

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

Staphylococcus sp e **ENTEROBACTÉRIAS ISOLADAS DE
MASTITE RECORRENTE EM OITO REBANHOS DA REGIÃO DE
UBERLÂNDIA-MG: PERFIL DE SUSCETIBILIDADE AOS
ANTIMICROBIANOS**

**Cristiane Diniz Matoso Santos
Médica Veterinária**

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS
Setembro de 2006

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

Staphylococcus sp e **ENTEROBACTÉRIAS ISOLADAS DE
MASTITE RECORRENTE EM OITO REBANHOS DA REGIÃO DE
UBERLÂNDIA-MG: PERFIL DE SUSCETIBILIDADE AOS
ANTIMICROBIANOS**

Cristiane Diniz Matoso Santos

Orientadora: Profa. Dra. Daise Aparecida Rossi

Co-orientador: Prof. Dr. Geraldo Sadoyama Leal

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina Veterinária – UFU, como parte das
exigências para a obtenção do título de Mestre
em Ciências Veterinárias (Produção Animal).

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS

Setembro de 2006

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

S237s Santos, Cristiane Diniz Matoso, 1974-
Staphylococcus sp e enterobactérias isoladas de mastite recorrente em oito rebanhos da região de Uberlândia-MG : perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos / Cristiane Diniz Matoso Santos. - 2006.
54 f. : il.

Orientadora: Daise Aparecida Rossi.
Co-orientador: Geraldo Sadoyama Leal
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
Inclui bibliografia.

1. 1. Mastite - Teses. I. Rossi, Daise Aparecida. II. Leal, Geraldo Sadoyama.
2. . yama. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

CDU: 619:618.19-002

Elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da UFU / Setor de Catalogação e Classificação

Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias – Produção Animal
Faculdade de Medicina Veterinária
Universidade Federal de Uberlândia

Dissertação defendida e aprovada em 19 de setembro de 2006, pela comissão
examinadora constituída por:

Profa. Dra. Daise Aparecida Rossi
Universidade Federal de Uberlândia

Prof. Dr. Celso José de Moura
Universidade Federal de Goiás

Prof. Dr. Antônio Fernandes de Carvalho
Universidade Federal de Viçosa

Prof. Dr. José Octavio Jacomini
Coordenador do Programa de Pós-graduação Ciências Veterinárias

“Mesmo que já tenhas feito uma longa caminhada, há sempre um caminho a
fazer”.

Santo Agostinho, pensador cristão (354 – 430).

Ao meu esposo Tarcísio Fúlvio,
Ao meu filho Fúlvio,
Aos meus pais Iris e Antônio,
A minha amiga Lilian Leocádio,
Pelo carinho, paciência,
Companheirismo e incentivo, tornando
Possível a realização deste projeto, serei
sempre grata.

AGRADECIMENTOS

É difícil relacionar nomes de todas as pessoas a quem somos gratos.
Mesmo assim, vou tentar....

Com amor e carinho agradeço à Deus.

Àos Prof^{es} Dr^a Daise Aparecida Rossi e D^r Geraldo Sadoyama Leal, pela dedicação, paciência e orientação indispensável sem os quais esse trabalho não poderia se concluído; assim, a um mestre ensinar é uma arte e, como tal, uma tarefa reservada para poucos, porém privilegiados.

A uma amiga muito especial Lilian Leocádio, pela paciência e colaboração neste momento; muito obrigada.

A minha “outra” mãe, Maria José, pelo carinho.

A minha sempre amiga, Wanderléia de Barros, obrigada pela amizade.

A minha amiga e colega de trabalho, Taciana Almeida, obrigada pelo apoio.

Ao Heberly, Marta e Luciano, pela contribuição nas diversas etapas do trabalho e pela amizade.

A todos os demais amigos que fazem parte de todos os momentos.

SUMÁRIO

	pág.
LISTA DE ABREVIATURAS.....	i
LISTA DE TABELAS	iii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	vi
I. INTRODUÇÃO.....	1
II. REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1 Mastite.....	4
2.2 Agentes etiológicos das mastites.....	5
2.3 Testes de suscetibilidade aos antimicrobianos.....	7
2.4 Resistência aos antibióticos.....	8
2.4.1 <i>Staphylococcus</i> sp.....	8
2.4.2 Enterobactérias.....	13
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1 Local e amostragem.....	15
3.2 Teste da caneca telada e California Mastitis Test (CMT).....	15
3.3 Isolamento e identificação de <i>Staphylococcus</i> sp.....	16
3.4 Identificação das espécies de <i>Staphylococcus coagulase</i> positiva.....	17
3.5 Isolamento e identificação de enterobactérias.....	18
3.6 Testes de suscetibilidade aos antimicrobianos.....	20
3.6.1 Teste de difusão em discos.....	20
3.6.2 Teste de triagem em ágar (ágar screen) para resistência à oxacilina e à ceftazidima.....	20
3.6.3 Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de oxacilina.....	21
3.6.3.1 Suscetibilidade antimicrobiana por diluição em ágar.....	21
3.6.3.2 Utilização do “E-test”.....	21
3.7 Detecção do gene <i>mecA</i> pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR).....	22
3.8 Detecção de enterobactérias produtoras de ESBLs pela técnica de difusão em discos.....	23
3.9 Análise dos Resultados.....	24
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
V. CONCLUSÕES.....	37
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS

ADH = hidrólise da arginina

ATCC = “American Type Culture Collection”

BHI = “brain heart infusion” – caldo cérebro coração

CCS = contagem de células somáticas

CMI = concentração mínima inibitória

CIT = utilização do citrato como fonte única de carbono

CMT = “California Mastitis Test”

CNF= fator necrosante citotóxico

DNA = ácido desoxiribonucléico

EDTA = ácido etileno diamino tetraacético

ESBLs = enzimas beta-lactamases de espectro estendido

EUA = Estados Unidos da América

GISA = *Staphylococcus aureus* com sensibilidade intermediária aos glicopeptídeos

h = horas

H₂O₂ = peróxido de hidrogênio

H₂S = ácido sulfídrico

IND = produção de indol

Kb = kilobyte

KCl = cloreto de potássio

KOH = hidróxido de potássio

LABIO = laboratório de biotecnologia animal aplicada

LDC = descarboxilação da lisina

MH = “Mueller-Hinton”

mL = mililitros

mm = milímetros

mM = milimolar

MRSA = *Staphylococcus sp* resistentes à oxacilina

MRSCN = *Staphylococcus* coagulase negativos resistentes à oxacilina

NA = ágar nutriente

NaCl = cloreto de sódio

NCCLS = “National Commitee for Clinical for Laboratory Standards” – Comitê Nacional para Padrões em Laboratório Clínico

nm = nanômetros

°C = graus Celcius

ODC = descarboxilação da ornitina

ONPG = hidrólise da β -galactosidase

pb = pares de base

PBP = “Protein Binding Penicillin” - proteína ligadora de Penicilina

PCR = “Polymerase Chain Reaction” - reação em cadeia de polimerase

PD = desaminação da fenilalanina

pH = potencial hidrogeniônico

PIA = adenosina intercelular polissacarídica

rpm = rotação por minuto

S.= *Staphylococcus*

SCN = *Staphylococcus* coagulase negativa

TEB = “Thread Environment Block”

TSA = testes de suscetibilidade a antimicrobianos

TSI = ágar tríplice açúcar ferro

U = unidades

UFC = unidades formadoras de colônia

UFU = Universidade Federal de Uberlândia

UNESP = Universidade Estadual de São Paulo

URE = produção de urease

UV = ultravioleta

V = volts

VP = “Voges Proskauer”

VP₁= utilização da glicose e produção de acetoína

VRSA = *Staphylococcus aureus* com resistência completa à vancomicina

µg = micrograma

µL= microlitro

LISTA DE TABELAS

	pág.
Tabela 1. Identificação de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva por meio de provas bioquímicas.....	17
Tabela 2. Distribuição dos agentes etiológicos isolados de mastites recorrentes em oito propriedades rurais de Uberlândia-MG...	26
Tabela 3. Identificação de enterobactérias isoladas de mastites clínicas e subclínicas em oito propriedades de Uberlândia-MG.....	28
Tabela 4. Perfil de resistência aos antimicrobianos de enterobactérias isoladas de mastites clínicas e subclínicas em oito propriedades rurais de Uberlândia-MG.....	29
Tabela 5. Comparação entre diferentes testes na detecção de resistência à ceftazidima em enterobactérias isoladas de mastite em oito propriedades rurais de Uberlândia-MG.....	30
Tabela 6. Perfil de resistência aos antimicrobianos de <i>Staphylococcus</i> sp resistentes e sensíveis a oxacilina isolados de mastites em oito propriedades rurais de Uberlândia-MG.....	32
Tabela 7. Resistência a oxacilina observada no teste de triagem, técnica de difusão em disco e CMI pelos métodos da incorporação do antibiótico em ágar e E-test de 38 espécimes de <i>Staphylococcus</i> sp isolados de mastites.....	33
Tabela 8. Distribuição do gene <i>mecA</i> em estafilococos isolados de mastite bovina clínica e subclínica de oito propriedades rurais de Uberlândia-MG com resistência a oxacilina (CMI \geq 4 μ g) nos testes de incorporação em ágar e E-test.....	34
Tabela 9. Comparação entre diferentes testes na detecção de resistência à oxacilina de <i>Staphylococcus</i> isolados de mastite em oito propriedades rurais de Uberlândia-MG.....	36

***Staphylococcus* sp e ENTEROBACTÉRIAS ISOLADAS DE MASTITE RECORRENTE EM OITO REBANHOS DA REGIÃO DE UBERLÂNDIA-MG: PERFIL DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS.**

RESUMO

Foram colhidas para análise microbiológica, 134 amostras de leite provenientes de vacas com mastite clínica ou subclínica recorrentes em oito (8) propriedades rurais de Uberlândia-MG. As amostras foram submetidas a cultivo em meios de cultura para verificar a presença de *Staphylococcus sp* e enterobactérias e os espécimes isolados submetidos a diferentes testes para verificar a suscetibilidade a antimicrobianos. Adicionalmente, as enterobactérias e os *Staphylococcus sp* isolados foram identificados quanto à espécie. Das amostras de leite mastítico avaliadas houve crescimento bacteriano em 61,19% (82/134) ocasiões. O agente etiológico mais prevalente foi o *Staphylococcus sp*, com índice de 90,24% (74/82), seguido das enterobactérias, que foram isoladas em 24,39% (20/82) episódios. O teste de difusão em disco (antibiograma) realizado para os espécimes do gênero *Staphylococcus* isolados demonstrou que a maioria dos isolados apresentava característica de multiresistência. Dos 38 espécimes de *Staphylococcus sp* que apresentaram resistência à oxacilina no teste de difusão de discos, em 40,54% (30/74) a resistência foi confirmada pela CMI e em 33,78% (25/74) foi detectado o gene *mecA*. O perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos das enterobactérias determinada no teste de difusão em discos demonstrou que 100% (20/20) apresentaram resistência à ampicilina e amicacina, 65,00% (13/20) à amoxicilina e tetraciclina, 15,00% (3/20) à ceftazidima e cloranfenicol, 10,00% (2/20) a cefotaxima, 5,00% (1/20) a aztreonam e gentamicina e 0% (0/20) a ceftriaxona, imipenem e ciprofloxacina. Em somente um isolado (5%) identificado como *Escherichia coli* foi confirmada a resistência a ceftazidima no ágar de triagem e teste do sinergismo em disco duplo pela produção da enzima betalactamase de espectro estendido (ESBLs), confirmada. Os resultados evidenciaram uma alta porcentagem de cepas resistentes, reforçando a importância do uso adequado e monitorado de antibióticos, já que estes microrganismos podem ser disseminados pelo leite e se transformarem em sério problema de saúde pública.

Palavras-chave: antimicrobianos, enterobactérias, mastite bovina, *mecA*, *Staphylococcus sp*

***Staphylococcus sp* AND ISOLATED ENTEROBACTERIA OF RECURRENT MASTITIS IN EIGHT HERDS OF THE REGION OF UBERLÂNDIA-MG: PROFILE OF SUSCEPTIBILITY TO THE ANTIMICROBIAL AGENTS.**

ABSTRACT

About 134 milk samples proceeding from cows with clinical or subclinical recurrent mastitis in eight properties of Uberlândia-MG were submitted the microbiological analysis. The samples had been submitted the culture to verify the presence of *Staphylococcus sp* and enterobacterias and isolated specimens were submitted the different tests to verify the susceptibility to the antimicrobials. Additionally, the enterobactérias and *Staphylococcus sp* isolated had been identified to the species level. The mastitic milk samples were evaluated and demonstrated bacterial growth in 61,19% (82/134) occasions. The more prevalent etiologic agent was the *Staphylococcus sp*, (90,24% - 74/82) followed of the enterobacterias (24,39% - 20/82). The susceptibility test by disk diffusion demonstrated that the majority staphylococci strains of the isolated presented multiresistance. Of 38 *Staphylococcus* specimens had presented resistance to the oxacillin (40,54% - 30/74), in thirty this isolated the resistance was confirmed by the CMI (40,54% - 30/74) and twenty-five the *mec A* gene was detected (33,78% -25/74). The antibiogram for the enterobacterias demonstrated that (20/20) they had 100% presented resistance to the ampicillin and amikacin, amoxicillin and tetracycline (65.00% - 13/20), ceftazidime and chloramphenicol (15.00%-3/20), cefotaxime(10.00%-2/20), aztreonam and gentamicine (5.00%-1/20)and ceftriaxone, imipinem and ciprofloxacin (0% -0 /20). Only isolated (5%) identified as *Escherichia coli* demonstrated resistance to the ceftazidime and demonstrated to be producing of ESBL by double-disk diffusion test. The results had evidenced high resistant between the strains isolated, strengthening the importance of the adequate and monitored use of antibiotics, since these microorganisms can be spread by milk and transform into serious problem of public health.

Word-key: antimicrobials, *Staphylococcus*, enterobacterias, mastitis bovine, *mecA*

I. INTRODUÇÃO

A produção de leite no Brasil aumentou de 16,5 bilhões de litros em 1994 para mais de 25 bilhões de litros em 2005. O estado de Minas Gerais é o maior produtor nacional com produção de sete milhões de litros em 2005 e possui como principal região produtora, o Triângulo Mineiro (FEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO ESTADO DE MINAS GERAIS, 2006).

Sabe-se que, um litro de leite por dia supre as necessidades protéicas e de cálcio de crianças com até seis anos de idade e mais de 50% das proteínas requisitadas pelos adultos (LARANJA DA FONSECA, SANTOS, 2000). Espera-se, portanto, a preocupação em assegurar a integridade e a qualidade intrínseca do leite e de seus derivados destinados ao consumo humano (FAGUNDES, OLIVEIRA, 2004).

Dentre as doenças que acometem o rebanho leiteiro e comprometem a qualidade do leite, a mastite ocupa lugar de destaque por possuir importância econômica e para a saúde pública. Apesar de ser a doença mais importante em termos econômicos para a indústria leiteira, é difícil de ser controlada (PYORALA, 2002).

As mastites podem ser classificadas quanto à forma de apresentação, em clínica ou subclínica (MENDONÇA *et al.*, 1999). Conforme Laranja da Fonseca e Santos (2000) os prejuízos no Brasil atribuídos às formas clínica e subclínica, produzem diminuição na produção de 30% e 70%, respectivamente. Além disso, há gastos com medicamentos e assistência veterinária, inutilização de leite contaminado após tratamento, descarte precoce de animais doentes e dificuldade no controle do rebanho (COSTA *et al.*, 1999; FREITAS *et al.*, 2005; CUNHA *et al.*, 2006).

A etiologia da mastite pode ser de origem tóxica, traumática, alérgica, metabólica ou infecciosa. Destacam-se como agentes das infecciosas, as bactérias do gênero *Staphylococcus* (COSTA *et al.*, 1995; BRITO *et al.*, 2002; FREITAS *et al.*, 2005; CUNHA *et al.*, 2006). Os *Staphylococcus aureus* tem sido o mais frequentemente isolado tanto de infecções clínicas como subclínicas em vacas leiteiras (WATTS, 1988; BOOTH, 1995; BRAMLEY *et al.*, 1996; BRITO *et al.*, 1999; ZSCHOCK *et al.*, 2000; AMARAL *et al.*, 2003; FERREIRA *et al.*, 2006). Porém, Gentilini *et al.* (2002), Pitkälä *et al.* (2004), Freitas *et al.* (2005) e Cunha *et al.* (2006)

relatam que *Staphylococcus* coagulase negativos são os principais agentes etiológicos em ambas as formas.

Staphylococcus aureus é reconhecidamente um dos mais importantes agentes de doenças piogênicas, tanto em animais como em humanos (ARCHER, 1998; BEAN, GRIFFIN, 1990). É capaz também, de pré-formar nos alimentos diferentes enterotoxinas termoestáveis (BERGDOLL, 1989; MELCHÍADES *et al.*, 1993; OMOE *et al.*, 2002). Desta forma, o leite mastítico e os produtos derivados podem se tornar veiculadores de toxinfecções alimentares (BERGDOLL, 1989; MELCHÍADES *et al.*, 1993; COSTA *et al.*, 2000; FAGUNDES, OLIVEIRA, 2004).

Staphylococcus sp se destaca pela capacidade de ser ou se tornar resistente a um grande número de antibióticos (FREITAS *et al.*, 2005). Espécimes desse gênero, isolados em ambiente hospitalar humano, têm mostrado perfil de multiresistência (SANTOS *et al.*, 1999; SADOYAMA, GONTIJO FILHO, 2000). Martins *et al.* (1998) e Ferreira *et al.* (2006) associaram o agravamento da resistência bacteriana ao uso freqüente e indiscriminado de antimicrobianos e, aos mecanismos de transferência de resistência entre os microrganismos. Este fato é comumente observado no campo em surtos de mastite (BRITO *et al.*, 2001).

A resistência dos *Staphylococcus* sp à oxacilina é um sério problema de saúde pública na área urbana e que também pode estar sendo disseminado no meio rural. Está relacionada à presença do gene *mecA*, que torna os microrganismos intrinsecamente resistentes também a outros antimicrobianos (SAHM, 1994; CARVALHO, BEREZIN, 2004). Este fato é reforçado por estudos de similaridade genética realizados por Fontana (2002), Fabiano (2003) e Ferreira *et al.* (2006) que compararam o padrão genotípico e de suscetibilidade a drogas antimicrobianas com ênfase no gênero *Staphylococcus* e concluíram que há alto grau de similaridade genética entre espécimes de origem humana e animal.

As enterobactérias são consideradas importantes agentes das mastites ambientais (PRESTES *et al.*, 2003). Dentre as espécies de importância clínica, a *Escherichia coli* destaca-se por ser responsável por episódios de severa manifestação clínica (BRABES *et al.*, 2003). Geralmente, nestes casos, além da antibioticoterapia, é importante o tratamento sintomático, já que, as toxinas podem levar o animal ao choque e morte (OLIVEIRA *et al.*, 2000).

OBJETIVOS

Considerando a importância do leite na economia, alimentação humana e possibilidade de veiculação de bactérias multiresistentes, esse trabalho possuiu por objetivos determinar em leite proveniente de animais de oito propriedades rurais da região de Uberlândia com histórico de mastite recorrente:

- a incidência de *Staphylococcus* sp e enterobactérias como agentes etiológicos;
- a resistência à oxacilina e o perfil de suscetibilidade dos *Staphylococcus* sp isolados a múltiplos antimicrobianos;
- a resistência à ceftazidima e o perfil de suscetibilidade das enterobactérias isoladas a múltiplos antimicrobianos;
- entre as enterobactérias isoladas, a resistência à ceftazidima utilizando os testes da difusão em gel, ágar de triagem e detecção de produção de beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs);
- entre os *Staphylococcus* spp isolados, comparar a resistência à oxacilina utilizando os testes da difusão em gel, ágar de triagem, concentração mínima inibitória (CMI) e presença do gene *mecA*, comparando os resultados obtidos nestes métodos.

II. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Mastite

Mastite é a denominação do processo inflamatório da glândula mamária (COSTA, 1998), classificada quanto à forma de apresentação em clínica e subclínica e quanto à forma de transmissão, em primária (contagiosa) e secundária (ambiental) (MENDONÇA *et al.*, 1999). Langenegger *et al.* (1981) relatam que a forma subclínica é mais prejudicial que a forma clínica, pela falta de sintomas ou sinais determinando perdas econômicas maiores devido à frequência de persistência do processo.

O “California Mastitis Test” (CMT), idealizado por Schalm e Noorlander (1957), é capaz de detectar o processo inflamatório na glândula mamária e é aceito internacionalmente para o diagnóstico da mastite subclínica no campo (COSTA *et al.*, 1996). Campos (2000) acrescenta que esse é um bom teste preditivo positivo.

O teste da caneca telada ou de fundo escuro deve ser realizado a cada ordenha nos primeiros jatos de leite. A visualização de grumos no leite decorrentes de alterações por depósito de leucócitos permite o diagnóstico de formas clínicas de mastite. O contraste do fundo negro da caneca com os grumos facilita a visualização de alterações e o diagnóstico precoce (FURLONG, RIBEIRO, 2006). Adicionalmente, sinais clínicos da infecção como edema, vermelhidão e dor podem ser observados (HIRSH, ZEE, 2003).

Os agentes etiológicos da mastite contagiosa necessitam do animal para a sobrevivência, pois se multiplicam na glândula mamária, canal do teto ou sobre a pele. A mastite é transmitida de uma vaca infectada para outra sadia, principalmente, durante a ordenha (COSTA, 1998; PRESTES *et al.*, 2003). Figueiredo (1995) afirma que as mastites contagiosas se caracterizam por apresentar alta incidência de casos subclínicos, tendência a cronicidade e alta contagem de células somáticas (CCS).

A mastite ambiental é causada por agentes que vivem preferencialmente no habitat da vaca, em locais que apresentam esterco, urina, barro e matéria orgânica (FIGUEIREDO, 1995; FREITAS *et al.*, 2005). Este tipo de mastite caracteriza-se por alta incidência de casos clínicos, geralmente de curta duração, frequentemente, com manifestação aguda e com maior concentração nos momentos do pré e pós-parto

imediatamente (ERB *et al.*, 1984; ERSKINE *et al.*, 1988). A infecção ocorre preferencialmente no período entre as ordenhas (COSTA, 1998).

Mastite é a doença que mais causa perdas econômicas para a indústria leiteira e é considerada de impossível erradicação, porém, passível de controle (PYORALA, 2002; PRESTES *et al.*, 2003). A prevalência da doença no Brasil é variável quanto à distribuição e época de análise. 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).

Além da diminuição na produção leiteira, o leite mastítico representa um 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 (PRESTES *et al.*, 2003). As alterações na composição são responsáveis por diminuição no rendimento industrial, baixa qualidade dos fermentados e diminuição na vida de prateleira dos derivados lácteos.

2.2 Agentes etiológicos das mastites

Os microrganismos são os agentes etiológicos mais comuns das mastites e as bactérias as mais envolvidas (PRESTES *et al.*, 2003; VIANNI, LÁZARO, 2003; FREITAS *et al.*, 2005). Entre os microrganismos isolados em casos de mastite bovina se destacam os *Staphylococcus* sp, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Corynebacterium* spp e *Escherichia coli* (BRABES *et al.*, 1999; BRITO *et al.*, 1999, BRITO *et al.*, 2001; RABELLO, 2003).

Os *Staphylococcus* sp 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 em infecções de vacas leiteiras (WATTS, 1988; BOOTH, 1995; BRAMLEY *et al.*, 1996; BRITO *et al.*, 1999; BRITO *et al.*, 2001). Porém, de acordo com Waage *et al.* (1999), Freitas *et al.* (2005) e Cunha *et al.* (2006) os *Staphylococcus* coagulase negativos (SCN) são

os agentes etiológicos mais isolados de mastites clínicas e subclínicas em bovinos leiteiros em todo o mundo.

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) relatam 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, tanto em vacas e novilhas quanto no alimento, na 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).

Provavelmente, a adesão aos bocais das ordenhadeiras pelos *Staphylococcus* sp ocorra de forma semelhante ao descrito para o *Staphylococcus epidermidis*. Esse microrganismo é capaz de produzir um mucopolissacarídeo extracelular amorfo (*slime*) que permite a agregação bacteriana, levando à formação de um verdadeiro filme biológico. A produção do biofilme favorece a colonização desta bactéria nas superfícies plásticas e nos tecidos do hospedeiro e esta aderência é controlada por interações hidrofóbicas entre as bactérias e estas superfícies (NOVAK, 1999).

O gênero *Staphylococcus* possui 35 espécies e 17 sub-espécies, dentre elas, as espécies coagulase positivas apresentam maior importância clínica devido aos seus fatores de patogenicidade. *Staphylococcus aureus* no indivíduo sadio é considerado um microrganismo comensal das narinas anteriores, pele úmida, boca e intestino. Porém, estes microrganismos apresentam propriedades que lhes permite uma rápida colonização e posterior invasão através de pequenas lesões na pele e mucosas, sendo que nas mastites, as mãos dos ordenhadores são consideradas como principais vias de transmissão (KLOOS, BANNERMAN, 2003; RODOLPHO, 2002).

As espécies coagulase positivas *Staphylococcus intermedius* e coagulase variáveis *Staphylococcus hyicus* são particularmente importantes na medicina veterinária e junto com os *Staphylococcus aureus* são patógenos oportunistas em animais (KLOOS, BANNERMAN, 2003). Dentre as diferentes provas bioquímicas

que podem ser utilizadas para a diferenciação destas espécies, Kloos (1990) propõe uma chave simplificada com os testes de produção de acetoina, utilização anaeróbica do manitol e produção de β -galactosidase.

Os principais grupos de bactérias causadoras de mastites ambientais são os coliformes e os estreptococos não *agalactiae* (LARANJA DA FONSECA; SANTOS, 2000). Entre os coliformes, a *Escherichia coli* é a mais prevalente e grave, porque geralmente resulta em casos agudos decorrentes de um quadro causado por toxinas e, causam mais frequentemente, casos de mastite clínica. No entanto, Waage *et al.* (1999) estudaram casos de mastites clínicas bovinas e verificaram que os SCNs eram os principais agentes. Nesse estudo, o autor não determinou se os SCNs isolados eram adquiridos durante a ordenha ou do ambiente.

2.3 Testes de suscetibilidade aos antimicrobianos

Para avaliar a suscetibilidade a antimicrobianos (TSA) de espécimes isolados, os métodos habituais são baseados tanto em técnicas de difusão como de diluição em ágar. O método de difusão em disco consiste na interpretação da medida do halo de inibição formado pelo antibiótico (NCCLS, 2000a).

Quando o teste da difusão em discos é utilizado para detectar resistência à oxacilina, deve ser realizado com discos de 1 μ g/mL (micrograma/mililitro). A meticilina foi pretendida para uso em testes laboratoriais de resistência porque a oxacilina é mais estável ao armazenamento e melhor para identificar as cepas heteroresistentes, embora o termo metilino resistente seja mantido por razões históricas. Embora esta resistência intrínseca seja definida como CMI \geq 4 μ g/mL de oxacilina pelo método de diluição em ágar, o método com disco de oxacilina de 1 μ g (micrograma) é considerado confiável para detecção de resistência (CARVALHO, BEREZIN, 2004).

O método de diluição consiste em diluições seriadas de antibióticos em caldo ou ágar e fornece a CMI de um dado antimicrobiano que, sob condições experimentais definidas, inibe o crescimento de uma bactéria. O valor da CMI é o critério de referência para definir a suscetibilidade de determinado antimicrobiano, de acordo com o NCCLS (2000b).

O E-test é baseado numa combinação dos conceitos de testes de diluição e difusão, quantificando diretamente a suscetibilidade antimicrobiana. Mesmo sendo

processado como o método de difusão em disco, esse teste difere do método convencional pelo uso de um gradiente pré-definido do antibiótico que é usado para determinar a CMI em $\mu\text{g/mL}$. O gradiente reflete uma faixa contínua de concentração, que varia de 0,016 $\mu\text{g/mL}$ a 256 $\mu\text{g/mL}$. Após incubação, quando o crescimento bacteriano se torna visível, uma elipse de inibição simétrica ao redor da fita é visualizada (NCCLS, 2000b).

2.4 Resistência aos antibióticos

2.4.1 *Staphylococcus* sp

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.

Espécimes de *Staphylococcus aureus* isolados de leite mastítico bovino também apresentam características de virulência e resistência a diversos antibióticos utilizados rotineiramente no tratamento da doença (FREITAS *et al.*, 2005).

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 (NOVAK, 1999; FREITAS *et al.*, 2005).

As infecções por bactérias multiresistentes 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 através da CMI que *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 perfil de suscetibilidade de 59 espécimes de *Staphylococcus* coagulase positiva isoladas de leite mastítico e verificaram 100% de sensibilidade à vancomicina e 96% à norfloxacin. Entretanto, observou cepas com resistência múltipla para seis a nove antibióticos simultaneamente e concluíram que o percentual de multiresistência 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* multiresistentes nas últimas décadas foi relacionado com a pressão seletiva exercida por antimicrobianos (FAGUNDES, OLIVEIRA, 2004). Esta resistência proporciona às amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina (MRSA), uma vantagem seletiva para a colonização e infecção (STRUELLENS *et al.*, 1992; SHLAES *et al.*, 1997). A infecção ou colonização MRSA constitui um sério problema, uma vez que se trata de um microrganismo resistente à maioria dos antimicrobianos usualmente disponíveis para o tratamento de estafilocóccias, tais como: β -lactâmicos, aminoglicosídeos, macrolídeos, tetraciclinas, quinolonas, sulfametoxazol-trimetoprima e outros (GONÇALVES *et al.*, 1987).

De acordo com Sahm (1994) e Lee (2003) a resistência dos *Staphylococcus* sp à oxacilina está relacionada à presença do gene *mecA* (determinante genético da resistência), que torna os microrganismos intrinsecamente resistentes também a outras drogas. Esta resistência ocorre devido à presença de uma proteína ligadora de penicilina (PBP- “Protein Binding Penicillin”), de baixa afinidade para os β -lactâmicos, chamada de PBP 2' ou PBP 2^a, resistentes às penicilinas, presente na membrana plasmática e codificada pelo gene cromossômico *mecA* (CHAMBERS, 1988; HACKBARTH, CHAMBERS, 1989). Além deste mecanismo de resistência, a inativação por β -lactamases e a produção de PBPs modificadas (MOD-SA), podem coexistir e até se tornarem interativas (DeLANCASTRE *et al.*, 1991).

O primeiro surto de infecção causada por MRSA foi caracterizado em um hospital europeu no início da década de 60 (CHAMBERS, 1997). Poucas semanas após o lançamento da meticilina que ocorreu em 1961, foi isolada uma cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a essa droga na Inglaterra (NOVAK, 1999). Existem evidências de que esse tipo de resistência já existia antes do uso desse antibiótico β -lactâmico semi-sintético (COOKSON *et al.*, 1990). Entretanto, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina recebeu maior destaque a partir do final da década de 80, devido à ocorrência de surtos graves de infecções hospitalares em berçários e unidades de terapia intensiva (NOVAK, 1999). Archer (1998) destaca que a terapêutica das estafilocóccias tem se tornado mais difícil devido ao aumento, em todo o mundo, da prevalência de cepas resistentes à meticilina.

Nas últimas décadas, MRSA tornou-se rapidamente um problema clínico e epidemiológico nos EUA, sendo freqüente em hospitais terciários e naqueles ligados ao ensino universitário (BOYCE, 1989; BOYCE *et al.*, 1994; BOOTSMA *et al.*, 2006).

No Brasil, estima-se que a prevalência de amostras de MRSA seja alta, principalmente em hospitais de grande porte e/ou de ensino (SANTOS *et al.*, 1999). Um estudo realizado no Hospital São Paulo da Escola Paulista de Medicina mostra que esta prevalência é superior a 50% (WEY, 1990). Cerca de 50% dos *Staphylococcus aureus* isolados por Sadoyama e Gontijo Filho (2000) apresentaram resistência a oxacilina.

Além da importância como causa de infecções endêmicas, o MRSA está entre os patógenos mais associados a surtos hospitalares, nos quais o principal modo de transmissão é pelas mãos de profissionais de saúde (VAN OGTRON *et al.*,

1997). Esta resistência pode estar sendo disseminada também no meio rural, pois de acordo com Brito *et al.* (2001) a resistência aos antimicrobianos é comumente observada no campo em surtos de mastite.

Nunes (2000) afirma que os microrganismos resistentes não é um problema restrito ao ambiente hospitalar e que esses microrganismos estão disseminados também na comunidade. A ocorrência de MRSA adquirido na comunidade era raramente identificada até que em 1999 foram relatados nos EUA, óbitos de crianças, causados por um clone de MRSA. Recentemente, outros casos de colonização e infecção comunitária por MRSA foram relatados em indivíduos destituídos dos tradicionais fatores de risco (BOYCE *et al.*, 2001; CARVALHO, BEREZIN, 2004). Entretanto, a transmissão de espécimes MRSA de bovinos para humanos nunca foi confirmada (NATIONAL MASTITIS COUNCIL RESEARCH COMMITTEE REPORT, 2000).

Um problema diretamente ligado às mastites estafilocócicas é a possibilidade de produção de toxinas. De acordo com Fagundes e Oliveira (2004) não foram encontradas referências na literatura, que atestem a inativação eficiente das toxinas estafilocócicas dos alimentos pelos processos usuais de pasteurização ou esterilização industrial do leite e derivados. Esses autores afirmam que existe associação entre a atividade enzimática específica, a enterotoxigenicidade e a resistência de *Staphylococcus aureus* a vários antibióticos. Estudos realizados com espécimes isolados de casos clínicos e subclínicos de mastite bovina demonstram entre 20% e 77% dos isolados são produtores de enterotoxinas. Dos espécimes isolados de tanques de expansão, 75,4% demonstram capacidade de produzir essas toxinas.

Segundo o National Mastitis Council Research Committee Report (2004) o tratamento da mastite é a causa mais comum de resíduos de antibióticos no leite. Nesse mesmo estudo é discutido que esses resíduos quando consumidos podem induzir resistência em humanos.

Há poucos relatos na literatura de infecções por MRSA em animais (SEGUIN *et al.*, 1999; TOMLIN *et al.*, 1999). Ziv (1995) isolou amostras de *Staphylococcus aureus* em 20 rebanhos leiteiros da Bélgica e a resistência à oxacilina foi observada em 1% a 3% dos espécimes isolados. Lee (2003) realizou um estudo na Coreia em fezes, leite, traquéia, útero, ração, carne de bovinos, suínos e aves e isolou 28

Staphylococcus aureus resistentes a oxacilina. Em 53,57% (15/28) destas cepas foi detectado o gene *mecA*, sendo que 60% (9/15) foram isoladas de mastites bovinas.

Malik *et al.* (2006) avaliaram 252 animais (192 cães e 60 gatos) e encontraram dez amostras de *Staphylococcus* sp resistentes à oxacilina. Estas espécimes com resistência a oxacilina foram isoladas de animais infectados e saudáveis, sendo dois isolados identificados como *Staphylococcus aureus* e oito como SCNs.

De acordo com Sakoulas *et al.* (2001) espécimes que apresentam resistência na prova de difusão em ágar e CMI $\geq 4 \mu\text{g/mL}$ à oxacilina são consideradas resistentes. Entretanto, poucos isolados MRSA apresentam resistência homogênea à oxacilina. Assim, Frebourg *et al.* (1998), Hussain *et al.* (2000) e Lee *et al.* (2004) afirmam que a comprovação de amostras MRSA deve ser realizada por meio da CMI e da identificação do gene *mecA* pela técnica da PCR, sendo este último considerado como padrão ouro (“gold standard”) para confirmação de espécimes MRSA e MRSCN (*Staphylococcus* coagulase negativo resistentes à oxacilina). Entretanto, condições particulares de conservação dos espécimes devem ser observadas. Griethuysen *et al.* (2005) afirmam que após estocagem a temperaturas inferiores a -80°C , o gene *mecA* pode ser perdido, pois determinaram que o gene não foi mais detectado em 91,43% (32/35) amostras avaliadas após a estocagem sob congelamento.

A resistência oxacilina é uma consequência inevitável da pressão seletiva exercida pelos antibióticos. O glicopeptídeo vancomicina representa a primeira escolha para o tratamento das infecções causadas por MRSA (CHAMBERS, 1997) e permanece como o agente de escolha para o tratamento das infecções provocadas por MRSA teicoplanina (BOYCE *et al.*, 2001; SHIOMORI *et al.*; 2002). Porém, esta informação possui pouco significado na medicina veterinária porque a vancomicina é restrita ao uso hospitalar humano e vetada para o tratamento de animais.

2.4.2 Enterobactérias

As enterobactérias são grupos de bactérias Gram negativas, fermentadoras da glicose e oxidase negativas que inclui espécies como a *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp e *Enterobacter* sp.

Dentre as enterobactérias, a mais frequentemente isolada em episódios de mastite é a *Escherichia coli*, sendo esta espécie considerada um dos principais

agentes etiológicos da mastite bovina de origem ambiental. As infecções por *E. coli* na glândula mamária estão relacionadas ao comportamento oportunista do agente, que é veiculado pelas fezes dos animais e chega pela via ascendente ao canal galactóforo (RADOSTITS *et al.*, 2000).

A proporção de mastite causada por coliformes varia entre os diferentes países. Na Finlândia menos de 20% dos casos são atribuídos aos coliformes, já em Israel esta taxa pode ser superior a 60% (KAIPAINEM *et al.*, 2002). A mastite causada por *E. coli* pode ser esporádica e os sinais clínicos podem ser localizados ou resultarem em sintomas clínicos severos com episódios fatais. A severidade da doença depende do “status imune” da vaca, mas os fatores de virulência do microrganismo parece ter um importante papel no desenvolvimento da doença (SHPIGEL *et al.*, 1998).

Diversos fatores de virulência detectados em amostras patogênicas de *E. coli* podem ser causas de infecções do trato urinário, diarreias, sepsis e meningite em animais e humanos, entre eles: toxinas, adesinas, invasinas, presença de cápsula, capacidade de resistir ao poder bactericida do soro e captação de ferro. Dentre estes fatores assume destaque a produção do fator necrosante citotóxico (CNF), que tem sido associado a uma grande variedade de infecções no homem e nos animais. Este fator é subdividido em CNF1 e CNF2, e é considerado importante mecanismo de virulência de *E. coli* (SUSSMAN, 1997). Em geral, a ocorrência de CNF em *E. coli* de origem animal e/ou humana está relacionada à produção de alfa-hemolisina. Em células Vero, o CNF induz a formação de células gigantes, multi-nucleadas e morte celular (GYLES, 1992).

As enterobactérias possuem mecanismos genéticos que as tornam facilmente resistentes aos antimicrobianos. A denominação de betalactamases é utilizada para nomear as enzimas ativas contra os antibióticos betalactâmicos (SANDERS, 1997; SZABÓ, ROZGONYI, 1997). Com a introdução de novos betalactâmicos foram observadas mudanças nessas enzimas, que se tornaram as enterobactérias resistentes às novas drogas como as cefalosporinas de largo espectro, monobactâmicos, carbapenema e combinação destas drogas. Espécimes com estas características foram denominadas como ESBLs (PITOUT *et al.*, 1997).

As ESBLs são armazenadas no espaço periplasmático de bactérias Gram negativas e são codificadas por genes localizados no DNA (ácido desoxirribonucléico) cromossômico ou extra-cromossômico, nos plasmídeos e/ou

transposons (SANDERS *et al.*, 1993; JONES *et al.*, 2000). ESBLs são inibidas pela presença do ácido clavulânico, subactam e tazobactam, que quando associados aos antibióticos betalactâmicos, ligam-se às betalactamases e determinam sua inativação. Essa característica é utilizada em laboratório em técnicas de difusão em discos para identificar bactérias produtoras de ESBLs.

Com a continuidade do uso da associação de betalactâmicos com o ácido clavulânico, começaram a ser observadas cepas resistentes, que bloqueiam a capacidade inibitória destas drogas sobre as betalactamases. Philippon *et al.* (2002) afirmam que esse mecanismo de resistência está relacionada à presença do gene *ampC* localizado em um plasmídeo. Zaid *et al.* (2003) observaram uma alta prevalência de resistência a quinolonas em cepas de *Escherichia coli* isoladas de humanos e de animais.

III. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local e amostragem

Um levantamento foi realizado com o objetivo de identificar propriedades do município de Uberlândia – MG, onde havia relatos de mastite recorrente. Foram considerados animais com mastite recorrente aqueles que apresentaram a doença em duas ou mais lactações consecutivas, independente do isolamento do agente etiológico ou uso de terapêutica. A partir daí, em cada propriedade foi realizada a identificação dos animais por números em fichas próprias.

Nos rebanhos estudados o sistema de criação era semi-intensivo, com os animais ordenhados mecanicamente duas vezes ao dia. A raça predominante era a holandesa ou mestiça com predominância de sangue holandês. Nas oito propriedades rurais foram selecionadas para estudo, 140 vacas leiteiras que se enquadravam dentro do critério adotado, ou seja, histórico de mastite em duas ou mais lactações. As colheitas foram realizadas no período de novembro de 2003 a abril de 2004.

Na fazenda, imediatamente antes da ordenha, os animais foram submetidos ao teste da caneca telada e CMT e o leite dos animais positivos foi classificado como proveniente de mastite clínica e subclínica, respectivamente. Os animais considerados positivos foram segregados, tiveram as tetas submetidas à lavagem com água e sabão neutro e secagem com papel toalha estéril e, então foi coletada amostra de leite por ordenha manual em tubo de ensaio estéril. As amostras foram imediatamente transportadas ao Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada (LABIO) da UFU - Universidade Federal de Uberlândia onde foram cultivadas para isolamento de *Staphylococcus* sp e enterobactérias.

3.2 Teste da caneca telada e *California Mastitis Test* (CMT)

Animais com mastite clínica foram identificados pelo teste da caneca telada ou de fundo escuro, utilizando os primeiros jatos de leite de cada teta. Foi considerada positiva a amostra que apresentou leite coagulado, sangue ou substância purulenta (RIBEIRO *et al.*, 2003). Adicionalmente foram observados sinais clínicos da infecção.

Para realização do teste CMT foram coletados 2mL a 3mL de leite de cada quarto mamário, com o auxílio de uma bandeja e adicionado a mesma quantidade do reagente (detergente aniônico e púrpura de bromocresol). A leitura foi realizada na mistura, após movimentos giratórios lentos e o resultado considerado positivo quando foi observada a ocorrência de geleificação e mudança de cor da amostra. O resultado foi interpretado como reação negativa, traços, 1, 2 ou 3 cruces, dependendo da quantidade de formação de gel na amostra (CORRÊA, CORRÊA, 1992).

3.3 Isolamento e identificação de *Staphylococcus* sp

Para isolamento e identificação dos *Staphylococcus* sp, o leite foi semeado com auxílio de suabe na superfície de placas de Petri contendo ágar seletivo e diferencial manitol salgado e as placas incubadas a 37°C por 24 a 48 horas (KONEMAN *et al.*, 2001). As colônias tiveram suas características anotadas e foram cultivadas em ágar NA (ágar nutriente) e caldo BHI (“brain heart infusion”) por 24 horas a 37°C.

Os espécimes isolados em NA e BHI foram identificados por meio da coloração diferencial de Gram (TORTORA *et al.*, 2002) e produção de catalase, que foi realizada em lâmina, adicionando a uma colônia, 0,2mL de H₂O₂ (peróxido de hidrogênio) 3% (SILVA *et al.*, 2001). Foram considerados como *Staphylococcus* sp, os isolados que apresentaram morfologia típica de cocos Gram positivos, agrupados em cachos e produção da enzima catalase.

Os espécimes identificados como *Staphylococcus* sp foram diferenciados em *Staphylococcus* coagulase positiva ou negativa por meio do teste da coagulase em tubo. Para realização da prova de coagulase, foi transferida 0,2mL de cada cultura obtida em caldo BHI para tubo de 10x100mm. Neste tubo, foi adicionado 0,5mL de plasma de coelho com ácido etileno diamino tetrácetico-EDTA (Laborclin®) e após homogeneização lenta, a mistura foi incubada a 37°C. A formação de coágulo foi monitorada a cada hora por 4 horas e após 24 horas de cultivo. O resultado foi interpretado como reação negativa, traços, 1, 2 ou 3 cruces, dependendo da intensidade de formação de coágulo na amostra (SILVA *et al.*, 2001; HIRSH, ZEE, 2003).

3.4 Identificação das espécies de *Staphylococcus* coagulase positiva

Para identificação das espécies coagulase positiva *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus hyicus* e *Staphylococcus intermedius* foi utilizado um sistema simplificado proposto por Kloos (1990) e testado por Brito *et al.* (2002). Os testes empregados foram: produção de acetoina, utilização anaeróbica do manitol e produção de β -galactosidase (KLOOS, 1990; KLOOS, BANNERMAN, 1999). A interpretação dos resultados obtidos nos testes foi realizada conforme recomendações contidas na Tabela 1 (KLOOS, 1990).

A prova de produção de acetoina foi realizada transferindo 0,1mL da cultura do caldo BHI para tubo contendo 2,5mL de caldo VP (“Voges Proskauer”) com incubação a 37°C por 48 horas. Após, foi transferido 1mL desta mistura para tubo de ensaio, adicionando-se 0,6mL de α -naftol a 5% e 0,2mL de hidróxido de potássio (KOH) a 40%. A cultura foi considerada positiva quando houve formação de coloração vermelha e negativa quando desenvolveu cor marrom. Quando o resultado era negativo, os tubos eram mantidos em temperatura ambiente por mais doze dias e, neste período, realizadas leituras de maneira semelhante à primeira (BARROW, FELTHAM, 1995).

Tabela 1. Identificação de *Staphylococcus* coagulase positiva por meio de provas bioquímicas.

Espécimes	Produção de	Utilização anaeróbia	Produção de β -
	Acetoína	do manitol	galactosidase
<i>S. aureus</i>	+	+	-
<i>S. intermedius</i>	-	-	+
<i>S. hyicus</i>	-	-	-

Fonte: Kloos (1990)

A utilização anaeróbica do manitol foi determinada de acordo com Roberson *et al.* (1992). A cultura proveniente do caldo BHI foi inoculada em tubo contendo ágar manitol salgado, que foi incubado em anaerobiose a 37°C por 24 a 48 horas. Foram considerados positivos os tubos que mudavam a coloração do indicador de

vermelha para amarela.

A atividade da β -galactosidase foi determinada de acordo com Koneman (1989), empregando-se como substrato o ONPG (hidrólise da β -galactosidase). Os espécimes cultivados em BHI foram inoculados em ágar TSI (ágar tríplice açúcar-ferro) e, posteriormente transferidas com auxílio da alça de platina para 0,5mL de solução de cloreto de sódio (NaCl) 0,85%. Em seguida, foi adicionado à cultura, um disco de ONPG, que foi incubada a 37°C. As leituras foram realizadas por até 24 horas após incubação, sendo a primeira após 4-6 horas. O resultado foi considerado positivo quando observado o desenvolvimento de cor amarela. Um cultivo de *Escherichia coli* ATCC 25922 (“American Type Culture Collection”) foi usado como controle positivo (KLOSS, BANNERMAN, 1995). As amostras identificadas foram estocadas em caldo BHI com 20% de glicerol à -20°C.

3.5 Isolamento e identificação das enterobactérias

O leite foi semeado com auxílio de suabe na superfície de placas de Petri contendo ágar MacConkey e incubado a 37°C por 24 a 48 horas (TORTORA *et al.*, 2002). Após a incubação, as colônias tiveram suas características anotadas (fermentadoras ou não fermentadoras da glicose) e repicadas em ágar NA por 24 horas para posterior identificação.

As colônias isoladas em NA foram submetidas à coloração diferencial de Gram e prova da citocromo oxidase conforme metodologia descrita por Silva *et al.* (2001). Foram consideradas como pertencentes à família *Enterobacteriaceae* os espécimes com morfologia de bacilos Gram negativos, fermentadores e citocromo oxidase negativos (TORTORA *et al.*, 2002).

Para identificação das espécies das enterobactérias isoladas foi utilizado o sistema comercial Bactray I e II da Larboclin®, indicado para bacilos Gram negativos fermentadores e oxidase negativa. Os procedimentos foram realizados conforme recomendações do fabricante. Inicialmente, colônia obtida em cultivo de 18-24 horas foi suspensa em água destilada estéril até turvação equivalente a 0,5 na escala de MacFarland. Esta suspensão (1mL) era transferida para o conjunto de análise Bactray I, distribuindo o volume entre os compartimentos que continham os

reagentes desidratados para realização das provas de: hidrólise da β -galactosidase (ONPG) e da arginina (ADH), descarboxilação da lisina (LDC) e da ornitina (ODC), produção de ácido sulfídrico (H_2S), indol (IND) e urease (URE), utilização da glicose e produção de acetoina (VP_1), desaminação da fenilalanina (PD) e utilização do citrato como única fonte de carbono (CIT). Óleo mineral estéril foi adicionado às provas de ADH, LDC, ODC, H_2S e URE e o conjunto incubado a $35^\circ C$ por 24 horas. A *Escherichia coli* ATCC 25922 foi utilizada como controle.

Após a incubação e adição de reagentes (α -naftol e hidróxido de potássio no VP, cloreto férrico no PD e reativo de Kovac's no IND) foi realizada a leitura por meio da mudança de cor nos compartimentos e os dados adicionados a uma planilha eletrônica componente do conjunto de análise. A identificação da espécie foi realizada pelo programa eletrônico (software), que também forneceu a porcentagem de confiança da identificação realizada. O resultado deste teste foi considerado adequado quando a confiança era acima de 90%. Adicionalmente, para os isolados em que a confiança de identificação foi menor que o estabelecido (90%), os procedimentos foram novamente realizados, porém, com inoculação no conjunto Bactray II®, que é considerado complementar ao Bactray I®. Este conjunto verifica a utilização do malonato, rhamnose, adonitol, salicina, arabinose, inositol, manitol e rafinose. A leitura foi realizada e a identificação realizada de forma idêntica à descrita anteriormente com utilização da planilha eletrônica.

Após identificação, as amostras foram estocadas em caldo BHI com 20% de glicerol à $-20^\circ C$.

3.6 Testes de suscetibilidade aos antimicrobianos

3.6.1 Teste de difusão em discos

Todas as amostras de *Staphylococcus* spp e enterobactérias foram submetidas à avaliação frente a antimicrobianos, utilizando protocolo recomendado pelo NCCLS (2000a). Três a cinco colônias puras recentes (18 a 24 horas) dos espécimes previamente isolados e identificados foram semeadas em caldo Mueller-Hinton (MH) e incubados a 37°C até atingir turvação correspondente ao tubo 0,5 da escala de MacFarland. Estes espécimes foram semeados com auxílio de suabes na superfície de ágar MH e, após absorção, adicionados os discos dos antimicrobianos.

Foram testados os seguintes antimicrobianos para os espécimes identificados como *Staphylococcus* spp: oxacilina 1µg, ampicilina 10µg, cefalotina 30µg, clindamicina 2µg, cloranfenicol 30µg, eritromicina 15µg, ciprofloxacina 5µg, penicilina G 10U.I., rifampicina 5µg, sulfa-trimetropim 25µg e tetraciclina 30µg. Foi utilizada como controle a cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Para as enterobactérias foram utilizados os antimicrobianos: ampicilina 10µg, amoxicilina 10µg, aztreonam 30µg, cefotaxima 30µg, cloranfenicol 30µg, imipenem 10µg, gentamicina 10µg, penicilina 10U, amicacina 10 µg, ceftazidima 30 µg, ciprofloxacina 5µg e tetraciclina 30µg. Foi utilizada como controle a amostra de *Escherichia coli* ATCC 25922.

3.6.2 Teste de triagem em ágar (ágar screem) para resistência à oxacilina e à ceftazidima

Os espécimes de *Staphylococcus* spp previamente isolados e identificados foram submetidos ao cultivo em meio de triagem (*screem*) para detecção de amostras resistentes à oxacilina. Os procedimentos foram realizados de acordo com protocolo da NCCLS (2000b), utilizando ágar MH suplementado com 6µg/mL de oxacilina e 4% de NaCl. Colônias foram adicionadas a caldo MH e incubadas a 37°C até que atingissem concentração equivalente a 0,5 na escala de MacFarland e semeadas com auxílio de suabe diretamente na superfície do ágar.

As enterobactérias isoladas foram testadas quanto à resistência a ceftazidima utilizando o método de inoculação em ágar de triagem (NCCLS, 2000b). O meio de cultura utilizado foi o ágar MH suplementado com 2µg/mL de ceftazidima (CHAMBERS, 1997).

As placas foram inspecionadas após incubação a 37°C por 24 horas, sendo o crescimento de uma única colônia indicativo de resistência.

3.6.3 Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de oxacilina

3.6.3.1 Suscetibilidade antimicrobiana por diluição em ágar

A CMI foi realizada de acordo com técnica do NCCLS (2000b), que recomenda o uso do ágar MH e inóculos padronizados frente a diferentes concentrações do antibiótico. Em superfícies de placas contendo concentrações 0,25µg/mL a 1024µg/mL de oxacilina incorporados a ágar MH foi inoculado 5 µL da suspensão bacteriana (turvação 0,5 na escala “MacFarland”) com auxílio de um inoculador do tipo *Steers*. As placas foram incubadas por 24 e 48 horas a 36°C e verificado o crescimento bacteriano. A menor concentração do antibiótico em que o crescimento bacteriano deixou de ser observado foi considerada a CMI (NCCLS, 2000b).

3.6.3.2 Utilização do “E-test”

O teste foi realizado utilizando-se a técnica recomendada pelo NCCLS (2000b). Colônias puras de *Staphylococcus* spp que demonstraram resistência à oxacilina na prova de difusão ou ágar *screem* foram semeadas em ágar MH e incubadas a 35°C até atingirem turvação equivalente a 0,5 a escala “MacFarland”. Os espécimes foram semeados com suabe na superfície do ágar e a fita de “E-test” depositada na superfície, sendo devidamente pressionada para evitar a formação de bolhas.

As placas foram incubadas a 35°C por 24 horas para *Staphylococcus* coagulase positiva e por 48 horas para os espécimes de *Staphylococcus* coagulase negativa.

3.7 Detecção do gene *mecA* pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR)

Os espécimes de *Staphylococcus* spp que apresentaram resistência a oxacilina no teste de difusão em discos e/ou ágar *screem* foram selecionadas para o estudo.

As análises foram realizadas no Laboratório de Genética de Bactérias do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Campus de Jaboticabal- UNESP (Universidade Estadual de São Paulo).

A extração do DNA genômico foi feito por lise térmica. Um mililitro de uma cultura pura cultivada em caldo BHI por 18 a 24 horas foi centrifugada a 5000rpm por 4 minutos e o sobrenadante desprezado. O material foi lavado três vezes com tampão TE (Tris EDTA, pH 8,0) e posteriormente ressuspendido em 100µL de tampão TE e aquecido a 95°C por 10 minutos. Em seguida foi centrifugado por 20 segundos a 5000rpm e o sobrenadante preservado para o teste.

A quantificação do DNA foi realizada em espectrofotômetro (BECKMAN, modelo DU-640B) medindo a absorbância em contraste com água destilada, nos comprimentos de onda de 260 e 280nm (nanômetros), sendo a relação 260/280 calculada. Para a confirmação da presença do DNA e do tamanho dos fragmentos, foram preparados géis de agarose 0,8% em tampão "Thread Environment Block" (TEB), processados a 75V (volts) por 1 hora. O marcador de peso molecular utilizado foi o *1 kilobyte ladder* (GIBCO®). Foram aplicados no gel 6µL do material genético extraído e após eletroforese este foi visualizado por um fotodocumentador modelo GEL DOC 2000 (BIO RAD®).

Os *primers* utilizados para amplificação foram as seqüências específicas do gene *mecA* 1282 (5'AAAATCGATGGTAAAGGGTTGGC 3') e *mecA* 1793 (5"AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC 3'), para a amplificação da região de resistência à oxacilina com produtos de amplificação de 533 pb (pares de base) (MERLINO *et al.*, 2002).

As reações de PCR foram feitas segundo a metodologia proposta por You *et al.* (2000) com modificações. O *mixer* de 20µL foi composto por 2µL do DNA a ser amplificado na concentração de 30ng, 2µL de tampão 10X (KCl 50nM, Tris-HCL (200 mM, pH 8,4), 0,6µL de cloreto de magnésio (4,0 mM), 0,4µL de dNTPs (10 mM), 1µL

de *primer* (25 ng), 0,4µL de Taq DNA polimerase (10U/µL) e água estéril (Milli-Q) para totalizar o volume da reação. Como controle foi utilizada o mesmo *mixer*, exceto o DNA alvo, que foi considerado controle negativo.

Para o processamento das amostras foi utilizado um termociclador PTC – 100 (MJ Research®) nas seguintes condições de amplificação: 94°C (2 minutos), 94°C (1 minuto), 40°C (2 minutos), 72°C (2 minutos), seguidos de 39 ciclos a partir do aquecimento a 94°C, finalizando com aquecimento a 72°C (5 minutos) e manutenção a 5°C até o momento de serem submetidas à eletroforese.

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (SAMBROOK, RUSSEL, 2001), utilizando como marcador de peso molecular o *1kb ladder* (GIBCO®), que serviu como referência de migração eletroforética para cálculo do tamanho dos fragmentos obtidos nas reações de amplificação. Na eletroforese foi utilizada cuba horizontal modelo HORIZON 11-14, e tampão TBE, corados com brometo de etídio e processados a 65 V, por 90 minutos. Os fragmentos de DNA foram visualizados pela incidência de luz UV e analisados em fotodocumentador.

3.8 Detecção de enterobactérias produtoras de ESBLs pela técnica de difusão em discos

As enterobactérias isoladas e identificadas quanto à espécie que apresentaram resistência a ceftazidima no teste de difusão em discos e/ou ágar *screem* foram selecionadas para verificar a produção de betalactamases de espectro ampliado.

Foi utilizada a técnica proposta por Bradford (2001). Os espécimes foram semeados em caldo Mueller-Hinton (MH) e incubados a 37°C até atingir turvação correspondente ao tubo 0,5 da escala de MacFarland. Posteriormente foram estriados com auxílio de suabe na superfície de ágar MH. e, após absorção, adicionados os discos de amoxicilina + ácido clavulânico e ceftazidima. As placas foram incubadas por 24 horas a 36°C e verificado a inibição da enzima betalactamase de espectro ampliado pelo ácido clavulânico.

3.9 Análise dos resultados

A análise dos resultados foi realizada de forma descritiva. Os valores absolutos foram tabulados, calculados os respectivos percentuais e comparados às informações disponíveis na literatura.

As análises estatísticas dos resultados microbiológicos foram realizadas utilizando-se o teste do χ^2 para comparação entre os valores percentuais (variáveis qualitativas) quando o **n** foi maior que 5 e o teste exato de Fisher quando o **n** foi igual ou menor que cinco. A significância estatística foi definida por um valor de **p** menor que 0,05. A análise das variáveis foi realizada utilizando-se os programas estatísticos SPSS PC versão 11.0 (SPSS, Chicago) e o Epi Info Software versão 2000 (CDC, Atlanta).

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 140 animais selecionados para estudo (histórico de mastite recorrente), 28,57% (40/140) foram positivos para mastite clínica por apresentarem grumos na caneca telada e sinais clínicos da inflamação. No CMT, 67,14% (94/140) apresentaram resultado positivo (2 ou 3 cruces), caracterizando mastite subclínica. Somente 4,28% (6/140) animais foram negativos em ambas as provas, comprovando a endemicidade e recorrência da doença na população estudada. A maior prevalência de mastite subclínica quando comparada a casos clínicos observada neste estudo, também foi relatada por vários autores (LARANJA DA FONSECA, SANTOS, 2000; SPINOSA *et al.*, 2000).

Das amostras positivas, após cultivo em ágar manitol salgado e ágar MacConkey, em 38,80% (52/134) não houve isolamento de nenhum microrganismo. Esse resultado é semelhante ao determinado por Freitas *et al.* (2005) que não conseguiram identificar o agente etiológico em 36,70% das amostras positivas pelo CMT ou caneca de fundo escuro. A causa da não identificação do agente etiológico nestes casos é provavelmente devido a presença de um processo inflamatório de etiologia não bacteriana (COSTA *et al.*, 1996). Além disso, neste estudo, os meios de cultura utilizados foram seletivos para isolamentos de bactérias do gênero *Staphylococcus* e enterobactérias, que não são ideais para o crescimento de espécies mais exigentes como o *Mycoplasma*, como exemplo.

Das amostras positivas em que houve crescimento bacteriano, em 21,95% (18/82) ocasiões foram isoladas mais de um agente. Nestes casos, a associação observada foi a de *Staphylococcus* spp e enterobactérias, com maior envolvimento do SCN (11/18).

Considerando os casos de infecção monomicrobiana, o *Staphylococcus aureus* foi o microrganismo mais prevalente, seguido dos SCN, com índices de 32,92% (27/82) e 20,73% (17/82), respectivamente. Os estreptococos foram isolados em 7,32% (6/82) amostras e em nenhuma ocasião estavam associados a outro microrganismo. As enterobactérias foram individualmente isoladas de 2,44% (2/82) das mastites. A associação entre *Staphylococcus* spp e enterobactérias ocorreu com mais frequência na mastite clínica (12/18) e com o envolvimento de SCN (9/12). Não houve como determinar na maioria destes casos qual foi o agente

primário da infecção. A distribuição dos agentes etiológicos envolvidos nos 82 casos de mastite estudados pode ser observada na Tabela 2.

Tabela 2. Distribuição dos agentes etiológicos isolados de mastites recorrentes em oito propriedades rurais de Uberlândia-MG.

Espécies isoladas	N=82			
	Único agente		Associados à enterobactérias	
	N	%	N	%
<i>S. aureus</i>	27	32,93	5	6,10
<i>S. intermedius</i>	8	9,75	2	2,44
<i>S. hyicus</i>	4	4,88	--	--
SCNs	17	20,73	11	13,41
<i>Streptococcus</i> sp	6	7,32	--	--
Enterobactérias	2	2,44	--	--
TOTAL	64	78,05	18	21,95

(--) não isolado associado a outro microrganismo.

Em 33,33% (3/9) dos casos de mastite clínica em que o agente envolvido era o SCN, este agente possuía característica de multiresistência e a presença do gene *mecA*. Fagundes e Oliveira (2004) demonstraram que existe associação entre a atividade enzimática específica, a enterotoxigenicidade e a resistência de *Staphylococcus* a vários antibióticos. Apesar de autores considerarem os SCNs como patógenos oportunistas de mastites (HARMON *et al.*, 1990; BRAMLEY *et al.*, 1996) a presença de multiresistência, mostra a importância desses microrganismos como complicadores da infecção e da sua persistência nos rebanhos.

Os SCNs são considerados menos patogênicos que as espécies coagulase positivas e fazem parte da microbiota normal da pele de homens e animais (KLOSS, BANNERMAN, 1995; TORTORA *et al.*, 2002; RIBAS, 2003). Porém, vários estudos vêm discutindo sua importância em infecções nosocomiais. Os SCNs aderem facilmente às superfícies poliméricas como cateteres por produzirem biofilmes. Este fato, provavelmente, pode acontecer também nas ordenhadeiras, facilitando sua disseminação entre os animais. Estes microrganismos após a colonização inicial, produzem uma autolisina e uma adesina intercelular polissacarídica (PIA) que são importantes na produção de biofilmes (RUPP *et al.*, 2001).

A capacidade dos SCNs de produção de biofilmes e multiresistência a antibióticos quando associadas à produção de enterotoxinas podem se tornar um sério problema de saúde pública (FAGUNDES, OLIVEIRA, 2004).

Até recentemente, considerava-se que a produção de enterotoxinas era restrita à espécie 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 xylosus*, *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).

Nos 82 casos de mastite diagnosticados neste estudo (36 clínicas e 46 subclínicas), a prevalência de *Staphylococcus aureus* como único agente nas mastites clínicas foi de 25,00% (9/36) e nas subclínicas 39,13% (18/46). Este resultado está de acordo com os relatados por vários autores (COSTA *et al.*, 1995; ALMEIDA, 1997; BRITO *et al.*, 2002; SANTOS *et al.*, 2003; RABELO, 2003). No entanto, Freitas *et al.* (2005) e Cunha *et al.* (2006), citam que os SCNs foram os agentes mais prevalentes nas mastites subclínicas.

Neste estudo, verificou-se que o *Staphylococcus intermedius* foi isolado em 12,20% (10/82) ocasiões, sendo o único agente em três episódios de mastites subclínicas e cinco de mastites clínicas. De acordo com Brito *et al.* (2002) o percentual de isolamento do *Staphylococcus intermedius* de mastite bovina é baixo. O *Staphylococcus hyicus* foi isolado de 4,88% (4/82) casos de mastites. A importância *Staphylococcus intermedius* e *Staphylococcus hyicus* é pouco discutida na etiologia das mastites, sendo espécies mais associadas a cães e suínos respectivamente. Provavelmente, o contato íntimo de outros animais com bovinos nas propriedades pode ter favorecido a contaminação das vacas leiteiras.

Nos casos de mastite subclínica e clínica, 10,87% (5/46) e 2,78% (1/36) de espécimes isolados foram identificadas como *Streptococcus* sp respectivamente. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Rabello (2003) que encontrou prevalência de 13,70% destes agentes em mastites bovinas.

As enterobactérias foram isoladas em 24,39% (20/82) dos episódios de mastite polimicrobiana, porém, foram isoladas individualmente em somente dois

casos (uma mastite clínica e uma subclínica). A identificação bioquímica demonstrou que a *Escherichia coli* foi a espécie mais prevalente dentre as enterobactérias isoladas, sendo identificada em 75,00% (15/20) ocasiões. Nos episódios de mastite clínica, a *E. coli* foi isolada em 76,92% (10/13) dos casos, o que concorda com Figueiredo (1995), Laranja da Fonseca e Santos (2000) e Freitas *et al.* (2005) que afirmam que esta bactéria é um importante agente etiológico das infecções clínicas. A Tabela 3 mostra a frequência de isolamentos das espécies de enterobactérias de mastites clínicas e subclínicas.

Tabela 3. Identificação de enterobactérias isoladas de mastites clínicas e subclínicas em oito propriedades de Uberlândia-MG.

Espécies isoladas	N = 20			
	Único agente		Associada a <i>Staphylococcus</i> spp	
	Clínica	Subclínica	Clínica	Subclínica
	N	n	N	N
<i>Escherichia coli</i>	1	0	9	5
<i>Cedecea darisae</i>	0	1	0	1
<i>Hafnia alvei</i>	0	0	1	0
<i>Klebsiella</i>	0	0	1	0
<i>Serratia marcescens</i>	0	0	1	0
TOTAL (%)	1 (5,00%)	1 (5,00%)	12 (60,00%)	6 (30,00%)

O perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos das enterobactérias determinada no teste de difusão em discos demonstrou que 100% (20/20) apresentaram resistência à ampicilina e amicacina, 65,00% (13/20) à amoxicilina e tetraciclina, 15,00% (3/20) à ceftazidima e cloranfenicol, 10,00% (2/20) a cefotaxima, 5,00% (1/20) a aztreonam e gentamicina e 0% (0/20) a ceftriaxona, imipinem e ciprofloxacina. Os resultados podem ser observados na Tabela 4.

Tabela 4. Perfil de resistência aos antimicrobianos de enterobactérias isoladas de mastites clínicas e subclínicas em oito propriedades rurais de Uberlândia-MG.

Antimicrobiano	Clínica N=13	Subclínica N=7	p ¹
----------------	-----------------	-------------------	----------------

Amicacina	100,00%	100,00%	1,0
Amoxicilina	76,92%	42,85%	0,17
Ampicilina	100,00%	100,00%	1,0
Aztreonam	0,00%	14,28%	0,35
Cefotaxima	15,38%	0,00%	0,52
Ceftazidima	15,38%	14,28%	1,0
Ceftriaxona	0,00%	0,00%	1,0
Ciprofloxacina	0,00%	0,00%	1,0
Cloranfenicol	23,07%	0,00%	0,52
Gentamicina	0,00%	14,28%	0,35
Imipinem	0,00%	0,00%	1,0
Tetraciclina	69,23%	57,14%	0,65

p¹ < 0,05 = diferença significativa

Somente em um caso de mastite clínica foi isolada *Escherichia coli* que apresentava resistência de espectro estendido aos betalactâmicos, confirmada no teste de sinergismo em duplo disco (detecção de bactérias produtoras de ESBLs). Esta amostra foi isolada de mastite clínica e apresentou também resistência a outros betalactâmicos como a amicacina, amoxicilina, ampicilina e cefotaxima. Adicionalmente foi observada também resistência ao cloranfenicol e tetraciclina.

Os resultados obtidos neste estudo (número de isolamentos, infecção polimicrobiana ou monocrobiana e resistência aos antimicrobianos) indicam que os problemas das mastites causadas por enterobactérias representam um problema clínico mais relacionado às necessidades de intervenção rápida com tratamento sintomático do que com a resistência aos antimicrobianos. Provavelmente, as enterobactérias isoladas em conjunto com os estafilococos eram oportunistas nos casos estudados. Estes resultados estão de acordo como os relatos de Figueiredo (1995) e Freitas *et al.* (2005) que afirmam que as enterobactérias são patógenos oportunistas e adquiridos entre ordenhas, ou seja, do ambiente.

Uma comparação entre os testes para detecção de enterobactérias produtoras de betalactamases de espectro ampliado está demonstrado na Tabela 5. Os resultados obtidos concordam com a literatura, que recomenda a realização de testes adicionais para confirmação de amostras positivas no teste de difusão de disco (BRADFORD, 2001). O uso do agar de triagem e o teste de sinergismo com duplo disco (padrão ouro) apresentaram resultados idênticos.

Tabela 5. Comparação entre diferentes testes na detecção de resistência à ceftazidima em enterobactérias isoladas de mastite em oito propriedades rurais de Uberlândia-MG.

Ceftazidima (Difusão com disco-ESBL)				
Técnicas	Resistente N=3	Suscetível N=17	Sensibilidade	Especificidade
Difusão com disco	3	17	100	33,33
Agar de Triagem	1	17	100	100
Duplo disco (ESBL)	1	17	100	100

Um alto número de espécimes resistentes à penicilina e à ampicilina foi descrito por Brito *et al.* (2001) e Fontana (2002) com 65% e 100% de resistência à penicilina e ampicilina respectivamente, em amostras de *Staphylococcus* sp isoladas de infecções mamárias. Assim, apesar da penicilina ser um dos antibióticos mais difundidos e utilizados no tratamento de enfermidades animais (LOWY, 1998) e dos betalactâmicos permanecerem como as drogas de eleição no tratamento de estafilococcias, a penicilina praticamente não é mais utilizada nestas infecções pelo alto grau de resistência apresentado por estes microrganismos.

A resistência dos *Staphylococcus* ao cloranfenicol foi considerada baixa, com somente 2,70% das amostras resistentes. Cardoso e Schwarz (1992) verificaram em 217 amostras de *Staphylococcus aureus*, isolados de casos de mastite subclínica, 5,07% de resistência ao cloranfenicol em rebanhos bovinos que faziam pouco uso da terapêutica. Neste estudo, este antibiótico foi o que apresentou maior eficiência *in vitro* para os espécimes testados. O cloranfenicol é proibido para uso veterinário (BRASIL, 2003) e, provavelmente, essa baixa resistência seja pela ausência de pressão seletiva. De acordo Brito *et al.* (2001) as principais causas de resistência observadas no campo estão relacionadas ao uso inadequado de drogas, como sub-doses e tempo de tratamento menor que o recomendado.

O uso do ágar de triagem contendo 4% de NaCl e 6µg de oxacilina tem sido utilizado como um dos métodos de confirmação para a resistência à oxacilina em

provas de difusão (NCCLS, 2000b). Neste estudo, de 38 espécimes que demonstraram resistência na prova de difusão, 73,68% (28/38) foram confirmadas no ágar de triagem.

De acordo com Piriz *et al.* (1995) *Staphylococcus* sp que possuem resistência a oxacilina, possuem também resistência intrínseca a outros antimicrobianos, o que foi confirmado nesse estudo (Tabela 6). Esses espécimes representam um desafio terapêutico e de saúde pública, que justifica sua vigilância epidemiológica (BOYCE, 1992).

Entre os isolados resistentes a oxacilina, a multiresistência foi o padrão comumente observado, com a maioria das amostras resistentes a sete dos onze antibióticos testados. Entre as amostras de *Staphylococcus* spp sensíveis a oxacilina, a resistência à penicilina (83,33%), ampicilina (80,55%) e rifampicina (22,22%) foram as mais observadas entre os antibióticos testados.

Tabela 6. Perfil de resistência aos antimicrobianos de *Staphylococcus* spp resistentes e sensíveis a oxacilina isolados de mastites em oito propriedades rurais de Uberlândia-MG.

Antimicrobiano	Resistentes N=38	Sensíveis N=36	P
Ampicilina	92,10%	80,55%	0,1446
Cefalotina	78,94%	2,77%	<0,0001
Ciprofloxacina	71,05%	2,77%	<0,0001
Clindamicina	76,31%	5,55%	<0,0001
Cloranfenicol	2,63%	2,77%	0,9704
Eritromicina	73,68%	8,33%	<0,0001

Oxacilina	100%	0,00%	<0,0001
Penicilina	94,73%	83,33%	0,1129
Rifampicina	76,31%	22,22%	<0,0001
Sulfa/Trimetopim	60,52%	5,55%	<0,0001
Tetraciclina	65,78%	8,33%	<0,0001

p¹ <0,05 = diferença significativa.

O ágar de triagem demonstrou que é uma ferramenta útil na identificação de *Staphylococcus* resistentes a oxacilina e concorda com os resultados obtidos por Sadoyama (2003) e Ribas (2003). Porém, este método não deve ser a única forma de diagnóstico para estes espécimes, já que quando comparado à CMI em duas ocasiões, este teste não foi capaz de demonstrar o crescimento de microrganismos que demonstraram resistência comprovada pela CMI (Tabela 7). As divergências entre os métodos foi observada em um espécime *Staphylococcus aureus* (CMI=32 µg/mL) e uma de *Staphylococcus hycus* (CMI=12 µg/mL), De acordo com Novak (1999) pode haver resistência heterogênea ao antimicrobiano onde apenas uma pequena fração da população expressa resistência. Assim, outros testes além da difusão em discos e ágar de triagem devem ser utilizados na confirmação de *Staphylococcus* resistentes a oxacilina.

A utilização dos métodos de incorporação do antibiótico em ágar e das fitas E-test® utilizados para determinar a resistência a oxacilina demonstraram que estes métodos são similares e ferramentas importantes na confirmação da resistência. *Staphylococcus* spp com CMI ≥4 µg/mL a oxacilina são considerados resistentes a este antimicrobiano. Os espécimes MRSA e MRSCN determinadas no teste de difusão em disco foram confirmados pela CMI em 78,95%.

Nesta investigação a taxa de resistência à oxacilina, considerando os resultados obtidos pelo MIC (testes de diluição em agar e E-Test) foi de 40,54% (30/74), sendo este índice ligeiramente inferior aos observados em cepas provenientes de hospitais humanos em estudos conduzidos por Santos *et al.* (1999), Sadoyama, Gontijo Filho (2000), que encontraram 47,56% e 50,00% de resistência, respectivamente.

Tabela 7. Resistência a oxacilina observada no teste de triagem, técnica de difusão em disco e CMI pelos métodos da incorporação do antibiótico em ágar e E-test de 38 espécimes de *Staphylococcus* spp isolados de mastites.

Espécimes isolados	N =38		
	Difusão em disco	Ágar de triagem	CMI e E-test ($\geq 4\mu\text{g/mL}$)
<i>Staphylococcus aureus</i>	14	12	13
<i>Staphylococcus intermedius</i>	7	6	6
<i>Staphylococcus hyicus</i>	1	0	1
SCN	16	10	10
Total	38	28	30

A literatura possui poucos relatos desses espécimes sendo isolados de mastites bovinas, provavelmente por falta de pesquisas na área. Assim sendo, as mastites adquirem importância para a saúde pública pela possibilidade de veiculação de microrganismos multiresistentes (COSTA, 1998). No Brasil, Fontana (2002) avaliou amostras de leite mastítico de 96 vacas leiteiras da região de Jataí-GO e isolou 85 amostras de *Staphylococcus* spp que demonstraram 100% de resistência aos betalactâmicos penicilina, ampicilina e a oxacilina. Neste estudo o autor determinou que 90,3% dos estafilococos eram produtoras de β -lactamase e não realizou a CMI ou a presença do gene *mecA*.

A análise molecular demonstrou que dos 30 espécimes de *Staphylococcus* spp previamente identificados como resistentes a oxacilina pelo teste de difusão com disco e confirmada pela CMI, 25 demonstraram possuir o gene *mecA* (Figura 1). Estas amostras representam 33,78% (25/74) de todos os estafilococos isolados. Este resultado é superior ao encontrado por Lee (2003) e Malik *et al.* (2006) que encontraram 3,56% (15/421) e 3,97% (10/252) cepas MRSA, respectivamente em estudos realizados com amostras de animais. A Tabela 8 ilustra a presença do gene *mecA*, entre a diferentes espécies de estafilococos e o tipo de mastite .

Tabela 8. Distribuição do gene *mecA* em estafilococos isolados de mastite bovina clínica e subclínica de oito propriedades rurais de Uberlândia-MG com resistência a oxacilina ($\text{CMI} \geq 4\mu\text{g}$) nos testes de incorporação em ágar e E-test.

Espécies isoladas	N=25			
	Mastite clínica		Mastite subclínica	
	Único agente	Associado	Único agente	Associado
	n (%)	n (%)	n (%)	N (%)
<i>S. aureus</i>	7 (28%)	1 (4%)	3 (12%)	1 (4%)
<i>S. intermedius</i>	0 (0%)	0 (0%)	3 (12%)	1 (4%)
<i>S. hyicus</i>	1 (4%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
SCNs	2 (8%)	3 (12%)	3 (12%)	0 (0%)
Total	10 (40%)	4 (16%)	9 (36%)	2 (8%)

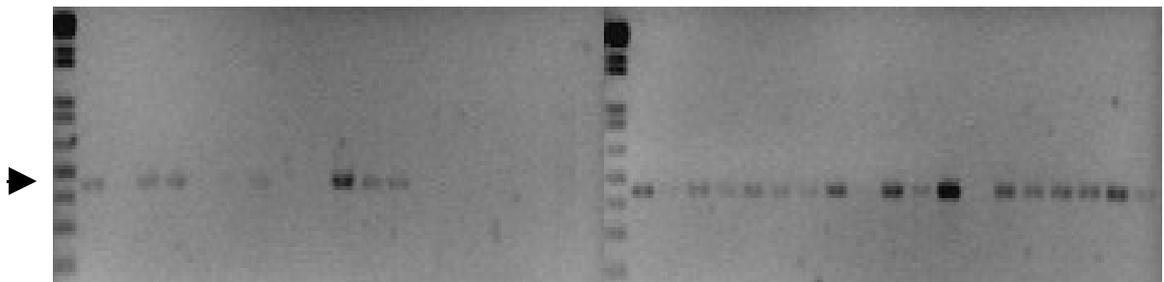


Figura 1. Amplificação do fragmento de 533pb correspondente ao gene *mecA* em 25 espécimes de estafilococos com resistência a oxacilina isolados de mastites recorrentes de oito propriedades rurais da região de Uberlândia-MG.

O gene *mecA* foi mais frequentemente isolado em *Staphylococcus aureus* e SCN, com índices de 48% e 32% respectivamente. Esses dados reforçam sua importância epidemiológica e significância na mastite, pois estes isolados tendem a dificultar o tratamento, mesmo quando são agentes etiológicos secundários,

aumentando a tendência à cronificação da enfermidade e possibilidades de disseminação entre os animais.

A CMI determinada nos testes de incorporação do antimicrobiano em ágar e no E-test apresentaram a mesma concordância na identificação de espécimes de estafilococos resistentes a oxacilina (Tabela 9). Porém, em cinco destas amostras com CMI>256µg/mL, o gene *mecA* não foi detectado, provavelmente este fato ocorreu devido a perda do gene *mecA*. Gruthuysen *et al.* (2005) realizaram um estudo onde ficou demonstrado a perda do gene *mecA* em amostras mantidas em armazenamento sob congelamento. Neste estudo, a possibilidade da perda do gene aumentava de acordo com o tempo de estocagem das amostras, ou seja, quanto maior o tempo de estocagem maior a probabilidade de perda do gene. Este resultado indica que apesar da alta especificidade e de esta técnica ser considerada definitiva para comprovação da presença do gene, a sensibilidade da mesma pode variar conforme fatores como a forma de conservação das amostras.

O teste de difusão em discos é considerado muito sensível, mas não específico para determinar a resistência a oxacilina em bactérias do gênero *Staphylococcus*. Apesar de este teste ter sido capaz de detectar os *Staphylococcus* resistentes à oxacilina, em oito ocasiões a resistência não foi confirmada pela CMI. Estes números reforçam a necessidade de testes complementares como a CMI e presença do gene *mecA* para a confirmação da resistência à oxacilina (HUSSAIN *et al.*, 2000; BRITO *et al.*, 2001; LEE *et al.*, 2004).

Tabela 9. Comparação entre diferentes testes na detecção de resistência à oxacilina de *Staphylococcus* isolados de mastite em oito propriedades rurais de Uberlândia-MG.

Oxacilina (CMI- Diluição em agar)				
Técnicas	Resistente N=30	Suscetível N=44	Sensibilidade	Especificidade
E-Teste	30	44	100	100

CMI (incorporação em agar)	30	44	100	100
Agar de Triagem	28	44	93,33	100
Difusão com disco	30	36	100	81,8
gene <i>mecA</i>	25	44	83,33	100

CMI = concentração mínima inibitória $\geq 4\mu\text{g}$.

V. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir que:

- A incidência de *Staphylococcus* spp e enterobactérias em mastites recorrentes nos rebanhos estudados foi de 90,24% e 24,39%, respectivamente. O alto número de estafilococos isolados demonstra a importância destes agentes nas mastites e ainda, que é o principal agente etiológico em infecções recorrentes.
- O teste de difusão com disco (antibiograma) realizado para os espécimes do gênero *Staphylococcus* demonstrou um alto nível de resistência aos antimicrobianos testados, e entre estes a multiresistência foi o padrão comumente observado. A

resistência à oxacilina pela detecção do gene *mecA* foi confirmada em 33,74% dos isolados.

- O perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos das enterobactérias demonstrou que, estes isolados apresentaram um menor nível de resistência aos antimicrobianos testados, sendo a produção de betalactamase de espectro estendido (ESBLs) detectada em somente um espécime.

- A técnicas de difusão em discos é adequada para triagem de estafilococos resistentes a oxacilina e enterobactérias produtoras de betalactamases de espectro ampliado (100% de sensibilidade). Para confirmação destas características devem ser utilizados testes de maior especificidade como a CMI e gene *mecA* para os estafilococos e ágar de triagem e teste do sinergismo em duplo disco para as enterobactérias, que demonstraram 100% de especificidade.

- Os resultados evidenciaram presença e possibilidade de veiculação de espécimes multiresistentes por meio do leite mastítico, reforçando a importância epidemiológica da mastite na produção e saúde pública.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, M. A. C. Prevalência de mastite subclínica em bovinos por *Staphylococcus* spp e *Streptococcus* spp na microregião de Garanhuns, Pernambuco: **Universidade Federal Rural de Pernambuco**, 1997. 48p.

AMARAL, L. A.; ROSSI JÚNIOR, O. D.; NADER FILHO, A.; FERREIRA, F. L. A.; BARROS, L. S. S. Ocorrência de *Staphylococcus* sp. Em água utilizada em propriedade leiteiras do estado de São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Jaboticabal, v. 55, n. 5, 2003.

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

ARCHER, L. G. *Staphylococcus aureus*: A well-armed pathogen. **Clinical Infection Disease**, Colorado-USA, v.26, p. 1179-81, 1998.

BARROW,G.I.; FELTHAM, R.K.A. **Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria**. 3 ed. Cambridge: Cambridge University, 1995. 331p.

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

BERGDOLL,M.S. *Staphylococcus aureus*. In: Doyle, M. P. (Ed.). **Foodborne bacterial pathogens**. New York: Marcell Dekker, p. 463-523, 1989.

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.

BOOTSMA, M.C.J.; DIEKMANN, O.; BONTEN, M. J. M. Controlling methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Quantifying the effects of interventions and rapid diagnostic testing. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, New York, v. 103, n. 14, p. 5620-5625, 2006.

BOYCE, J. M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* detection, epidemiology and control measures. **Infection Diseases Clinical of North American**, Charlottesville-USA, v. 3, p. 901-913, 1989.

BOYCE, J.M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospitals and long-term care facilities: microbiology, epidemiology, and preventive measures. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.13, p.725-737, 1992.

BOYCE, J.M.; JACKSON, M. M.; PUGLIESE, G.; BATT, M. D., FLEMING, D., GAINES, J. S.; HARTSTEIN, A. I.; KAUFFN, C. A.; SIMONS, M.; WEINSTEIN, R. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a briefing for acute care hospitals and nursing facilities. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 15, n. 2, p. 105-115, 1994.

BRABES, K.; CARVALHO, E.P.; LOPES, F.D.; PEREIRA, M.L.; GARINO JR. F.;

COSTA E.O. 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.

BRABES, K.C.S.; ANDRADE, N.J.; MENDONÇA, R.C.S.; LIMA, J.C.; LOPES, F.A. Identificação e Classificação de Enterotoxinas Produzidas por *Staphylococcus* spp. Isolados de Ar de Ambiente, Manipuladores e de Superfícies em uma Indústria de Laticínios. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 58, n. 333, p. 33-38, jul./ago, 2003.

BRADFORD, P. A. Extended-Spectrum β -lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of this Important Resistance Threat. **Clinical Microbiology Reviews**, New York, v.14, n.4, p.933-951, 2001.

BRAMLEY, A.J. J.S.; CULLOR, R.J.; ERSKINE, L.K.; FOX, R.J.; HARMON, J.S.; HOGAN, S.C.; NICKERSON, S.P.; OLIVER, K.L.; SMITH, L.M.; SORDILLO. 1996. Current Concepts of Bovine Mastitis. **National Mastitis Council**, 4th ed., Madison, Wisconsin, USA, 1996, 64p.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Instrução Normativa nº 9, de 27 de junho de 2003. Dispõe sobre a proibição de fabricação, a manipulação, o fracionamento, a comercialização, a importação e o uso dos princípios ativos cloranfenicol e nitrofuranos e os produtos que contenham estes princípios ativos, para uso veterinário e susceptível de emprego na alimentação de todos os animais e insetos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF , 30 jun. 03. Seção 1, p. 1-2, 2003.

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.

BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J. R. F.; SILVA, M. A . S.; CARMO, R. A . Concentração

mínima inibitória de dez antimicrobianos para amostras de *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.; 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.

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, M.; SCHWARZ, S. Chloranphenicol resistance plasmids in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. **Veterinary Microbiology**, Rio de Janeiro, 30: 223-232, 1992.

CARVALHO, C. E.; BEREZIN, E.M. Monitoramento microbiológico seqüencial de secreção traqueal de pacientes intubados em UTI pediátrica. **Journal Pediatric**, Rio de Janeiro, v. 81, p-23-29, 2004.

CHAMBERS, H. F. Methicillin resistance in Staphylococci: Molecular and Biochemical basis and clinical implications. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 01, p. 173-186, 1988.

CHAMBERS, H.F. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. **Clinical Microbiology Reviews**, San Francisco-USA, v.10, p. 781-791, 1997.

COOKSON, B. I. P.; RAHMAN, M.; CONNOLLY, S.; NOBLE, W. C.; PHILLIPS, I. Diversity of staphylococci exhibiting high-level resistance to mupirocin. **The Journal of Medical Microbiology**, London, v. 33, n. 2, p. 97-100, 1990.

CORRÊA, W.M.; CORRÊA, C.M. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**. 2 ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 1992, p. 117-131.

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, L. M.; RAMOS, I. B.; CARVALHO, D. G.; JÚNIOR, R. D. Análise da sensibilidade do *Staphylococcus aureus* hospital aos antimicrobianos no período 1988-1993. In: **Programa Oficial e Resumos de Trabalhos do VIII Congresso Brasileiro e Infectologia**, Porto Alegre, Resumo nº 111. p. 87, 1994.

COSTA, E. O.; CARCIOFI, A. C.; MELVILLE, P. A.; PRADA, M.S.; SCHALCH, U. Estudo etiológico da mastite clínica bovina. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 17, p. 156-159, 1995.

COSTA E. O.; MELVILLE, P. A.; RIBEIRO, A. R.; VIANI, F. C.; MASCOLLI, R.; OLIVEIRA, P. J. Mastite bovina: CMT *versus* microbiológico. **Hora Veterinária**, v. 15, n. 89, p. 53-54, 1996.

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

COSTA E. O.; SÁ, R.; PONCE, H. WATANABE, E. T.; VALLE, C. R. Avaliação da terapia de mastite clínica: eficácia terapêutica medida em número de dias em tratamento. **Revista Nappama**, São Paulo, v. 2, n. 2, p. 10-14, 1999.

COSTA, E. O.; BENITIS, N. R.; GUERRA, J. L.; GUERRA, J. L.; MELVILLE, P. A. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* spp. Isolated from mammary parenchymas of slaughtered dairy cows. **Journal of Veterinary Medicine B.**, v. 47, p. 99-103, 2000.

CUNHA, A. P.; SILVA, L. B. G. da.; PINHEIRO JÚNIOR, J. W.; SILVA, D. R. da.; OLIVEIRA, A. A. da.; SILVA, K. P. C. da.; MOTA, R. A. 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.

DeLANCASTRE, H.; FIGUEIREDO, A M. S.; URBAN, C.; RAHAL, J.; TOMASZ, A. Multiple mechanisms of methicillin resistance and improved methods for detection in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 35, p. 632-639, 1991.

ERB, H.N.; SMITH RD, HILLMAN RB, POWERS PA, SMITH MC, WHITE ME, PEARSON EG. Rates of diagnosis of six diseases of Holstein cows during 15-day, 21-day, and 30-day interval. **American Journal Veterinary Resort**, v.45, n. 333-5, 1984.

ERSKINE, R. J.; EBERHART, R. J.; HUTCHINSON, L. J.; SPENCER, S. B.; CAMPBELL, M. A. Incidence and types of clinical mastitis in dairy herds with high and low somatic cells counts. **Journal American Veterinary Medicine Association**, Pennsylvanis, v.6, n.192, p-761-765, 1988.

FABIANO, T. T. Diversidade Genética de isolados de *Staphylococcus aureus* de origem humana e animal através da técnica de FAFLP. Jaboticabal, **Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho**, 2003. 41p.

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.

FEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO ESTADO DE MINAS GERAIS Disponível em: www.agricultura.gov.br ,2006.

FERREIRA, L. M.; NADER FILHO, A.; OLIVEIRA, E de; ZAFALON. L. F.; SOUZA, V de. 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, Belo Horizonte: **Anais:... CBRA**, 1995, v.11, 180p.

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.

FONTANA,V. L. D. S. Etiologia da mastite bovina subclínica da região de Jataí/GO. Padrão genética e de suscetibilidade à drogas antimicrobianas com ênfase ao gênero *Staphylococcus*. Araraquara, **Universidade Estadual Paulista Júlia de Mesquita Filho**, 2002. 61p.

FREBOURG, N. B.; NOUET, D.; LEMÉE, L.; MARTIN, E.; LEMELAND, J.F. Comparison of ATB Staph, Rapid ATB Staaph, Vitek, and E-Test Methods for Detection of Oxacillin Heteroresistance in Staphylococci Possessing mecA. **Journal of Clinical Microbiology**, France. v. 36, n.1, p-52-57, 1998.

FREITAS, M. F. L.; PINHEIRO JÚNIOR, J. W.; STAMFORD, T. L. M.; RABELO, S. S. de A .; SILVA, D. R. da; SILVEIRA FILHO, V. M. da; SANTOS, F. G. B.; SENA, M. J. de; MOTA, R. A. Perfil de Sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus* coagulase positivos isolados de leite de vacas com mastite no agreste do estado de Pernambuco. **Arquivo Instituto Biologia**, São Paulo, v. 72, n. 2, p.171-177, 2005.

FURLONG, J.; RIBEIRO,A. C. C. L. Controle da Mastite. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento [MAPA]. EMBRAPA. 2006. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_71_21720039240.html>. Acesso: jul. 2006.

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

GYLES, C.L. *Escherichia coli* cytotoxins and enterotoxins. **Can Journal Microbiology**, v.36, p.734-746, 1992.

GONÇALVES, A.J.R.; ROSENBAUM, R.; CARDOSO, R.L.L. Doenças estafilocócicas. **Arquivos Brasileiros de Medicina**, v.61, p. 13-24, 1987.

GRIETHUYSEN, A. van.; LOO, I. van.; BELKUM, A. van; VANDENBROUCKE-GRAULS, C.; WANNET, W.; KEULEN, P. van.; KLUYTMANS, J. Loss of the *mecA* Gene during Storage of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains. **Journal of Clinical Microbiology**, The Netherlands, v.43, n. 3, p-1361-1365, 2005.

HACKBARTH, C. J.; CHAMBERS, H. F. Methicillin-resistant staphylococci: detection methods and treatment of infections. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 33, p. 995-999, 1989.

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.; EBERHART, R. J.; JASPER, D. E. Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection. Arlington: **National Mastitis Council**, 1990. 34p.

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

HUSSAIN, Z.; STOAKES, L.; MASSEY, V.; DIAGRE., D.; FITZGERALD, V.; SAYED, S. EL.; LANNIGAN, R. Correlation of Oxacillin MIC with *mecA* Gene Carriage in Coagulase-Negative Staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, Canada, v. 38, n. 2, p-752-754, 2000.

JONES, S. L.; LINDBERG, F. P.; BROWN, E. J. Phagocytosis. In: PAUL, W. E., (ed.). **Fundamental immunology**. 4 th ed. Lippincott-Raven, Philadelphia, Pa. p. 1011-1015, 2000.

KAIPAINEN, T.; POHJANVIRTA, T.; SHPIGEL, N.Y.; SHWIMMER, A.; PYORALA, S.; PELKONEN, S. Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from bovine clinical mastitis, **Veterinary Microbiology**, Finland, v.85, p.37-46, 2002.

KLOSS, W.E. Systematics and the natural history of staphylococci. **Journal of Applied Bacteriology**, v.69, n.19, p.25S-37S, 1990.

KLOOS, W.E.; BANNERMAN, T.L. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: MURRAY, P. R., BARON, E.J., PFALLER, M.A., *et al.* (ed.) **Manual of clinical microbiology**. 6. ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1995. p.282-298.

KLOOS, W.E.; BANNERMAN, T.L. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: MURRAY, P. R. *et al.* **Manual of clinical microbiology**. 7. ed. Washington: American Society of Microbiology, 1999, p.264-282.

KONEMAN, E. W. Enterobacteriaceae In: KONEMAN, E. W., ALLEN, S. D., JANDA, W. M. SCHRECKENBERGER, P. C., WINN, Jr., W. C. **Diagnostic Microbiology**. 5th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1989, cap. 4, p.171-252.

KONEMAN, E. N.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JUNIOR, N. C. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. 5.ed. Rio de Janeiro: Médsi, 2001. 1465p.

LANGENEGGER, H.; COELHO, N.M.; LANGENEGGER, C.H., CASTRO, R. P. Estudo da incidência de mastite bovina na bacia leiteira do Rio de Janeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.5, p.437, 1970.

LANGENEGGER, J.; VIANI, M. C. E.; BAHIA, M. G. Efeito do agente etiológico da mastite subclínica sobre a produção de leite. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio Grande do Sul, v.1, n.2, p. 47-52, 1981.

LARANJA DA FONSECA, SANTOS, M.V. **Qualidade do leite e controle de mastite**. São Paulo-MG: Lemos Editorial, 2000, 176p.

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

LEE, J.H.; JEONG, J.M.; PARK, Y.H.; CHOI, S.S.; KIM, Y.H.; CHAE, J.S.; MOON, J.S.; PARK, H.; KIM, S.; EO, S.K. Evaluation of the Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)- Screen Latex Agglutination Test for Detection of MRSA of Animal Origin. **Journal of Clinical Microbiology**, South korea, v.42, n.6, p-2780-2782, 2004.

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

MALIK, S.; PENG, H.; BARTON, M. D. Partial Nucleotide Sequencing of the *mecA* genes of *Staphylococcus aureus* isolates from cats and dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n.2, p.413-416, 2006.

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**, Piracicaba, v.12, n.56, p.45-48, 1998.

MELCHÍADES, L.E.A.; VEIGA, V.M.O.; RIBEIRO, M.T. Produção de enterotoxinas por *Staphylococcus* isolados de mastite subclínica bovina. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.48, p.80-81, 1993.

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.

MERLINO, J.; WATSON, J.; ROSE, B.; BEARD-PEGLER, M.; GOTTLIEB, T.; BRADBURY, R.; HARBOUR, C. Detection and expression of methicillin/oxacillin resistance in multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* in Central Sydney, Australia. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 49, p.793. 2002.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY PERFORMANCE STANDARDS. **Performance Standards for antimicrobial disk susceptibility tests**. Approved Standard M2-A5 NCCLS, Villanova, PA, 2000a.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY PERFORMANCE STANDARDS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically**. Approved Standard M₇-A₄ NCCLS, Villanova, PA, 2000b.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL RESEARCH COMMITTEE REPORT. **Current Concepts of bovine mastitis**, 4. Ed. Madison : NMC, 2000. 64p.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL RESEARCH COMMITTEE REPORT. **Bovine Mastitis Pathogens and Trends in Resistance to Antibacterial Drugs**. In : NMC Annual Meeting Proceedings, p. 400-414, 2004.

NOVAK, F. R. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina em leite humano ordenhado. Rio de Janeiro, **Universidade Federal do Rio de Janeiro**, 1999. 102p.

NUNES, E.L.C. Detecção molecular do determinante genético da resistência a mupirocina em *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina. Rio de Janeiro, **Universidade Federal do Rio de Janeiro**, 2000. 72p.

OLIVEIRA, C.A.F.; FONSECA, L.F.L.; GERMANO, P.M.L. Aspectos relacionados à produção, que influenciam a qualidade do leite. **Higiene Alimentar**, v. 13, n.62, jun., p.10-16, 2000

OMOE, K. ; ISHIKAWA, M. ; SHIMODA, Y. HU, D. ; UEDA, S. ; SHINAGAWA, K. Detection of *seg*, *seh*, 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**, v. 40, n. 3, p. 857-862, 2002.

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.

PHILIPPON, A.; ARLET, G.; LAGRANGE, P.H. Origin and impact of plasmid mediated extended spectrum beta-lactamases. *Eur. Journal Clinical Microbiology Infection Disease*, n.13, p.17-29, 2002.

PIRIZ S. DE LA F., VALLE, J., MATEOS, E., HURTADO, M. A., CID, D., RUIZ-SANTAQUITERIA, J. A., VADILLO, S. Comparative in vitro activity of 11 B-lactam antibiotics against 91 *Staphylococcus intermedius* strains isolated from Staphylococcal dermatitis in dogs. *Journal of Veterinary Medicine*, v.42, p.293-300, 1995.

PITKALA, A.; HAVERI, M.; PYORALA, S.; MYLLYS, V.; HONKANNEN-BUZALSKI, T. Bovine Mastitis in Finland 2001- prevalence, distribution of bacteria and antimicrobial resistance. *Journal of Dairy Science*, Finland, v. 87, p. 2433-2441, 2004.

PITOUT, J. D.; CHRISTINE, M.D.; SANDERS, C. ; EUGENE SANDERS, JR. W. Antimicrobial resistance with focus on beta-lactamase resistance in gram-negative bacilli. *American Journal Medicine*, v.103, p. 51-9, jul. 1997.

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.

RABELLO, R.F. Suscetibilidade 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.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K.W. **Veterinary medicine**. A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses. 9.ed. London: W. B. Saunders, 2000. p.603-700

RIBAS, R.M. Infecções Hospitalares em pacientes idosos: Aspectos epidemiológicos clássicos e moleculares associados a *Staphylococcus aureus* e Enterococcus spp. Uberlândia. Uberlândia: **Universidade Federal de Uberlândia**, 2003. 99p.

RIBEIRO, M. E. R. ; PETRINI, L.A.; AITA, M. F.; BALBINOTTI, M; STUMPF JR, W.; GOMES, J. F.; SCHRAMM, R. C.; MARTINS, P. R.; BARBOSA, R. S. Relação entre mastites clínica, subclínica infecciosa e não infecciosa em unidades de produção leiteiras na região sul do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira Agrocência**, Pelotas. v.9, n.3, p-287-290, 2003.

ROBERSON, J.R., FOX, L.K., HANCOCK, D.D., BESSER, T. E. Evaluation of methods for differentiation of coagulase-positive staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, Washigton-USA, v.30, p.3217-3219, 1992.

RODOLPHO, D. *Staphylococcus*: Caracterização de cepas isoladas de portadores sadios, animal e humanos. Jaboticabal: **Universidade Estadual Paulista de Mesquita Filho**, 2002. 65p.

RUPP, M. E.; FEY, P. D.; HEILMANN, C.; GOTZ, F.; RAICHLE, A. Characterization of the importance of *Staphylococcus epidermidis* autolysin and polysaccharide intercellular adhesin in the pathogenesis of intravascular catheter-associated infection in a rat model. **Journal of Infectious Diseases**, v.183, n.7, p.1038-1042, 2001.

SADOYAMA, G. Aspectos epidemiológicos de infecções relacionadas a cateteres vasculares centrais em pacientes cirúrgicos internados no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia: **Universidade Federal de Uberlândia**, 2003. 99p.

SADOYAMA, G.; GONTIJO FILHO, P.P. Risk factors for methicillin resistant and sensitive *Staphylococcus aureus* infection in a Brazilian University Hospital. **Brazilian Journal of Infections Diseases**, Salvador, v.4, n.2, p.135-143, 2000.

SAHM, D.F. Streptococci and staphylococci: laboratory considerations for in vitro susceptibility testing. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 16, p. 9-14, 1994.

SAKOULAS, G., GOLD. H., VENKATARAMAN, L., DEGIROLAMI, P. C., ELIOPOULOS, G. M. , QIAN, Q. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Comparison of susceptibility testing methods and análisis of mecA-positive susceptible strins. **Journal of Clinical Microbiology**, Massachsetts. v.39, n.11, p-3946-3951, 2001.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular cloning** : a laboratory manual. 3rd ed. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANDERS, C.C., THOMPSON, K.S., BRADFORD. Problems with detection of β -lactam resistance among non-fastidious Gram-negative bacilli. In: MOELLERING, C., JR WASHINGTON, J.A. **Infectious Diseases Clinical of Noth America: Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases**, Philadelphia: The W.B. Sauders Co., p.411-424, 1993.

SANDERS, C. Detection of extended-spectrum-b -lactamase producing members of the family enterobacteriaceae with the vitek ESBL test. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, n.12, p. 2997-3001, 1997.

SANTOS, K.R.N. *et al.* DNA typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates and factors associated with nosocomial acquisition in two Brazilian university hospitals. **Journal of Medical Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 48, p. 17-23, 1999.

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

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

SEGUIN, J. C. ; WALKER, R. D.; CARON, J. P.; KLOSS, W. E. ; GEORGE, C. G.; HOLLIS, R. J.; JONES, R. N.; PFALLER, M. A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreak in a veterinary teaching hospital: potential human-to-animal transmission. **Journal Clinical Microbiology**, Canadá, v. 37, p-1459-1463, 1999.

SHIOMORI, T.; MIYAMOTO, H.; MAKISHIMA, K.; YOSHIDA, M.; FUJIYOSHI, T.; UDAKA, T.; INABA, T.; HIRAKI, N. Evaluation of bedmaking-related airborne and surface methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* contamination. **Journal Hospital Infections**, German, v. 50, n. 1, p.30-35, 2002.

SHLAES, D. M.; GERDING, D. N.; JOHN JR, J. F.; CRAIG, W. A.; BONSTEINS, D. L.; DUNCAN, R. A.; EKMAN, M. R.; FARRER, W. E.; GREENE, W. H.; LORIAN, V.; LEVY, S.; MCGOWAN JR., J. E.; PAUL, S. M.; RUSKIN, J.; TENOVER, F. C.; WATANAKUNADORN, C. 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.

SHPIGEL, N.Y.; WINKLER, M.; ZIV, G.; SARAN, A. Clinical, bacteriological and epidemiological aspects of clinical mastitis in Israeli dairy herds. **Preventive Veterinary Medicine**, Israel, v.35, p.1-9, 1998.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**, 2.ed., São Paulo: Varela, 2001. 317p.

SPINOSA, HS; GÓRNIAC, SL; BERNARDI, M..M. **Farmacologia aplicada à Medicina Veterinária**, 2.ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, 646p.

STRUELLENS, M. J., DELPLANO, A., GODARD, C., MAES, N., SERRUS, E. Epidemiologic typing and delineation of genetic relatedness of methicillin-resistant

Staphylococcus aureus by macrorestriction analysis of genomic DNA by using pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, p. 2599-2602, 1992.

SUSSMAN, M. *Escherichia coli*: mechanisms of virulence. United Kingdom: **Cambridge University**, 1997. 639p.

SZABÓ D; ROZGONYI B. Extended-spectrum β -lactamases: an actual problem of hospital microbiology. **Acta Microbiológica Immunologica Hungria**, Hungria, v.44, n.4, p.1013-1018, 1997.

TOMLIN, J. ; PEARD, M. J; LLOYD, D. H; HOWELL, S. HARTMANN; F., JACKSON, H. A.; MUIR, P. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in 11 dogs. **Veterinary Rec**, v. 16, p-60-64, 1999.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B. R.; CHRISTINE, L. **Microbiologia**, 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2002. 827p.

VALLE, J.; GOMEZ, L.; PIRIZ, S.; GOYACHE, J.; ORDEN, J.A.; VADILLO S. Enterotoxin production by staphylococci isolated from healthy goats. **Appl Environ Microbiology**, v. 56, p. 1323-1326, 1990.

VAN OGTHROP, M. L.; VAN ZOEREN GROBEN, D., VERBAKEL-SOLOMONS, E. M.; VAN BOREN, C. P. *Serratia marcescens* infections in neonatal departments: description of an outbreak and review of the literature. **Journal of Hospital Infection**, v. 36, p. 95-103, 1997.

VIANNI, M. C. E.; LÁZARO, N. S. Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos em amostras de cocos gram-positivos, catalase negativos, isoladas de mastite subclínica bubalina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro. v. 23, n. 2, p.1-6, 2003.

WAAGE, S., MORK, T., ROROS, A. AASLAND, D., HUNSHAMAR, A., ODGAARD,

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

WATTS, J. I. Etiological agents of bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, Pennsylvania, v. 16, p. 41-66, 1988.

WEY, S. B.; CARDO D. M.; HALKER, E.; CARRATU, F.P.; SAES, A. C. Distribution and analysis of 8268 nosocomial infections at the Hospital São Paulo: 1985 to 1989. **Revista do Hospital de São Paulo**, v. 01, p. 169-174, 1990.

YOU, I.; KARIYAMA, R.; ZERVOS, M.J.; KUMON, H.; CHOW, J.W. *In-vitro* activity of arbekacin alone and in combination with vancomycin against gentamicin – and methicillin – resistant *Staphylococcus aureus*. **Diagnostic Microbiology and Infections Disease**, New York, v.36, p. 37 – 41, 2000.

ZAID, M. B.; ZAMORA, E.; DIAZ, P. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Italy, n. 6, v. 47, Jun 2003.

ZIV, G. Treatment of mastitis: an overview of progress during the last ten years. In: International Dairy Federation Mastitis Seminar, **Tel Aviv. Proceedings... Tel Aviv**, Bélgica, v.3, p. 1-12, 1995.

ZSCHOCK, H. P.; HAMANN, B.; WOLTER, W. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in faeces of healthy dairy cows, sheep and goats: prevalence and virulence properties. **Letters in Applied Microbiology**, Germany, v. 31, p. 203-208, 2000.