das mastites e apresentou boa eficiência contra estafilococos isolados de casos de mastite em São Paulo (CRUZ et al., 1998) e em Minas Gerais (BRITO et al., 2001). Tem ação sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, porém deve-se ter cautela em seu uso, pois a resistência antimicrobiana é mediada principalmente por plasmídios (SPINOSA, 1996), os quais podem carrear resistência para outros antibióticos (PRESCOTT, 2000). A eficiência da resistência plasmidial e seu possível impacto na saúde humana ficaram evidentes quando se detectou que, além de ser em geral múltipla e altamente transferível, ela pode ocorrer entre bactérias de gêneros diferentes. As ações promovidas por genes de resistência plasmidial são muito efetivas, pois se baseiam quase sempre, na produção de enzimas. No caso da tetraciclina, há a produção da proteína *Tet*, que é responsável pelo transporte deste antibiótico para fora da célula bacteriana (SOUZA, 1998).

A ciprofloxacina na região A foi tão eficiente quanto à associação neomicina+bacitracina+tetraciclina com um percentual de (98,4%). A ciprofloxacina e a danofloxacina são quinolonas de segunda geração e esta última apresentou um percentual de sensibilidade de (95,2%). Cruz et al. (1998) trabalharam com *S. aureus* isolados de mastite bovina em São Paulo e observaram boa eficiência para estes dois antibióticos.

A gentamicina e a tobramicina apresentaram valores de sensibilidade idênticos nas regiões A e B com percentuais de (96, 8%) e (76,2%), respectivamente. Na região C, os percentuais de sensibilidade não foram idênticos, mas, foram bem próximos, sendo o da gentamicina de (67,9%) e o da tobramicina de (66,7%) (Tabela 2). Embora a tobramicina não seja muito utilizada no tratamento da mastite, na região C ela não apresentou boa eficiência como observado na região A, provavelmente devido ao uso indiscriminado de antibióticos nas propriedades da região C e sua semelhança com a gentamicina, já que ambas são aminoglicosídeos. Trabalhando com *S. aureus* isolados de tanques de leite em São Paulo, Araújo (1998) também verificou resultados idênticos para a gentamicina e tobramicina que apresentaram percentual de (99,0%) de sensibilidade.

Vários autores confirmaram a eficácia da gentamicina no tratamento de mastite estafilocócicas (COSTA et al., 2000; BRITO et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2002; BYARUGABA et al., 2004), no entanto Freitas et al. (2005) verificaram alto nível de resistência dos estafilococos à gentamicina no município onde este antibiótico era mais utilizado, destacando a importância do uso indiscriminado e a seleção de bactérias resistentes. Deste modo, a semelhança dos resultados de sensibilidade para os dois antibióticos revelada

neste estudo, demonstra que não necessariamente o uso da tobramicina possa ocasionar resistência, mas sim, o uso de um antibiótico do mesmo grupo como a gentamicina.

No presente estudo, foram utilizados nos testes de sensibilidade antimicrobiana os antibióticos ampicilina, amoxicilina, cloxacilina, cefquinome e cephalonium que pertencem ao grupo de antibióticos betalactâmicos, sendo os dois últimos classificados como cefalosporinas de quarta geração e que têm seu uso recente no tratamento de mastites bovinas.

Devido a pouca utilização do cephalonium e do cefquinome nas regiões estudadas, estes apresentaram ótimos resultados, sendo o cefquinome o segundo antibiótico mais eficaz na região B e o cephalonium na região C (Tabela 2). Resultados semelhantes foram encontrados por Moroni et al. (2006) com relação ao cephalonium e sua excelente ação *in vitro* para *S.aureus* isolados de casos de mastite subclínica na Itália.

O antibiótico com menor percentual de sensibilidade nas três regiões estudadas foi a ampicilina com 43,5% de sensibilidade para as amostras da região A, 27,2% para a região B e 28,2% na região C (Tabela 2). Estes resultados podem ser esperados, pois a ampicilina é uma penicilina de amplo espectro (SPINOSA, 1996), sendo bastante utilizada no tratamento de mastite por ter ação sobre bactérias Gram positivas e Gram negativas e também para outras doenças bacterianas de bovinos este fato na maioria das vezes resulta no uso indiscriminado do medicamento que pode causar a resistência do microrganismo ao antibiótico.

Do total de 291 isolados de *Staphylococcus* spp utilizados nos testes de sensibilidade antimicrobiana, 181 foram multirresistentes, sendo os demais (110), sensíveis a todos antibióticos ou resistentes a apenas um deles (Tabela 3). Os isolados foram agrupados em três perfis de multirresistência. Perfil (2-4), resistentes a 2, 3 e 4 antibióticos simultaneamente; perfil (5-7), resistente a 5, 6 e 7 antibióticos e perfil (=ou>8), resistente a oito ou mais de 8 antibióticos simultaneamente.

**Tabela 3**– Perfil geral de multirresistência dos isolados de *Staphylococcus* spp. recuperados de leite de vacas com mastite subclínica na Região Metropolitana do Recife (A), Agreste (B) e Zona da Mata do estado de Pernambuco (C)

| REGIÕES        | NM (0-1) | QUANTIDADE DE ANTIBIÓTICOS |                     |                     | TOTAL R |
|----------------|----------|----------------------------|---------------------|---------------------|---------|
|                |          | 2-4                        | 5-7                 | = ou > 8            |         |
| A              | 42       | 17<br>17/20(85,0%)         | 1<br>1/20(5,0%)     | 2<br>2/20(10,0%)    | 62      |
| B              | 47       | 69<br>69/104(66,3%)        | 26<br>26/104(25,0%) | 9<br>9/104(8,7%)    | 151     |
| C              | 21       | 23<br>23/57(40,4%)         | 12<br>12/57(21,0%)  | 22<br>22/57(38,6%)  | 78      |
| <b>TOTAL C</b> | 110      | 109<br>109/181(60,2%)      | 39<br>39/181(21,5%) | 33<br>33/181(18,3%) | 291     |

**NM (0-1)** – Não multirresistente (amostras sensíveis a todos antibióticos ou resistentes a um antibiótico); **(2-4)** (amostras resistentes a 2, 3 ou 4 antibióticos); **(5-7)** (amostras resistentes a 5, 6 e 7 antibióticos); **(=ou>8)** (amostras resistentes a 8 ou mais antibióticos testados). **Total R** – Total por região; **Total C** – Total por classificação

O perfil (2-4) foi o mais freqüente nas três regiões estudadas independente da classificação do *Staphylococcus* spp. (Tabela 3). No entanto, com relação a esta classificação, observou-se que os isolados de *S.aureus* multirresistentes apresentaram a seguinte distribuição dos perfis estabelecidos: 44/65 (67,7%) para o perfil (2-4), 17/65 (26,2%) para o perfil (5-7) e 4/65 (6,1%) para o perfil (=ou>8). Já as amostras de SCP obtiveram a seguinte distribuição: 11/24 (45,8%) para o perfil (2-4), 7/24 (29,2%) para o perfil (5-7) e 6/24 (25,0%) para o perfil (=ou>8) e os SCN 54/92 (58,7%) para o perfil (2-4), 15/92 (16,3%) para o perfil (5-7) e 23/92 (25,0%) para o perfil (=ou>8). Observou-se, desta forma, que o perfil mais freqüente também foi o (2-4) quando se considera a classificação do *Staphylococcus* spp.

Na tabela 3, percebe-se que na Zona da Mata o perfil de (=ou>8) apresentou um percentual de 38,6%, muito próximo ao de (2-4) com 40,4%. Este fato é preocupante, pois revela que muitos isolados de *Staphylococcus* spp. são resistentes a oito ou mais antibióticos. Este alto percentual ocorreu devido a um elevado percentual de SCN com perfil (=ou>8) (Tabela 4) e talvez pela resistência simultânea a antibióticos pertencentes a um mesmo grupo, como por exemplo, gentamicina e tobramicina, enrofloxacina, ciprofloxacina e danofloxacina e, principalmente os betalactâmicos que foram cinco e a associação penicilina+novobiocina.

Em estudo realizado por Schultz (2004), onde foram analisadas 202 isolados de bactérias, 78,0% eram *Staphylococcus* coagulase negativa e 44,0% destes foram resistentes a mais de um antibiótico. Destaca-se então a importância dos SCN na participação do processo infeccioso da glândula mamária, pois a resistência aos tratamentos causa persistência de casos

crônicos no rebanho que podem atuar como fontes de infecção para outros animais do rebanho (ARCHER, 1994).

**Tabela 4**– Perfil de multirresistência dos isolados de *Staphylococcus* spp. de acordo com sua classificação em *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* coagulase positiva e *Staphylococcus* coagulase negativa e regiões estudadas

| <b>PERFIL DE MULTIRRESISTÊNCIA</b>       |              |                   |                  |                   |
|--|--------------|-------------------|------------------|-------------------|
| <b>REGIÕES</b>                           | <b>(0-1)</b> | <b>(2-4)</b>      | <b>(5-7)</b>     | <b>(=ou&gt;8)</b> |
| <i>Staphylococcus aureus</i>             |              |                   |                  |                   |
| <b>A</b>                                 | 1            | -                 | -                | -                 |
| <b>B</b>                                 | 15           | <b>39(70,9%)</b>  | 13(23,6%)        | 3(5,5%)           |
| <b>C</b>                                 | 3            | <b>5(70,9%)</b>   | 4(40,%)          | 1(10,0%)          |
| <i>Staphylococcus coagulase positiva</i> |              |                   |                  |                   |
| <b>A</b>                                 | 2            | <b>3 (75,0%)</b>  | 0 (0,0%)         | 1 (25,0%)         |
| <b>B</b>                                 | 7            | <b>5 (41,7%)</b>  | <b>5 (41,7%)</b> | 2 (16,6%)         |
| <b>C</b>                                 | 4            | <b>3 (37,5%)</b>  | 2 (25,0%)        | <b>3 (37,5%)</b>  |
| <i>Staphylococcus coagulase negativa</i> |              |                   |                  |                   |
| <b>A</b>                                 | 39           | <b>14 (87,5%)</b> | 1 (6,25%)        | 1 (6,25%)         |
| <b>B</b>                                 | 25           | <b>25 (67,6%)</b> | 8 (21,6%)        | 4 (10,8%)         |
| <b>C</b>                                 | 14           | 15 (38,5%)        | 6 (15,4%)        | <b>18 (46,1%)</b> |

A - Região Metropolitana do Recife; B - Agreste; C - Zona da Mata

Na região A não houve nenhum isolado de *S. aureus* multirresistente e tanto os SCP quanto os SCN apresentaram maior frequência para o perfil (2-4) com 75,0% e 87,5%, respectivamente. Na região B, o perfil (2-4) foi o mais frequente para os isolados de *S. aureus* e para os isolados de SCN com os percentuais de 70,9% e 67,6%, no entanto, para os isolados de SCP a frequência do perfil (2-4) foi idêntica ao perfil (5-7) que foi de 41,7%. Na região C, o perfil (2-4) também foi o mais comum com 70,9% para os isolados de *S. aureus*, já para os isolados de SCP, tanto o perfil (2-4) quanto (=ou>8) tiveram o mesmo percentual de 37,5% e o perfil (=ou>8) prevaleceu entre os isolados de SCN com (46,1%) (Tabela 4). Destaca-se assim a importância dos SCP e principalmente dos SCN em casos de tratamentos difíceis devido a altas multirresistências.

Recentemente, os SCN têm apresentado grande relevância como agentes patogênicos responsáveis por perdas econômicas substanciais aos produtores de leite (GENTILINI, 2002). Este fato torna-se ainda mais grave quando essas bactérias apresentam resistência a vários antibióticos disponíveis para o tratamento da mastite.

## CONCLUSÃO

Os resultados obtidos mostram a necessidade da realização periódica de testes de sensibilidade “*in vitro*” pois, existem variações no perfil de sensibilidade e resistência que podem comprometer o tratamento do animal bem como os programas de controle da mastite bovina causada pelo *Staphylococcus* spp.

## REFERÊNCIAS

ARAÚJO, W. P. Fagotipagem de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a antibióticos, isoladas de leite. **Brazilian Journal of Veterinary Research**. São Paulo, v. 35, n.4, 1998.

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

BAIRD-PARKER, A.C. The *Staphylococci*: an introduction. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.19, p.15-85, 1990.

BARBERIO, A.; GIETL, H.; DALVIT, P. “In vitro” sensibilidade aos antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* e coliformes isolados de mastite bovina na região de Veneto, Itália, no período de 1996-1999. **Napgama**, São Paulo, v.5, n.1, p.10, 2002.

BAUER, A.W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, Daigas., v.45, n.4, p.493-496, 1966.

BEAN, N.H.; G RIFFIN, P.M. G. Foodborne disease outbreaks in the United States, 1973-1987: pathogens, vehicles, and trends. **Journal of Food Protection**, Ames, v.53, n.9, p.804-817, 1990.

BRABES, K. C. S. ET AL.. Participação de espécies coagulase positivas e negativas produtoras de enterotoxinas do gênero *Staphylococcus* na etiologia de casos de mastite bovina em propriedades de produção leiteira dos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Revista NAPGAMA**. São Paulo, v. 2, n. 3, p. 4-5, 1999.

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

BYARUGABA, D. K. A view on antimicrobial resistance in developing countries and responsible risk factors. **Journal Antimicrobial Agents**, v. 24, p. 105-110, 2004.

CARDOSO, H.F.T.; SILVA, N.; SENA, M.J. et al. Production of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Brazil. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.29, p.347-349, 1999.

CARTER G.R. Fundamentos de Bacteriologia e Micologia Veterinária. São Paulo: Roca, 1988, 250p.

CARTER, G.R. **Fundamentos de bacteriologia e micologia veterinária**. São Paulo: Roca, 1988. 250p.

COSTA, E. O. et al. Escore de CMT em relação ao nível de células somáticas em leite do tanque de refrigeração e percentual de mastite subclínica em propriedades leiteiras de São Paulo e Minas Gerais. **Revista NAPGAMA**, São Paulo v. 3, n. 2, p. 14-18, 2000.

CRUZ, A. D. et al. Atividade *in vitro* do danofloxacin e de sete drogas antimicrobianas frente a linhagens de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. São Paulo, v. 50, n. 4, p. 369-373, 1998.

DEAN, A.G. et al. Version 6.2. Word processing, database and statistics program for epidemiology na microcomputers. Centers of Disease Control, Atlanta, Georgia, USA, 1990.

ERSKINE, R.J. et al. Advances in the therapy for mastitis. **Veterinary Clinical North American: Food Animal Practice**, Philadelphia, v.9, n.3, p.499-513, 1993.

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

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

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

LANGONI, H. et al. Aspectos etiológicos na mastite bovina. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v.20, p.204-210, 1998.

MAC FADDIN, J.F. **Biochemical test for identification of medical bacteria**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1980. 527p.

MORONI, P. et al. Curta comunicação: Susceptibilidade às drogas antimicrobianas de *Staphylococcus aureus* oriundos de mastites bovinas subclínicas na Itália. **Journal Dairy Science**. Champaign, v. 89, p. 2973-2976, 2006.

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

OMOE, K. et al. Detection of *seg*, *she*, and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *Staphylococcus aureus* isolates harborin *seg*, *seh*, or *sei* genes. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.40, n. 3, p.857-862, 2002.

PINHEIRO SÁ M. E. et al. Importância do *Staphylococcus aureus* nas mastites subclínicas: pesquisa de enterotoxinas e toxina do choque tóxico, e a relação com a contagem de células somáticas **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. São Paulo v. 41, p. 320-326, 2004.

PRESCOTT, J.F. Antimicrobial drug resistance and its epidemiology. In: PRESCOTT, J.F., BAGGOT, J. D., WALKER, R. D. (Ed.), *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*. Ames: Iowa State University Press, 2002 . p. 27-49.

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

SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: UFMG, 1998. 221p.

SANTOS, F. G. B. et al. Tipagem molecular de *Staphylococcus aureus* isolados do leite de vacas com mastite subclínica e equipamentos de ordenha procedentes do estado de Pernambuco. **Revista Nappama**, São Paulo, v. 6, n. 1, p. 19-23, 2003.

SCHULTZ RAJALA, P. J.; SMITH, K. L.; HOGAN J. S.; LOVE, B.C. Antimicrobial susceptibility of mastitis pathogenens from first lactation and older cows **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 102, p. 33-42, 2004.

SILVA, N. et al. Mastitis aguda espontânea por *Klebsiella* en bovinos Holstein. In: PANAMERICAN CONGRESS ON MASTITIS CONTROL AND MILK QUALITY 1., Mérida, México. **Proceedings...** Mérida: 1998, p.144-147,

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos.** São Paulo: Varela, 1997. 295p.

SOUZA, E. C. Bactérias ultra-resistentes. **Ciência Hoje.** Belo Horizonte v.23, n. 138, p. 27-35, 1998.

SPINOSA, H. S. Antibióticos: tetraciclina e cloranfenicol In: \_\_\_\_\_ Farmacologia aplicada a Medicina Veterinária São Paulo: Guanabara 1996. p. 368-371.

TYLER, J.W.; WILSON, R.C.; DOWLING. P. Treatment of subclinical mastitis. **Veterinary Clinical North American: Food Animal Practice,** Philadelphia, v. 8 p. 17-28, 1992.

ZSCHÖCK, M. et al. Detection of genes for enterotoxins (ent) and toxic shock syndrome toxin-1 (tst) in mammary isolates of *Staphylococcus aureus* by polymerase-chain-reaction. **International Dairy Journal,** Barbing, v.10, p.569-574, 2000.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os *Staphylococcus* spp são os agentes de maior ocorrência nos processos inflamatórios da glândula mamária nas regiões estudadas. Este fato sugere que sejam implementadas medidas de educação continuada que objetivem controlar as mastites causadas por este agente e reduzir os prejuízos econômicos causados por esta doença. Da mesma maneira deve-se alertar quanto à utilização indiscriminada de medicamentos e desinfetantes utilizados no tratamento e prevenção da mastite.

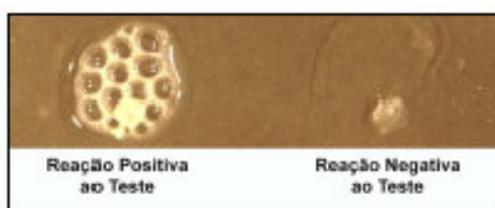
Portanto, com a utilização de medidas direcionadas que incluem exames laboratoriais periódicos, entre outras, os produtores podem controlar e reduzir os índices de mastites causadas por *Staphylococcus* no rebanho.

Desta forma haverá uma maior adequação à Instrução Normativa vigente do Ministério da Agricultura que determina normas para obtenção de um produto seguro e com qualidade para o consumidor final.

## 7. ANEXOS

### ANEXO 1. Protocolos para execução de testes bioquímicos utilizados na identificação da espécie *Staphylococcus aureus* de acordo com o *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Krieg e Holt, 1994)

**Anexo 1.1** - Teste para avaliar a produção de catalase: Esta enzima, produzida por alguns microrganismos, catalisa a reação de degradação do peróxido de hidrogênio em água e O<sub>2</sub> livre. Este teste é útil para diferenciar colônias de *Staphylococcus* spp (produtoras de catalase – reação positiva), de colônias de *Streptococcus* spp (não produtoras desta enzima – reação negativa).



**Anexo 1.2** - Fermentação de açúcares em anaerobiose. Os caldos glicose e manitol, contendo o indicador de pH vermelho de fenol, são preparados separadamente em tubos de ensaio estéreis e posteriormente inoculados com as amostras. Para a obtenção da anaerobiose, adiciona-se 200  $\mu$ L de óleo mineral estéril, incubando-se as amostras, por 48 horas a 37°C. A acidificação do meio é confirmada pela mudança na coloração de púrpura para amarelado, caracterizando positividade ao teste.



**Anexo 1.3** - Crescimento e fermentação em *Mannitol Salt Agar*. Duas características diferentes são determinadas com este meio seletivo. A primeira evidencia a capacidade de desenvolvimento do microrganismo em altas concentrações de sal. Outra é a fermentação do açúcar manitol em aerobiose. A positividade para o teste é evidenciada pela presença de colônias após 24 horas de incubação a 37°C, acompanhada pela fermentação do manitol (mudança na coloração do meio que passa de róseo para amarelado).



Reação positiva (amarela) e negativa (rósea) no Ágar manitol

**Anexo 1.4** - Voges-Proskauer (VP). Este teste avalia a produção de acetoína a partir da glicose em caldo pobre em nutrientes. A amostra bacteriana deve ser inoculada no caldo VP e após 48 horas de incubação a 37°C, adiciona-se 0,5 mL de solução hidróxido de potássio 40% (m/v) e 0,5 mL de solução alcoólica de  $\alpha$ -naftol 5% (m/v). A formação de um halo róseo na porção superior do meio após cinco minutos de observação indica positividade ao teste.



**Anexo 1.5** – Coagulase. Para o teste de produção da coagulase em tubo, adiciona-se 200  $\mu\text{L}$  de plasma de coelho, *in natura* ou comercial (Coagu-Plasma, Laborclin), ao mesmo volume da cultura das amostras crescidas por 24 horas em caldo BHI. Os tubos deverão ser incubados a 37°C sem agitação. Os resultados devem ser analisados nas primeiras quatro horas e após 24 horas, considerando-se positivas todas as amostras que coagularam o plasma neste intervalo.



## **ANEXO 2. Protocolo para execução dos testes de sensibilidade a antimicrobianos de acordo com Bauer et al. (1996).**

As amostras de *Staphylococcus* spp foram semeadas em placas contendo Ágar Mueller Hinton e os discos de antimicrobianos foram dispostos de forma assimétrica. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica e após 24h realizou-se a leitura dos halos de inibição e o resultado foi interpretado de acordo com o fabricante.



Teste de sensibilidade a antimicrobiana em Agar Mueller Hinton



