



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

**ANÁLISE DOS PERFIS GENOTÍPICO E FENOTÍPICO DE RESISTÊNCIA A
BETA-LACTÂMICOS EM *Staphylococcus* spp. ISOLADOS DE MASTITE EM
RUMINANTES**

ANDRÉ DE SOUZA SANTOS

RECIFE – PE
2018



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL**

**ANÁLISE DOS PERFIS GENOTÍPICO E FENOTÍPICO DE RESISTÊNCIA A
BETA-LACTÂMICOS EM *Staphylococcus* spp. ISOLADOS DE MASTITE EM
RUMINANTES**

ANDRÉ DE SOUZA SANTOS

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal Tropical.

Orientador: Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota

Co-Orientador: Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da
Costa

RECIFE – PE

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Nome da Biblioteca, Recife-PE, Brasil

S237a Santos, André de Souza
Análise dos perfis genotípico e fenotípico de resistência a beta-lactâmicos em *Staphylococcus* spp. isolados de mastite em ruminantes / André de Souza Santos. – 2018.
105 f. : il.

Orientador: Rinaldo Aparecido Mota.

Coorientador: Mateus Matiuzzi da Costa.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, Recife, BR-PE, 2018.

Inclui referências e anexo(s).

1. Multirresistência 2 Betalactamase 3. Gene *blaz* 4. Genes MEC
5. Leite I. Mota, Rinaldo Aparecido, orient. II. Costa, Mateus
Matiuzzi da, coorient. III. Título

CDD 636.089

**ANÁLISE DOS PERFIS GENOTÍPICO E FENOTÍPICO DE RESISTÊNCIA A
BETA-LACTÂMICOS EM *Staphylococcus* spp. ISOLADOS DE MASTITE EM
RUMINANTES**

Tese de Doutorado elaborada por

ANDRÉ DE SOUZA SANTOS

Local da defesa: Sala18, Centro de Ensino de Graduação - CEGOE / UFRPE

Aprovada em 22 / 02 / 2018

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota - Orientador

Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

Prof. Dr. Leonildo Bento Galiza da Silva

Universidade Federal Rural da Amazônia - UFRA

Prof.^a Dr.^a Andréa Paiva Botelho Lapenda de Moura

Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

Prof.^a Dr.^a Karla Patrícia Chaves da Silva

Universidade Federal de Alagoas - UFAL

Prof.^a Dr.^a Erika Fernanda Torres Samico Fernandes Cavalcanti

Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Manoel José dos Santos (in memoriam) e Maria José de Souza (in memoriam), por todo o esforço que fizeram para me garantir educação. E pelo encorajamento, amor, afeto e confiança que sempre depositaram em mim.
Até breve!*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela saúde, força, perseverança, luz e discernimento para fazer as escolhas corretas, me conduzindo sempre pelos melhores caminhos até aqui.

Aos meus pais, Manoel José dos Santos (*in memoriam*) e Maria José de Souza (*in memoriam*), que em vida foram meus alicerces, sempre me incentivando incondicionalmente. Hoje, num plano espiritual, sei que também se alegram com mais essa conquista. Conquista essa, que jamais teria acontecido sem o apoio deles. Dedicar a minha vida em gratidão a eles seria pouco. Mas, terão sempre o meu compromisso em seguir os ensinamentos que eles me deram, onde a justiça sempre impera.

Aos meus avós, Maria Rainha (*in memoriam*), José Miguel (*in memoriam*), Maria Rosa, José Dionísio (*in memoriam*), que formaram e educaram esta grande família Souza Santos da qual faço parte e tanto me orgulho.

Aos meus irmãos, Josenildo, Thiago e José Paulo, pela fraternidade de sempre. A vida nos trouxe desafios que parecíamos não estar preparados pra enfrentar. Mas, nossos pais conseguiram nos passar os valores da vida, e esse foi o pontapé inicial pra seguirmos os nossos caminhos, sempre em parceria e união, um sendo o apoio do outro, principalmente nos momentos de dificuldade. Contem sempre comigo.

À Débora Batista, por ter compartilhado comigo bons momentos de compreensão, companheirismo e momentos de dificuldade também, mas com sua companhia esses momentos se tornaram mais leves.

A Katyana, Maria Catarina e Maria Vitória, por todo o afeto e momentos de descontração. Por me permitirem fazer parte da vida de vocês. E que Deus ilumine pra que essas pequenas cresçam com saúde a prosperidade.

A todos os entes queridos, pois mesmo longe sempre foi preenchido pelas boas vibrações de vocês. O apoio que me deram sempre foi muito importante pra seguir nessa caminhada. Espero um dia poder me redimir pela ausência dos últimos tempos.

Ao meu orientador, Prof. Rinaldo, por ter me oferecido as oportunidades que tive, desde o momento que passei a frequentar o laboratório. Por ter sido compreensivo e sensível no momento mais difícil da minha vida, me aconselhando sempre com muito carinho. Ao senhor também, toda a minha gratidão.

Aos membros do Laboratório de Bacterioses da UFRPE e amigos, Giva, Renatinha, Pomy, Atzel, Sandra, Erika Samico, Érica Moraes, Érica Chaves, Glaucia, Renato, Elâine, Adrienne, Raylson, Gabriela, Grasiene, Amanda, Jéssica (loira), Jéssica (morena), Tânia, Jonatas, Müller, Paulo César, Marcus, Pollyanne, Júnior Mário, Emmanuela, Guilherme, Ceíça, Cynthia, Breno, Bruno, Dona Guiomar e demais estagiários e pós-graduandos, pela presença, ajuda mútua e de prontidão, conversas e confraternizações, tornando o ambiente de trabalho descontraído, mas com seriedade e responsabilidade, sempre. Contem comigo!

Em especial, aos amigos Débora Viegas e Pedro Paulo pela parceria, torcida, amizade e companheirismo em toda e qualquer situação, desde aquele fatídico 07 de agosto de 2006. E que assim seja por muitos e muitos anos ainda por vir.

Aos Profs. Andrea Alice da Fonseca Oliveira e José Wilton Pinheiro Júnior, Daniel Brandespim, pelas colaborações no dia-a-dia no laboratório e contribuições com este trabalho.

Ao professor Leonildo Bento Galiza da Silva, por ter aceitado participar da banca de avaliação, se deslocando de tão distante para estar presente. Além de ter contribuído com o início deste trabalho e por toda a amizade de sempre. “Valeu pai!”

Aos membros do Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal da UNIVASF – Petrolina que me acolheram e contribuíram para a execução de parte deste trabalho, especialmente aos Prof. Mateus Matiuzzi da Costa e Gisele Veneroni Gouveia pelas contribuições científicas e o entusiasmo.

Ao Professor José do Egito, à Amanda (Departamento de Tecnologia Rural) e à Ana Albertina (LACLIN-Recife), por contribuírem com este estudo doando placas de Petri conforme necessitamos no decorrer do experimento.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical (PPGCAT) por toda a contribuição com a minha formação desde a graduação em Medicina Veterinária até hoje.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela fomentação de bolsa de estudo, o que viabilizou a execução desta pesquisa.

Aos demais não mencionados aqui, mas que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste trabalho, recebam todos os meus agradecimentos.

FONTES FINANCIADORAS

Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical (PPGCAT).

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq),
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1. Mastite.....	19
2.1.1. Mastite na espécie bovina.....	22
2.1.2. Mastite na espécie bubalina.....	24
2.1.3. Mastite na espécie caprina.....	26
2.1.4. Mastite na espécie ovina.....	28
2.2. Diagnóstico das Mastites.....	29
2.2.1. Contagem de células somáticas (CCS).....	30
2.2.2. <i>California Mastitis Test</i> (CMT).....	31
2.2.3. Cultura microbiológica do leite.....	33
2.3. <i>Staphylococcus</i> spp.	35
2.3.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	36
2.3.2. <i>Staphylococcus</i> coagulase negativa (SCN).....	38
2.4. Resistência a Betalactâmicos em <i>Staphylococcus</i> spp.	39
2.4.1. Betalactamases.....	41
2.4.2. Modificação dos sítios de ligação (PBPs).....	42
2.4.3. Bombas de efluxo.....	43
2.5. Métodos de Detecção de Resistência <i>in vitro</i>	45
2.5.1. Disco-difusão em ágar.....	45
2.5.2. Microdiluição em caldo.....	45
3. OBJETIVOS.....	47
3.1. Geral.....	47
3.2. Específicos.....	47
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
CAPÍTULO 1.....	70
High frequency of beta-lactam resistance among <i>Staphylococcus aureus</i> isolated from bovine mastitis in Northeast of Brazil.....	70
CAPÍTULO 2.....	84
Genotypic and phenotypic profiles of beta-lactam resistance in coagulase-negative <i>Staphylococcus</i> isolated from buffalo, goat and sheep mastitis in the Northeast of Brazil.....	84

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	101
ANEXOS	102
ANEXO A – Parecer de aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRPE.....	103
ANEXO B – Comprovante de submissão do manuscrito intitulado “High frequency of beta-lactam resistance among <i>Staphylococcus aureus</i> isolated from bovine mastitis in Northeast of Brazil”.....	104
ANEXO C – Comprovante de submissão do manuscrito intitulado “Genotypic and phenotypic profiles of beta-lactam resistance in coagulase-negative <i>Staphylococcus</i> isolated from buffalo, goat and sheep mastitis in the Northeast of Brazil”.....	105

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

High frequency of beta-lactam resistance among *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Northeast of Brazil

Figure 1: Amplification of nuc gene fragment in *S. aureus* isolated from cow's milk with mastitis. 73

Figure 2: Amplification of blaZ gene fragment in *S. aureus* isolated from cow's milk with mastitis. 74

Capítulo 2

Genotypic and phenotypic profiles of beta-lactam resistance in coagulase-negative *Staphylococcus* isolated from buffalo, goat and sheep mastitis in the Northeast of Brazil

Figure 1: Amplification of blaZ gene fragment in CNS isolated from buffalo, goat and sheep with mastitis. 89

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

High frequency of beta-lactam resistance among *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Northeast of Brazil

Table 1: Oligonucleotides sequences and sizes of the amplified fragments, in base pairs (bp), used in this study..... 83

Table 2. Percentage of antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from mastitis in cows of Alagoas, Bahia and Pernambuco, Brazil, by disc-diffusion technique..... 83

Capítulo 2

Genotypic and phenotypic profiles of beta-lactam resistance in coagulase-negative *Staphylococcus* isolated from buffalo, goat and sheep mastitis in the Northeast of Brazil

Table 1: Sequences of the oligonucleotides used in this study and sizes of the amplified fragments, in base pairs (bp) 98

Table 2. Percentage of antimicrobial resistance of coagulase-negative *Staphylococcus* isolated from mastitis in buffaloes, goats and sheep in the Northeast of Brazil by disc-diffusion technique..... 99

Table 3. Comparison of resistance percentages to different beta-lactams in coagulase-negative *Staphylococcus* isolates of buffalo, goat and sheep mastitis in Northeast Brazil in MIC technique ($\mu\text{g/mL}$) 100

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMO	Amoxicilina
BHI	Brain Heart Infusion
<i>blaZ</i>	Gene indutor de betalactamase
bp	Base pairs
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CFX	Cefalexina
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMT	California Mastitis Test
CoNS	Coagulase-negative <i>Staphylococcus</i>
CRO	Ceftriaxona
CTX	Cefotaxima
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Mistura de nucleotídeos (A, C, G e T)
IRMA	Índice de resistência múltipla a antimicrobianos
LDIC	Laboratório de Doenças Infectocontagiosas
MAR	Multiple antimicrobial resistance
<i>mecA</i>	Gene indutor de PBP2a
<i>mecC</i>	Gene homólogo ao gene <i>mecA</i>
MIC	Minimum inhibitory concentration
MIC ₅₀	Minimum inhibitory concentration for 50% of strains
MIC ₉₀	Minimum inhibitory concentration for 90% of strains
Min.	Minuto
<i>nuc</i>	Gene nucleasse
OXA	Oxacilina
<i>PBP</i>	Penicillin binding protein
<i>PBP2a</i>	Alternative penicillin binding protein
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	Potencial de hidrogênio
SCN	<i>Staphylococcus</i> coagulase negative
SCP	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva

Sec.	Segundo
sp.	Espécie
spp.	Espécies
Taq DNA pol	DNA polimerase de <i>Thermus aquaticus</i>
UFRPE	Universidade Federal Rural de Pernambuco

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Grau Celsius
≤	Igual ou menor que
>	Maior que
μg	Micrograma
μL	Microlitro
mL	Mililitro
mM	Milimolar
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
pmol	Picomol
%	Porcentagem
U	Unidade
V	Volts

RESUMO

O leite é considerado uma importante fonte de contaminação por bactérias patogênicas e multirresistentes, especialmente quando este alimento é proveniente de rebanhos com mastite. Neste estudo, objetivou-se caracterizar os perfis genotípico e fenotípico de resistência aos beta-lactâmicos e outros antimicrobianos em *Staphylococcus* spp. isolados de mastite em ruminantes na região Nordeste do Brasil. Foram analisados 161 *Staphylococcus aureus* isolados de vacas, 52 *Staphylococcus coagulase negativa* (SCN) de búfalas, 66 de cabras e 72 de ovelhas. Realizou-se a detecção dos genes de resistência blaZ, mecA e mecC por PCR e para os testes de resistência antimicrobiana utilizaram-se os métodos de disco-difusão e concentração inibitória mínima (CIM). O gene blaZ foi detectado em 68,9% (111/161) dos *S. aureus* bovinos e em 42,3% (22/52), 43,9% (29/66) e 23,6% (17/72) dos SCN isolados de búfalas, cabras e ovelhas, respectivamente. Todos os isolados testados foram negativos para os genes mecA e mecC. Amoxicilina, ampicilina e penicilina foram os antimicrobianos com maiores índices de resistência na técnica de disco-difusão e o maior percentual de resistência detectado na CIM foi para a amoxicilina, entre os isolados de todas as espécies animais. A multirresistência detectada foi de 9,3% (15/161) em *S. aureus* de bovinos, 30,8% (16/52) em SCN de bubalinos, 25,8% (17/66) em SCN de caprinos e 25,0% (18/72) em SCN de ovinos. A resistência a beta-lactâmicos está presente em altas frequências entre *S. aureus* e SCN isolados de leite de vaca, búfala, cabra e ovelha na região Nordeste do Brasil, sendo a ação de betalactamases o principal mecanismo determinante desta resistência. Medidas corretivas de manejo devem ser adotadas para reduzir a circulação destas bactérias no ambiente agropecuário e diminuir os riscos de transmissão de *Staphylococcus* spp. resistentes a beta-lactâmicos a outros animais dos rebanhos e ao homem.

Palavras-chave: multirresistência, betalactamase, gene blaZ, genes mec, leite.

ABSTRACT

Milk is considered an important source of contamination by pathogenic and multiresistant bacteria, especially when this food comes from herds with mastitis. In this study, we aimed to characterize the genotypic and phenotypic profiles to beta-lactam and other antimicrobial resistance in *Staphylococcus* spp. isolates from ruminants' mastitis in the Northeast of Brazil. For this purpose, 161 *Staphylococcus aureus* isolated from cows, 52 coagulase-negative *Staphylococcus* (CoNS) from buffaloes, 66 from goats and 72 from sheep were analyzed. *BlaZ*, *mecA* and *mecC* resistance genes were detected by PCR and anti-microbial resistance was tested by disk-diffusion and minimum inhibitory concentration (MIC) methods. *BlaZ* gene was detected in 68.9% (111/161) of bovine *S. aureus* and in 42.3% (22/52), 43.9% (29/66) and 23.6% (17/72) of CoNS isolated from buffaloes, goats and sheep, respectively. All isolates tested were negative for *mecA* and *mecC* genes. Amoxicillin, ampicillin and penicillin were the antimicrobials with the highest indices of resistance in the disk-diffusion technique and the highest percentage of resistance detected in MIC was for amoxicillin among isolates of all animal species. Multiresistance detected was 9.3% (15/161) in bovine *S. aureus*, 30.8% (16/52) in buffalo CoNS, 25.8% (17/66) in goats CoNS and 25.0% (18/72) in sheep CoNS. Resistance to beta-lactams is present at high frequencies between *S. aureus* and CoNS isolated from cow, buffalo, goat and sheep milk in the Northeast region of Brazil, with betalactamases action being the main determinant of this resistance. Corrective management measures should be provided to reduce this bacteria circulation in the agricultural environment and to reduce beta-lactam resistant *Staphylococcus* spp. transmission risk to other animals of from the herds and to humans.

Key words: multidrug resistance, beta-lactamase, *blaZ* gene, *mec* gene, milk.

1. INTRODUÇÃO

Estima-se que atualmente os rebanhos bovino, bubalino, ovino e caprino totalizam aproximadamente 4,5 bilhões de cabeças no mundo, onde os rebanhos bovino e caprino representam aproximadamente 66,6% deste total com 1,5 bilhões de cabeças cada, seguidos pelos rebanhos ovino e bubalino com 1,2 e 0,2 bilhões de cabeças, respectivamente (DAIRY, 2017; FAO, 2017).

No Brasil, os rebanhos bovino, bubalino, caprino e ovino são formados respectivamente por 217 milhões, 1,3 milhões, 8 milhões e 17 milhões de cabeças, com destaque para o rebanho bovino, onde o Brasil é líder do *ranking* mundial de produtores. Estes rebanhos desempenham importante papel socioeconômico em todo o país e participam efetivamente da alimentação humana por meio da carne e do leite e seus subprodutos (EMBRAPA, 2002; BRASIL, 2016; FAO, 2017), sendo uma atividade responsável pela geração de mais de três milhões de empregos diretos e indiretos, tanto em propriedades de grande quanto de pequeno porte (BERNARDES, 2007; BRASIL, 2016).

Do mesmo modo, a criação destes animais na região Nordeste do Brasil, em especial nos estados de Alagoas (AL), Bahia (BA) e Pernambuco (PE), tem favorecido a produção de alimento de forma local, principalmente com utilização de animais rústicos e adaptados às condições climáticas da região, inclusive com projeções de aumento da produção, especialmente nas bacias leiteiras da região (BRASIL, 2016).

O leite é uma importante fonte nutricional com impacto direto na saúde humana, pois junto com seus derivados, é também um ambiente favorável ao crescimento de microrganismos patogênicos e deteriorantes (LANGONI et al., 2011), sendo a qualidade da matéria-prima um dos maiores entraves para a efetiva expansão da exploração industrial do leite no Brasil, o que em parte é afetado pelos distúrbios inflamatórios da glândula mamária decorrentes de traumas e, principalmente, infecções bacterianas (GUIMARÃES; LANGONI, 2009; VIEIRA et al., 2013).

Neste contexto, as mastites infecciosas possuem alta prevalência nos rebanhos nacionais, acarretando na diminuição da quantidade e qualidade do leite produzido, além de causar riscos à saúde pública (ACOSTA et al., 2016) por ser uma das vias de propagação de microrganismos patogênicos e, muitas vezes, portadores de múltipla

resistência aos antimicrobianos, gerando grandes prejuízos econômicos na cadeia produtiva em consequência da perpetuação dessas infecções (FREITAS et al., 2005).

No Brasil, os principais agentes infecciosos causadores de mastite são bactérias do gênero *Staphylococcus*, especialmente nas espécies bovina, bubalina, caprina e ovina (PEIXOTO et al., 2010a; MEDEIROS et al., 2011a; OLIVEIRA et al., 2011, RIBEIRO et al., 2014; ACOSTA et al., 2016). Bactérias deste gênero, principalmente da espécie *Staphylococcus aureus* são responsáveis por infecções subclínicas da glândula mamária, que se caracterizam pela ausência de alterações macroscópicas no leite e na glândula mamária (BERGONIER et al., 2003; MOTA et al., 2012).

Além de serem patógenos potenciais para os animais, *Staphylococcus* envolvidos nas mastites apresentam grande relevância para a saúde pública quando se trata de resistência antimicrobiana, uma vez que podem transferir esta resistência aos humanos, dificultando o tratamento das infecções (PATERSON et al., 2014; PEACOCK; PATERSON, 2015) como tem sido observado com a meticilina, que resulta em alerta das autoridades mundiais em saúde pública.

A meticilina é um antimicrobiano da classe dos betalactâmicos que não é comumente utilizado no tratamento das mastites, mas diversas fazendas leiteiras de vários países já relataram a presença de cepas de *Staphylococcus* resistentes à meticilina (MRS) (LIM et al., 2013; PATERSON et al., 2014).

A resistência antimicrobiana de *Staphylococcus* à classe dos betalactâmicos pode ocorrer pela produção de betalactamase ou pela modificação no sítio de ação dos betalactâmicos (SFACIOTTE et al., 2014; DIAS et al., 2015). Este último mecanismo é o observado nas cepas de MRS, sendo mediado por *Staphylococcus* Cassete Cromossomo (SCCmec) que são elementos genéticos móveis possuidores dos genes *mecA* e *mecC* (LIVERMORE, 2000; PATERSON et al., 2014).

Estudos já demonstraram a transmissão horizontal de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina entre bovinos e trabalhadores de fazendas leiteiras (JUHÁSZ-KASZANYITZKY et al., 2007; LIM et al., 2013), reforçando a importância da relação homem e animais como um favorecedor da transmissão de cepas de MRS e gerando a demanda para a realização de pesquisas que identifiquem a situação da distribuição destes microrganismos em outras regiões do mundo (LIM et al., 2013).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Mastite

A mastite é o processo inflamatório da glândula mamária de origem plurietiológica, evolução aguda ou crônica e com manifestação clínica ou subclínica, sendo considerada uma das principais enfermidades dos rebanhos leiteiros em todo o mundo (SHARIF; MUHAMMAD, 2007; FAO, 2014). Diversos são os prejuízos causados por esta doença aos produtores, devido principalmente à redução da produção de leite pelos quartos mamários afetados, desvalorização, descarte ou morte dos animais, descarte do leite de animais em tratamento, gastos com medicamentos e serviços veterinários, além de provocar a diminuição do rendimento do leite na fabricação de subprodutos (LANGONI et al., 2011; PERES NETO; ZAPPA, 2011).

A etiologia das mastites pode ser fisiológica, traumática, química ou infecciosa, com maior importância epidemiológica para as de origem infecciosa, e dentre estas, as causadas por bactérias (ALTINTOPRAK et al., 2014). Neste contexto, as mastites são categoricamente divididas em contagiosas ou ambientais, de acordo com os agentes infecciosos envolvidos (RISTOW; PEREZ JÚNIOR, 2008). A mastite contagiosa é causada por microrganismos que têm como habitat natural a pele e mucosas do hospedeiro, sendo adaptados à sobrevivência no interior da glândula mamária, dessa forma a sua transmissão ocorre com facilidade durante a ordenha. Os principais agentes etiológicos deste tipo de mastite são: *Staphylococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Streptococcus agalactiae* e *Mycoplasma* spp., sendo a espécie *Staphylococcus aureus* a mais patogênica (SIUGZDAITE et al., 2005; OLDE REIKERINK et al., 2008).

Por outro lado, a mastite ambiental é causada por microrganismos considerados invasores oportunistas da glândula mamária, sendo encontrados naturalmente no meio ambiente, água, camas, solo, urina, esterco e matéria orgânica e a infecção normalmente ocorre no período entre as ordenhas (OLIVER et al., 2004). Nas mastites ambientais, os principais microrganismos causadores são: *Streptococcus dysgalactiae*, *S. uberis* e *S. bovis*, *Enterococcus faecium* e *E. faecalis*, além de bactérias Gram-negativas como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter aerogenes* (OSMAN et al., 2009; KULKARNI; KALIWAL, 2013), leveduras (COSTA et al., 2012), fungos filamentosos (CHAHOTA et al., 2001; PACHAURI et al., 2013; ZHOU et al., 2013) e algas como a *Prototheca zopfii* (CORBELLINI et al., 2001; BUENO et al., 2006).

Quanto à resposta inflamatória, as mastites podem ainda ser classificadas em clínicas ou subclínicas. No primeiro caso, são observadas alterações macroscópicas evidentes na glândula mamária, como aumento de temperatura, edema, enrijecimento e dor, além da presença de grumos, sangue, coágulos ou pus no leite, associados ou não a alterações sistêmicas no animal (MOUSSAVI et al., 2012). A mastite subclínica é caracterizada por alterações na composição do leite, tais como aumento nos teores de proteínas séricas, sódio, cloro, imunoglobulinas e na contagem de células somáticas (CCS), além de diminuição nos teores de gordura, lactose e caseína do leite, não sendo observadas alterações macroscópicas no leite ou na glândula mamária (CHANG et al., 2004; CUNHA et al., 2006). Segundo Sinha et al. (2014) e Peters et al. (2015), os casos subclínicos possuem maior importância epidemiológica dentro de uma propriedade, pois são facilmente disseminados no rebanho sem que sejam percebidas alterações na glândula ou no leite, causando uma falsa sensação de que os animais estão livres da doença. Além disso, devido à ausência de sinais clínicos, os casos de mastite subclínica podem tornar-se crônicos, possibilitando a permanência de bactérias no hospedeiro por meses, sendo este o motivo de cerca de 30% dos casos de mastite crônica e de aproximadamente 90% do total de casos dessa enfermidade em um rebanho (ACOSTA et al., 2016).

No que se refere ao tratamento, o uso de antimicrobianos continua sendo um componente importante no controle das mastites, sendo realizada pelas vias sistêmica ou intramamária (VAKKAMÄKI et al., 2017). A absorção e a distribuição do fármaco em todo o úbere dependerão de características farmacocinéticas que envolvem a solubilidade lipídica da droga, bem como seu grau de ligação às proteínas séricas e ao úbere, seu grau de ionização e o tipo de veículo, independente da via de administração (CONSTABLE et al., 2010).

Embora a via sistêmica tenha sido sugerida como mais eficiente no tratamento das mastites, devido a melhor penetração do fármaco no tecido mamário, a via intramamária vem sendo a mais comumente utilizada, e isto se deve às maiores concentrações do fármaco obtidas no úbere por esta via de administração, além de demandar menor quantidade do antimicrobiano (ROYSTER; WAGNER, 2015). Porém, a via intramamária apresenta como desvantagens, o risco de contaminação no momento da aplicação no canal do teto, a falta de homogeneidade na distribuição do fármaco pelo úbere, além de que alguns microrganismos provocam infecções profundas, sendo

recomendada a via sistêmica para o tratamento nesses casos, de preferência em associação com o tratamento intramamário (BARLOW, 2011).

Em geral, o tratamento com antimicrobianos nas mastites subclínicas é desaconselhado. Isso porque a taxa de cura espontânea não difere da obtida através de antibioticoterapia, além de não afetar a incidência de mastite no rebanho se não forem tomadas medidas profiláticas simultâneas (STEVENS et al., 2016).

Durante décadas, a recomendação dos especialistas em mastite era a realização do tratamento de todo o rebanho leiteiro no momento da secagem com a proposta de eliminar infecções subclínicas, prevenindo novos casos no início do período seco, quando as fêmeas estão mais suscetíveis às infecções intramamárias (ROBERSON, 2003). Entretanto, essa conduta vem sendo desencorajada, nos últimos tempos, por ser considerada um fator de risco para a seleção de cepas resistentes no rebanho, além de estar favorecendo o surgimento de maior número de casos de mastite provocados por patógenos ambientais (BARLOW, 2011). Atualmente, recomenda-se o tratamento seletivo de vacas secas, a partir do diagnóstico por técnicas como a contagem de células somáticas (CCS), *California Mastites Test* (CMT) e condutividade elétrica em associação às medidas de higiene, bem-estar, nutrição e biossegurança (VAKKAMÄKI et al., 2017).

Vale ressaltar que caso haja a necessidade do tratamento antimicrobiano da mastite, este deve estar respaldado em testes de suscetibilidade *in vitro*, orientando o médico veterinário na escolha da droga mais eficaz para cada caso específico (LÜTHJE; SCHWARZ, 2006).

Neste cenário, a prevenção de mastites infecciosas deve ser vista como um conjunto de medidas que visam diminuir a ocorrência dessa enfermidade, minimizando também a utilização de antimicrobianos, e deve ser adotado na rotina de uma propriedade, independente do microrganismo envolvido (HALASA et al., 2007; DEB et al., 2013). Um dos fatores de risco inerente à produção de leite é a aquisição de animais de rebanhos externos, devendo sempre haver uma preocupação com a origem dos animais adquiridos e, se possível, manter o rebanho fechado, sem compra de novos animais. Deve-se, ainda, realizar o monitoramento mensal ou bimestral da CCS individual, evitar lesões graves dos tetos, além de sensibilizar funcionários sobre educação sanitária, medidas de biossegurança e prevenção. O controle da circulação de outros animais no rebanho também é necessário, pois estes podem ser reservatórios de

patógenos (LOPES et al., 2014). Segundo Brasil (2011) e *National Mastitis Council - NMC* (2017), também é recomendado o tratamento dos casos de mastite clínica, descartar os animais infectados cronicamente, realizar a adequada limpeza e desinfecção dos tetos antes e após a ordenha, além de medidas relativas ao bem-estar animal, como conforto, higiene e ventilação das instalações, mais direcionados para a prevenção de patógenos ambientais.

2.1.1. Mastite na espécie bovina

Considerando o crescente desempenho da bovinocultura leiteira mundial, a mastite é a enfermidade que causa as maiores perdas econômicas à cadeia produtiva do leite na espécie bovina (SEEGERS et al., 2003). No Brasil, embora diversos esforços sejam feitos para diminuir os prejuízos causados por esta enfermidade, estima-se que, em um rebanho com frequência média anual de 1% de casos de mastite clínica, as perdas podem chegar a, aproximadamente, R\$730,00 ou U\$227,00/animal/ano e, se esse percentual chegar a 15%, os prejuízos podem atingir o valor aproximado de R\$2.780,00 ou U\$864,00/animal/ano (LOPES et al., 2012). Em estudo recente, nos Estados Unidos (ROLLIN et al., 2015) e na Índia (JINGAR et al., 2017), concluíram que a perda média por animal com mastite clínica num rebanho é de aproximadamente U\$450,00/ano.

Inúmeros microrganismos já foram identificados como causa de mastite em vacas, dentre eles bactérias, fungos filamentosos, leveduras e algas (ALTINTOPRAK et al., 2014; BOUARI et al., 2016).

Staphylococcus spp., *Corynebacterium bovis* e *Streptococcus agalactiae* são os microrganismos contagiosos de maior importância na etiologia das mastites bovinas, enquanto *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Streptococcus uberis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Nocardia* spp. e *Candida* spp. se destacam como os agentes ambientais de maior relevância nas infecções intramamárias nessa espécie (SCHUKKEN et al., 2012). De modo geral, bactérias dos grupos *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP), *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN) e coliformes são as mais frequentemente isoladas de leite mastítico bovino (DEMME; ABEGAZ, 2015).

Em estudo recente realizado no Quênia, Gitau et al. (2014) verificaram que *Staphylococcus aureus* (72,9%) e *Streptococcus agalactiae* (5,2%) foram os patógenos mais frequentes em casos de mastite bovina. Na China, *Staphylococcus aureus* (50,1%),

Streptococcus agalactiae (92,2%) e *Streptococcus dysgalactiae* (72,3%) foram os mais frequentes (BI et al., 2016). No México, Olivares-Pérez et al. (2015) encontraram *Proteus vulgaris* (37,5%), *Salmonella* spp. (25,0%) e *Enterobacter aerogenes* (12,5%) entre os principais patógenos, enquanto *Staphylococcus* spp. foram encontrados em apenas 2,5% das amostras.

No Brasil, diversos estudos têm caracterizado os principais agentes infecciosos da mastite bovina (ACOSTA et al., 2016). Na região Sul do país, os microrganismos mais frequentes foram *Staphylococcus* coagulase negativa (32,9%) e *Streptococcus* spp. (31,6%) em pesquisa realizada por Saab et al. (2014). Na região Sudeste, Costa et al. (2012) detectaram *Corynebacterium* spp. (43,5%) e *Candida* spp. (29,4%) como os principais agentes etiológicos da mastite bovina. *Corynebacterium* spp. (35,6%) também foi o principal microrganismo isolado em amostras de leite bovino na região Centro-Oeste do Brasil, seguido por *Staphylococcus* coagulase negativa (24,0%) (FONTANA et al., 2010). Na região Norte, Oliveira et al. (2011) detectaram maior frequência de *Staphylococcus* coagulase negativa (31,1%) seguido por *Staphylococcus aureus* (17,6%). Por fim, no Nordeste do Brasil, Krewer et al. (2013) identificaram *Staphylococcus* spp. (49,1%) e *Corynebacterium* spp. (35,3%) como os microrganismos mais frequentes em amostras de leite de vacas com mastite clínica ou subclínica.

Diante disso, estudos têm sido realizados na tentativa de identificar fatores de risco relacionados ao aumento da ocorrência de mastite em bovinos, contribuindo para as ações de controle e profilaxia desta doença. Estudos realizados no Brasil (KREWER et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2015) e no mundo (SHARMA et al., 2013; GUNAWARDANA et al., 2014; IRAGUHA et al., 2015) têm apontado diversos fatores de risco para ocorrência de mastite bovina em relação ao sistema de criação dos animais, ao manejo da ordenha e aos hábitos de higiene dos ordenhadores.

Em rebanhos bovinos dos estados da Bahia e Pernambuco os sistemas de manejo extensivo (O.R. 8,13) e semi-intensivo (O.R. 4,19) foram associados à mastite bovina, diferindo da literatura, que aponta maior risco de mastite em animais criados no manejo intensivo; além disso, a realização da ordenha dentro do curral (O.R. 4,77) e a secagem dos tetos com toalha de tecido (O.R. 3,2) também foram determinantes nos casos de mastite nos rebanhos analisados. Por outro lado, a antissepsia dos tetos antes (O.R. 0,18) e após (O.R. 0,22) a ordenha, bem como os hábitos de higiene (O.R. 0,18) e o treinamento prévio dos ordenhadores foram fatores de proteção dos rebanhos contra a

mastite (KREWER et al., 2013). Já em Minas Gerais, segundo Oliveira et al. (2015), casos recentes de mastite clínica, até um mês atrás, aumentam o risco de novos casos de mastite clínica em mais de 18 vezes em novilhas e mais de 20 vezes em multíparas. Estes mesmo autores relataram um risco maior da ocorrência de mastite no período chuvoso em relação ao período seco.

Em Ruanda, a prevalência de mastite aumentou significativamente em animais com algum tipo de lesão severa na extremidade dos tetos, assim como em animais sujeitos por lama e que estavam nos terços inicial ou final da lactação, sendo estes apontados como fatores de risco para os rebanhos estudados (IRAGUHA et al., 2015). No Sri Lanka, propriedades com presença mediana de moscas nos alojamentos apresentaram maior risco dos animais desenvolverem mastite (O.R. 5,39) (GUNAWARDANA et al., 2014).

2.1.2. Mastite na espécie bubalina

Na espécie bubalina a maioria dos casos de mastite é por causas traumáticas, sendo considerados menos suscetíveis à mastite infecciosa do que a espécie bovina (PIZAURO et al., 2014). Segundo Moroni et al. (2006), isso ocorre devido às características anatômicas e fisiológicas da espécie, uma vez que os tetos da búfala são mais pendulosos, estando mais sujeitos às injúrias e a traumas, ao passo em que os ductos papilares desses animais são mais espessos e apresentam maior quantidade de vasos sanguíneos e fibras nervosas, servindo de barreira mais eficiente contra infecções da glândula mamária. Apesar disso, a mastite também é uma das principais enfermidades relacionadas ao manejo sanitário do rebanho bubalino, assim como em bovinos, causando grandes perdas econômicas, especialmente devido aos custos anuais para a sua prevenção (KEEFE, 2012). Em países onde a bubalinocultura têm grande importância econômica e social, como é o caso da Índia, os prejuízos causados pela mastite ultrapassam a ordem dos 500 milhões de dólares (PANCHAL et al., 2016).

Vários estudos têm sido realizados em diferentes países determinando a prevalência de mastite bubalina. Moroni et al. (2006) relataram que a prevalência de infecção intramamária em búfalas foi de 63% na Itália. Já nas Filipinas, a prevalência de mastite em búfalas foi de 42,8% (SALVADOR et al., 2012). No Paquistão esse percentual variou de 21% (MUSTAFA et al., 2013) a 44% (ALI et al., 2011) e em

estudos mais recentes, na Índia, observou-se uma prevalência de mastite de 41% (KRISHNAMOORTHY et al., 2017; TANMAY et al., 2018).

Embora os estudos epidemiológicos sobre a mastite bubalina sejam menos frequentes que os realizados na espécie bovina no Brasil (MEDEIROS et al., 2011a), pesquisadores têm relatado diferentes frequências de mastite em búfalas no território nacional (ACOSTA et al., 2016). No estado do Pará que é o detentor do maior rebanho de búfalos nacional, Silva et al. (2014) avaliaram 348 quartos mamários e observaram frequências de 2,9% e 5,5% de mastite clínica e subclínica, respectivamente. Já na região Nordeste, estudo realizado em rebanhos dos estados de Alagoas, Bahia, Ceará e Pernambuco obteve-se 4,7% de mastite clínica e 42,2% de mastite subclínica na análise de 1.896 amostras de leite de búfalas (MEDEIROS et al., 2013). Em São Paulo, Pizauro et al. (2014) analisaram 1.042 amostras de leite bubalino e observaram 8,4% de mastite subclínica não observando casos de mastite clínica.

Em relação aos agentes infecciosos causadores de mastite em búfalas, observa-se semelhança aos relatados na espécie bovina. Na Itália, *Staphylococcus aureus* (30,7%), *Staphylococcus* spp. (13,1%) e *Streptococcus dysgalactiae* (5,1%) foram os principais microrganismos causadores de mastite em búfalas (CATOZZI et al., 2017). Na Índia, *Staphylococcus* spp., *Escherichia coli* e *Streptococcus* spp. foram detectados em 45%, 14% e 13% das amostras analisadas, respectivamente (KRISHNAMOORTHY et al., 2017). Além desses, outros microrganismos já foram relatados em casos de mastite bubalina, dentre eles: *Streptococcus uberis*, *Pseudomonas* sp., *Mycoplasma* sp., *Clostridium perfringens*, *Klebsiella* sp., *Listeria* sp. e *Trueperella pyogenes* (PUROHIT et al., 2014; CATOZZI et al., 2017).

No Brasil, Medeiros et al. (2013) relataram *Staphylococcus* spp. (49,4%), *Corynebacterium* spp. (23,2%) e bactérias Gram negativas (16,5%) como os principais agentes etiológicos da mastite bubalina ao analisar amostras de leite mastítico dos estados de Alagoas, Bahia, Ceará e Pernambuco. Segundo Pizauro et al. (2014), em estudo realizado no estado de São Paulo, os principais microrganismos identificados foram *Streptococcus* spp. (42,8%), *Corynebacterium* spp. (23,5%) e *Staphylococcus* spp. (20,2%). Em estudo realizado por Silva et al. (2014) no estado do Pará, as principais bactérias isoladas foram *Streptococcus* spp. (66,7%), *Staphylococcus aureus* (16,7%) e *Staphylococcus intermedius* (16,7%).

Para Pereira et al. (2009), a higiene é de grande importância na exploração leiteira de búfalos, principalmente porque estes têm predileção por terrenos alagadiços, sendo um dos fatores que podem influenciar os índices de mastite no rebanho. Outros fatores são relacionados ao aumento na frequência de casos da doença em búfalos como a falta de lavagem dos tetos antes da ordenha e limpeza inadequada dos equipamentos de ordenha (MEDEIROS et al., 2011a; SALVADOR et al., 2012; HUSSAIN et al., 2013).

2.1.3. Mastite na espécie caprina

O interesse por leite de cabra e seus produtos derivados vem crescendo ao longo dos anos, especialmente porque o leite caprino tem propriedades nutricionais semelhantes ao leite humano e por ser menos alergênico aos humanos do que o leite de vaca (HAENLEIN, 2004; LAD et al., 2017). Entretanto, assim como em outras espécies, a mastite também é uma enfermidade limitante à exploração desta espécie para a produção de leite, sendo responsável por grandes prejuízos (BERGONIER et al., 2003).

Estudos de prevalência têm sido realizados em vários países do mundo, indicando percentuais que variam de 9 a 50% das amostras analisadas (MAROGNA et al., 2012). Na China, país que possui o maior rebanho caprino no mundo e responsável pela produção de mais de 1,5 milhão de toneladas de leite caprino ao ano, a prevalência de mastite subclínica relatada por Zhao et al. (2015) foi de 45,8%. Na Argélia, 46,6% das amostras de leite analisadas apresentaram mastite subclínica (YAHIA et al., 2016), enquanto que em Bangladesh (RAZI et al., 2012) e Nigéria (TANIMOMO et al., 2012), as prevalências de mastite subclínica relatadas foram de 18,6% e 15,5%, respectivamente.

No Brasil, a prevalência de mastite caprina varia entre 22 e 75%, com predominância de casos subclínicos nas diferentes regiões do país (PEIXOTO et al., 2010a). De acordo com estudo realizado no estado da Paraíba por Bianchini et al. (2010), das 654 metades mamárias avaliadas, 0,15% apresentaram mastite clínica e 30,7% apresentaram mastite subclínica. Na Bahia, dentre 218 cabras avaliadas, 26,6% apresentaram mastite subclínica e 3,4% apresentaram mastite clínica (CAVALCANTE et al., 2013). No Rio Grande do Sul, Muricy (2003) e Schmidt et al. (2009) relataram,

respectivamente, 30,8% e 22,7% de metades mamárias com mastite subclínica, entretanto nenhum dos autores observou a ocorrência de mastite clínica.

Trabalhos publicados em todo o mundo demonstraram que os microrganismos frequentemente encontrados na mastite em cabras sofrem pouca variação, entre eles algumas espécies de *Staphylococcus*, com destaque para a espécie *S. aureus*, *Corynebacterium* e em menor frequência, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Micrococcus* e enterobactérias (RAZI et al., 2012; COSTA et al., 2013; ZHAO et al., 2015; ACOSTA et al., 2016; SALABERRY et al., 2016). Outros microrganismos também foram relatados como causadores de mastite caprina como *Pseudomonas* spp. no Paquistão (NAJEEB et al., 2013), *Arcanobacterium pyogenes* no Brasil (GARINO et al., 2012) e *Mycoplasma* spp. na Itália (MAROGNA et al., 2012). Além dessas bactérias, os lentivírus também estão entre os patógenos causadores de infecções intramamárias em cabras, embora a maioria dos animais infectados seja assintomática (TURIN et al., 2005).

Diversos fatores de risco associados à mastite caprina também já foram relatados. Na Itália, Moroni et al. (2005) observaram que a mastite foi mais frequente em cabras com terceira e quarta ordem de parto, assim como em animais que estavam em períodos de lactação mais longos. Em Bangladesh, a prevalência de animais com mastite foi maior em animais com baixa condição corporal, o que seria explicado pela influência negativa que baixos *scores* corporais podem ter sobre o sistema imune dos animais, predispondo a ocorrência de diversas enfermidades, entre elas a mastite (KOOP et al., 2016). Na Etiópia, maiores prevalências de mastite caprina também foram observadas em animais com más condições corporais, cerca de cinco vezes maior, em comparação a animais com bom *score* corporal, assim como cabras em terço final da lactação (O.R. 4,3) (MEGERSA et al., 2010).

No semiárido paraibano, a manutenção de cabras com mastite junto de outros animais do rebanho (O.R. 69,2) e o fato de a caprinocultura não ser a principal atividade exercida na propriedade (O.R. 45,9) foram os principais fatores de risco para a mastite subclínica detectados por Neves et al. (2010). Entretanto, estudos dessa natureza ainda são escassos no Brasil.

2.1.4. Mastite na espécie ovina

A mastite também acomete ovelhas no mundo todo, sendo os estudos nessa área mais realizados em países onde estes animais são criados para a produção de leite (BERGONIER et al., 2003; CONTRERAS et al., 2007).

Na França, país que se destaca na produção de subprodutos derivados do leite de ovelha, as prevalências de mastite ovina descritas foram de 5% para mastite clínica e 10% para mastite subclínica (BARILLET et al., 2001). Na Itália, país detentor de grande rebanho ovino para produção de leite, a prevalência de mastite foi de 0,36% em análise realizada em 1357 amostras de leite provenientes de 684 ovelhas (RIGGIO et al., 2013). Na Turquia (ERGÜN et al., 2009) e Iran (SANI et al., 2015), as prevalências de mastite na espécie ovina foram de 11,7% e 14,7%, respectivamente.

No Brasil, estudos relacionados à mastite ovina ainda são escassos e direcionados a ovinos destinados ao abate, mas vêm sendo realizados na medida em que a raça Santa Inês ganhou espaço nos rebanhos nacionais (CARTAXO et al., 2011). Em estudo realizado no estado do Rio Grande do Sul, Tejada et al. (2012) encontraram frequências de mastite que variaram de 23,8% a 80,9% das amostras de leite de ovelhas criadas para corte. No estado do Paraná, Pereira et al. (2014) avaliaram 6370 matrizes em 54 propriedades de ovelhas Santa Inês e constataram que a frequência de mastite clínica entre as propriedades variou de 2 a 30%, com frequência média de 6,7%. Em São Paulo, este percentual foi de 24,5% (VERÍSSIMO et al., 2010), enquanto no estado do Pará a frequência de mastite clínica foi de 5,9% (SILVA et al., 2010). Em relação à mastite subclínica, Coutinho et al. (2006) realizaram estudo no estado da Bahia e obtiveram 26,6% das amostras positivas no cultivo microbiológico, semelhante ao resultado relatado por Costa et al. (2013) no estado da Paraíba (21,2%). Em São Paulo, a frequência de mastite subclínica relatada por Domingues et al. (2006) foi de 36,3%.

Assim como em outras espécies animais, os ovinos são suscetíveis a múltiplos agentes etiológicos nas mastites como, bactérias, leveduras, fungos filamentosos, algas e vírus (BERGONIER et al., 2003; PEIXOTO et al., 2010a). Em escala decrescente de frequência, os microrganismos mais isolados na mastite ovina no mundo são: *Staphylococcus coagulase negativa* (SCN), não sendo considerados patógenos menores em pequenos ruminantes, *Streptococcus* spp., enterobactérias, *Trueperella pyogenes*, *Corynebacterium* spp., *Pasteurella* spp., e *Pseudomonas* spp. (Bergonier et al., 2003). Entretanto, em casos esporádicos, *Staphylococcus aureus* foi relatado em altas

frequências em mastite caprina e ovina (VAUTOR et al., 2009). No Brasil, estudos sobre a etiologia da mastite ovina têm demonstrado que *Staphylococcus coagulase negativa* (SCN) é o microrganismo mais frequente, sendo o mais isolado tanto em casos de mastite clínica, quanto subclínica (COUTINHO et al., 2006; SILVA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2012; TEJADA et al., 2012; PEREIRA et al., 2014).

Além dessas bactérias, outros microrganismos já foram relatados em casos de mastite ovina como *Serratia macresens* (TZORA; FTHENAKIS, 1998), *Burkholderia cepacia* (BERRIATUA et al., 2001), *Aspergillus fumigatus* (BERGONIER et al., 2003), *Micrococcus* spp. (COUTINHO et al., 2006), *Manheimia haemolytica* (SANTOS, 2008), *Aerococcus viridans* e *Enterococcus faecium* (TEJADA et al., 2012).

2.2. Diagnóstico das Mastites

O diagnóstico das mastites pode ser realizado por exames diretos e indiretos, onde os métodos indiretos estão fundamentados na intensidade da reação inflamatória, sendo observada através de alterações na concentração dos componentes do leite e na contagem de células somáticas (CCS), enquanto as técnicas diretas são baseadas na identificação do agente etiológico mediante sua presença no leite mastítico, como o cultivo bacteriano, ou na observação das alterações macroscópicas do leite (SIMÕES; OLIVEIRA, 2012).

Dessa forma, diagnosticar mastite clínica baseia-se no exame clínico minucioso da glândula mamária, bem como na realização do teste da caneca de fundo preto, ou teste de Tamis, que possibilitam a observação de alterações macroscópicas do leite nos primeiros jatos ordenhados (ZAFALON et al., 2008).

Diversos métodos são aplicados no diagnóstico da mastite subclínica. Dentre eles estão a contagem de células somáticas (CCS), *Wisconsin Mastitis Test* (WMT), *California Mastitis Test*, exame microbiológico do leite, análise dos componentes do leite, análise da condutividade elétrica do leite, técnicas moleculares como a reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction - PCR*), *Multiplex - PCR*, *Real Time - PCR*, ensaio imunoenzimático (*ELISA*), avaliação proteômica, utilização de biochips e biossensores (DEB et al., 2013), onde se destacam a CCS, o CMT e o exame microbiológico, por serem os mais utilizados.

2.2.1. Contagem de células somáticas (CCS)

A contagem de células somáticas (CCS) é uma técnica de diagnóstico das mastites, baseada na contagem de todas as células presentes no leite, incluindo leucócitos e células do epitélio glandular secretor (DAMM et al., 2017). As células epiteliais são originárias na descamação normal do epitélio secretor da glândula mamária, enquanto os leucócitos migram para os alvéolos glandulares, a partir da corrente sanguínea, em resposta a reações inflamatórias, sempre que a glândula sofre algum tipo de agravo, como as infecções, por exemplo, elevando o número de células somáticas no leite a medida em que a infecção progride (HAND et al., 2012). Por essa característica é um excelente parâmetro quantitativo de monitoramento da mastite no rebanho leiteiro, utilizado no diagnóstico da mastite subclínica (RIVAS et al., 2001; DEB et al., 2013), podendo ser realizada individualmente por animal ou em leite coletado diretamente do tanque (BRASIL, 2011).

A composição do leite, em relação às células somáticas, varia de acordo com a espécie e com o tipo de secreção, se colostro, se leite de início ou do fim do período de lactação ou se leite mastítico (LIBERA et al., 2004). Além disso, aumentos na CCS podem ser influenciados pelo período do ano, volume de produção, número de lactações, distúrbios nutricionais (SHARMA et al., 2011) e patógenos envolvidos em possíveis infecções intramamárias (REIS et al., 2011).

Na espécie bovina, a contagem total de células somáticas em leite produzido por vacas saudáveis deve ser inferior a 50.000 células/mL de leite (HAND et al., 2012). Já no leite de vacas com mastite subclínica este número pode chegar a 200.000 células/mL em média (HAGNESTAM-NIELSEN et al., 2009), sendo considerada alta a possibilidade de infecção da glândula mamária caso essa contagem ultrapasse as 300.000 células/mL (BRESSAN et al., 2000).

Em bubalinos, durante muito tempo utilizou-se os parâmetros bovinos de CCS para inferir o diagnóstico da mastite, entretanto estudos demonstraram que esta prática era inadequada e insatisfatória (AMARAL et al., 2005; CARVALHO et al., 2007; ESCRIVÃO et al., 2008), assumindo-se que a CCS no leite proveniente de búfalas sadias pode variar de 17.000 células/mL (CERON-MUÑOZ et al., 2002) a 100.000 células/mL (SAHIN et al., 2017), sendo que uma CCS média de 137.000 células/mL já pode estar associada a infecções bacterianas (PIZAURO et al., 2014).

Em leite de cabras, a concentração de células somáticas é seguramente maior que na espécie bovina. Isso se deve à fisiologia da glândula, que na espécie caprina é do tipo apócrina, liberando parte da célula junto com seu produto de secreção (PAAPE et al., 2007). Assim, em leite de cabras saudáveis, a CCS pode variar de 270.000 de células/mL a 2.000.000 de células/mL (JIMÉNEZ-GRANADO et al., 2014), enquanto que 3.500.000 células/mL já significa intenso processo inflamatório na glândula mamária (LEITNER et al., 2016).

Já para a espécie ovina, estudo realizado por Paape et al. (2007) observou que, em ovelhas com a glândula mamária saudável, a CCS em alguns animais foi de aproximadamente 30.000 células/mL de leite no pico da lactação, com valor médio de 185.000 células/mL, mas nunca ultrapassando as 477.000 células/mL. Por outro lado, ovelhas com mastite subclínica apresentaram CCS média de 1.500.000 células/mL, nunca sendo menor que 1.000.000 células/mL, semelhante ao descrito por Leitner et al. (2016).

Quando se trata da contagem diferencial das células somáticas do leite, em situação fisiológica, o leite bovino é composto por 3% de células polimorfonucleares (PMN), 79% de macrófagos, 16% de linfócitos e 2% de células do epitélio glandular (SHARMA et al., 2011). Em búfalas, PMNs correspondem a 22,5%, macrófagos 25,8%, linfócitos 30,8% e células do epitélio glandular 20,9% das células somáticas do leite (HUSSAIN et al., 2012). Já no leite caprino, a composição é de 72,6% de PMNs, 14,8% macrófagos, 12,4% linfócitos e 0,2% de células do epitélio glandular (BOULAABA et al., 2011), enquanto que em ovelhas, as proporções celulares do leite são de 31% de PMNs, 57% de macrófagos, 8% de linfócitos e 4% de células do epitélio glandular (MORGANTE et al., 1996).

2.2.2. California Mastitis Test (CMT)

California Mastitis Test (CMT) é um teste rápido, que pode ser realizado na propriedade no momento da ordenha, com a utilização de um *kit* comercial, composto por um reagente detergente tensoativo aniônico neutro que, em contato com quantidade igual de leite, libera o material genético celular ao romper a membrana plasmática dos leucócitos presentes no leite, dando consistência gelatinosa a essa mistura, variando de intensidade de acordo com a quantidade de leucócitos presente na amostra de leite (SCHALM; NOORLANDER, 1957). Dessa forma, o resultado do CMT pode ser

classificado com base na intensidade das reações observadas, sendo classificado como negativo quando não há formação de gel; uma cruz (+) quando a formação do gel é fraca; duas cruces (++) quando a formação é moderada; e três cruces (+++) quando a formação do gel é forte (KIVARIA et al., 2007), sendo uma ferramenta valiosa na determinação da mastite subclínica (SOUZA et al., 2012).

Este método de diagnóstico indireto foi padronizado para a espécie bovina, devendo-se ter bastante critério na interpretação dos resultados em outras espécies. Para a espécie bovina, o diagnóstico de mastite subclínica é dado a partir do resultado uma cruz (+) no CMT, havendo boa correlação com o exame bacteriológico (BRITO et al., 1997). Na espécie bubalina, segundo Oliveira et al. (2004), o uso do CMT pode ser controverso no diagnóstico preciso de mastite, uma vez que, em comparação com a espécie bovina, o número de células somáticas no leite de búfala é considerado baixo. Este fato foi verificado em um estudo que avaliou 651 amostras de leite bubalino com resultado positivo no CMT, porém, somente 330 (50,7%) foram positivas no exame bacteriológico, demonstrando baixa correlação entre os testes (MEDEIROS et al., 2013). Por outro lado, outros estudos verificaram sensibilidade variando de 78% a 98% e especificidade variando de 88% a 93%, indicando boa correlação entre o CMT e outros métodos de diagnóstico de mastite em búfalas (PANCHAL et al., 2016; KRISHNAMOORTHY et al., 2017; TANMAY et al., 2018). Além disso, nos casos de discordância entre o método do CMT e o cultivo microbiológico, há de se considerar outros fatores que podem elevar o número de células no leite como as causas não infecciosas da mastite (PIZAURO et al., 2014).

Na espécie ovina, a maioria dos estudos realizados sugere que reação de uma cruz (+) no CMT deve ser utilizada como ponto de corte para identificar glândulas infectadas e, portanto, com mastite subclínica (MCDUGALL et al., 2001; CLEMENTS; TAYLOR; FITZPATRICK, 2003; NUNES et al., 2008). Peixoto et al. (2010b) relataram forte correlação (73,2%) entre o resultado uma cruz (+) no CMT e o exame bacteriológico em amostras ovinas. Também foi relatado que, em amostras de leite provenientes da espécie ovina, o percentual de culturas bacterianas com resultado positivo aumentou de 11,7%, entre as amostras com resultado negativo no CMT, para 53,6%, entre amostras com resultado de três cruces (+++) no CMT (ARSENAULT et al., 2008).

Para caprinos, a precisão do CMT também é questionável, devido à grande presença de células epiteliais no leite desta espécie, sendo sugerido por vários autores que a interpretação dos resultados seja de forma diferente da utilizada para os bovinos (HAENLEIN, 2002; MCDUGALL et al., 2010; PERSSON; OLOFSSON, 2011; PEIXOTO et al., 2016). Neste caso, recomenda-se que o ponto de corte no CMT para a espécie caprina seja de duas cruzes (++). Este fato foi constatado e relatado por Peixoto et al. (2010), que obtiveram valores de concordância entre o exame microbiológico e o CMT igual a 81,4% para reações a partir de duas cruzes (++), embora o índice Kappa de concordância ($K=0,17$) tenha sido considerado baixo.

Respeitando as peculiaridades de cada espécie, o CMT é de grande valia no diagnóstico das mastites, sendo recomendada a associação entre técnicas de diagnóstico direto e indireto para maiores chances de acerto (SOUZA et al., 2012; ZHAO et al., 2015).

2.2.3. Cultura microbiológica do leite

A análise microbiológica do leite é indispensável para a adoção de medidas de controle específicas no tratamento das mastites, sendo o isolamento do agente etiológico considerado o padrão ouro de diagnóstico das infecções intramamárias (BOGNI et al., 2011; DEB et al., 2013).

A importância da realização do exame microbiológico no diagnóstico da mastite foi relatada por Dohoo et al. (2011b) que preconizaram a observação de culturas puras com o crescimento de, no mínimo, dez unidades formadoras de colônia (UFC), para que se atribua um determinado microrganismo como causa de mastite. Segundo Dohoo et al. (2011a), também é de grande importância atentar para o número de amostras de leite necessárias para a confirmação do diagnóstico de uma infecção intramamária, estando este número diretamente relacionado ao microrganismo envolvido, pois a sensibilidade e a especificidade do exame microbiológico podem variar de acordo com o microrganismo causador da mastite.

Neste contexto, o uso adequado de técnicas de cultura bacteriana aprimoradas pode aumentar significativamente a sensibilidade na detecção de microrganismos associados à mastite (BRITTEN, 2012). A identificação fenotípica dos microrganismos isolados, após a lactocultura, baseia-se na avaliação macro e microscópica da

morfologia das colônias, características de crescimento, resistência antimicrobiana e capacidade de metabolizar substratos, dentre outros, que são determinados por expressão gênica (ZADOKS; WATTS, 2009).

O diagnóstico microbiológico da mastite possui algumas vantagens, tais como: possibilita a identificação bacteriana por métodos fenotípicos que dependem de características bioquímicas comumente associadas a grupos específicos de bactérias, é de fácil execução, facilmente se dispõe desse serviço no mercado e tem baixo custo relativo (DUARTE et al., 2015). Entretanto, desvantagens também existem como, a variabilidade na expressão fenotípica de determinadas características entre isolados de uma mesma espécie, subjetividade na interpretação dos resultados, além de ser considerada laboriosa e demorada (ZADOKS; WATTS, 2009; RAEMY et al., 2013). Segundo Jaeger et al. (2017), o tempo mínimo necessário para uma leitura adequada de cada cultura é de, pelo menos, 24 horas, implicando em retardo significativo na exclusão de animais negativos para a mastite.

Durante anos, pesquisadores vêm tentando desenvolver métodos que aumentem a taxa de isolamento bacteriano na lactocultura como, pré-incubação e congelamento do leite, além de aumentar o volume de leite inoculado na placa de meio de cultura. Ao aumentar o volume inoculado de 0,01 para 0,1 mL de leite observou-se elevação significativa da sensibilidade do teste (VAKKAMÄKI et al., 2017), assim como o congelamento do leite e a pré-incubação por quatro horas elevou a taxa de culturas bacterianas com resultado positivo (DINSMORE et al., 1992). Porém, deve-se considerar que além de aumentar o número de culturas bacterianas com resultado positivo, essas técnicas também elevam a possibilidade de contaminação do leite (LAM et al., 2009).

Mais recentemente, sistemas de cultura microbiológica na própria fazenda vêm sendo utilizados, com resultados satisfatórios, apesar de relativamente apresentar baixa especificidade, oferecendo vantagens econômicas como a redução dos custos com a terapia e da quantidade de leite descartado (LAGO et al., 2011). Um dos principais sistemas de cultura na fazenda consiste de uma placa com dois meios de cultura diferentes, onde um permite o crescimento de bactérias Gram positivas e o outro de bactérias Gram negativas. Um segundo sistema de cultura na fazenda consiste de dois meios de cultura em duas placas diferentes, onde uma permite o crescimento não seletivo de bactérias aeróbias, enquanto a outra permite o crescimento exclusivo de

coliformes. Em estudo comparativo entre os dois sistemas, ambos foram capazes de isolar bactérias de casos clínicos de mastite, apresentando sensibilidades de 97,9%, para o primeiro sistema e 93,8%, para o segundo, e especificidades de 68,6% e 70,1%, respectivamente; entretanto não foi possível determinar se os isolados eram de fato a causa da mastite ou contaminação da amostra (DUARTE et al., 2015). Sendo assim, uma das desvantagens desses métodos é a manipulação por pessoas sem treinamento adequado em técnicas microbiológicas, diminuindo o potencial de uso das mesmas (GANDA et al., 2016).

2.3. *Staphylococcus* spp.

Taxonomicamente, o gênero *Staphylococcus* pertence ao Filo *Firmicutes*, Classe *Bacilli*, Ordem *Bacillales*, Família *Staphylococcaceae*, onde estão agrupados outros gêneros de bactérias menos conhecidos como *Gemella*, *Jeotgalicoccus*, *Macrococcus*, *Nosocomiicoccus* e *Salinicoccus*. Atualmente são reconhecidas 47 espécies e 21 subespécies de *Staphylococcus* (PRAX et al., 2013; PUBLIC HEALTH ENGLAND, 2014)

Bactérias do gênero *Staphylococcus* (do grego “*staphyle*” = cacho de uvas, e “*cocos*” = grão) foram descritas, pela primeira vez por Ogston em 1880, ao relatar a ocorrência de “*coccus*” em formato de cacho de uva como causa de numerosos casos de doenças piogênicas (BAIRD-PARKER, 1990).

Staphylococcus são cocos Gram positivos, imóveis, não produtores de esporos e de tamanho variável (0,5 a 1,5 µm de diâmetro), sendo observados em microscopia de forma isolada, em pares ou em cadeias irregulares, semelhantes a cachos de uva. As colônias medem de 2 a 3 mm de diâmetro, após 24 horas de incubação, são opacas e apresentam cores que podem variar de branco a creme, mas ocasionalmente podem ser amarelas ou alaranjadas. A temperatura ótima de crescimento varia de 30 a 37 °C. São anaeróbios facultativos e o seu metabolismo é fermentativo. Espécies de *Staphylococcus* são catalase positiva e oxidase negativa, com exceção das espécies *S. sciuri*, *S. lentus*, *S. vitulinus*, *S. fleuretti*, e *S. caseolyticus*, sendo este um dos fatores de diferenciação para o gênero *Streptococcus*, que é catalase negativa. Geralmente reduzem Nitrato a Nitrito, são sensíveis à lise por lisostafina e resistentes à lise por lisozima e são capazes de crescer em concentrações de 6,5% de cloreto de sódio (NaCl). Algumas espécies desse gênero produzem toxinas extracelulares, desoxirribonuclease (DNase) e/ou DNase

termoestável e em cultivo em Agar Sangue, algumas espécies também podem produzir beta-hemólise (MURRAY et al., 2009).

Uma das características bioquímicas mais utilizadas para diferenciação de espécies de *Staphylococcus* é a capacidade de coagular o plasma. Somente seis espécies desse gênero são tipicamente coagulase positiva (*Staphylococcus* coagulase positiva - SCP): *Staphylococcus aureus*, *S. delphini*, *S. intermedius*, *S. lutrae*, *S. pseudintermedius* e *S. schleiferi* subsp. *coagulans*; outras duas são coagulase variável: *Staphylococcus hyicus* e *Staphylococcus agnetis*; as demais compõem o grupo dos *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN) (KONEMAN et al., 2008).

2.3.1. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus é a espécie de maior destaque entre os SCP e, conseqüentemente, é a mais estudada, sendo responsável por diversas doenças em humanos (osteomielites e endocardites, por exemplo) e animais (mastite é uma das principais), além de apresentarem resistência a um número cada vez maior de antimicrobianos (FLUIT, 2012; YANG et al., 2012). O nome *S. aureus* tem origem no latim (“*aureus*” = ouro) devido suas colônias apresentarem coloração dourada quando cultivadas em meio de cultura enriquecido. Essa característica é possível graças à capacidade desses microrganismos produzirem pigmentos carotenoides, que estão relacionados à defesa contra oxidantes produzidos pelo sistema imune do hospedeiro (LIU et al., 2005).

Diversos fatores de virulência são produzidos por *S. aureus* e pelo menos 15 já foram descritos. Estes fatores de virulência são divididos em três grupos: adesinas – responsáveis por promover reconhecimento e adesão aos componentes da matriz extracelular; exotoxinas – dentre elas, as hemolisinas, nucleases, lipases, proteases, collagenases e hialuronidases e toxina de superantígeno – grupo de proteínas imunoestimuladoras potentes, assim como a toxina causadora da síndrome do choque tóxico (BAKER; ACHARYA, 2004; CARFORA et al., 2015). De modo geral, a principal função das toxinas e enzimas produzidas por *Staphylococcus aureus* é converter os tecidos dos hospedeiros em nutrientes essenciais ao desenvolvimento bacteriano (DINGES et al., 2000).

Diferentemente de outras bactérias, *S. aureus* não são considerados tradicionalmente patógenos intracelulares, tal como *Shigella flexneri* e *Listeria monocytogenes*, apesar de existirem evidências da invasão e persistência desses microrganismos por longos períodos de tempo em diversos tipos de células, como fibroblastos, osteoblastos, queratinócitos, células endoteliais e epiteliais, em modelos experimentais de culturas celulares (POPOV et al., 2014).

A capacidade de sobrevivência intracelular de *S. aureus* vem sendo relatada como um importante componente da patogênese das mastites (TURK, 2017). Amostras obtidas de animais mastíticos demonstraram a presença desse microrganismo dentro de células alveolares isoladas de leite, entretanto animais saudáveis também podem carrear essa bactéria de forma intermitente (ZHANG et al., 2016).

Sabe-se que algumas cepas de *S. aureus* são adaptadas especificamente a determinados hospedeiros, enquanto outras têm a capacidade de colonizar diferentes espécies animais, o que sugere grande capacidade adaptativa dessa bactéria conforme interage com seu hospedeiro (PRICE et al., 2012). A comprovação de tal fato foi obtida em estudo realizado por Sakwinska et al. (2011), demonstrando que *S. aureus* podem ter especificidade sítio-hospedeiro, mesmo tendo observado cepas comuns entre amostras de leite mastítico, secreção nasal e mãos de ordenhadores e não ordenhadores.

S. aureus tem sido apontado como um importante patógeno causador de mastite em diversas espécies animais (FOSTER, 2012; PICCININI et al., 2012). Geralmente esta bactéria coloniza o interior da glândula mamária, ou a pele e o canal dos tetos, especialmente quando se observa algum tipo de lesão nessas estruturas, podendo ser transmitido entre animais através de fômites. Esta bactéria também pode ser encontrada em diferentes sítios extramamários. Porém, quando a infecção é na glândula mamária, em decorrência da produção de suas toxinas, ocorre necrose do parênquima mamário com conseqüente perda de função secretora da glândula (TURK, 2017). Além disso, por serem potencialmente veiculadas pelo leite e seus derivados, toxinas produzidas por *S. aureus* têm sido comumente associadas a casos de intoxicação alimentar em humanos (FEITOSA et al., 2017).

Mastites causadas por *S. aureus* apresentam-se, geralmente, de forma subclínica, persistindo por longos períodos de tempo (SOMMERHÄUSER et al., 2003), sendo publicados diversos estudos onde esta bactéria é a mais frequentemente relacionada a casos subclínicos de mastite (SÁ et al., 2004; ABERA et al., 2010; ZAFALON et al.,

2012; SANTOS et al., 2014; ANUEYIAGU; ISIYAKU, 2015; ABEBE et al., 2016; SAGLAM et al., 2017). Apesar disso, *S. aureus* também foram relatados como causa de mastite clínica em várias espécies (CAPURRO et al., 2010; MARIN et al., 2010; JAMALI et al., 2014; ATTILI et al., 2016).

2.3.2. *Staphylococcus coagulase negativa* (SCN)

Segundo Taponen e Pyörälä (2009), *Staphylococcus* coagulase negativa também estão entre os microrganismos mais associados às infecções intramamárias em ruminantes. Mais de 40 espécies e subespécies estão catalogadas neste grupo de bactérias, sendo *S. epidermidis*, *S. simulans* e *S. chromogenes* as espécies mais isoladas em leite mastítico (KRISHNAMOORTHY et al., 2016).

São considerados patógenos oportunistas, fazendo parte da microbiota natural da pele dos animais. Assim, o desencadeamento de mastite causada por SCN ocorre, somente, em condições que favoreçam a colonização do úbere por esses microrganismos, sendo inclusive considerado por alguns pesquisadores como microrganismos benéficos à saúde do úbere (VANDERHAEGHEN et al., 2014). Entretanto, diferenças ecológicas entre as espécies desse grupo de bactérias são relatadas no que se refere a adaptação destas ao hospedeiro, bem como seus principais reservatórios (ápice dos tetos, equipamentos de ordenha, luvas ou mãos dos ordenhadores) em diferentes rebanhos (VISSCHER et al., 2014).

No que se refere à prevalência de mastite por SCN, levantamentos recentes apontam que pode haver grande variação na participação destes microrganismos nas diferentes regiões e países (KRISHNAMOORTHY et al., 2016). No Brasil, a prevalência de SCN como causa de mastite variou de 21,3 a 83,3% nas diferentes regiões estudadas, demonstrando sua importância como agente etiológico das infecções intramamárias, especialmente entre pequenos ruminantes, onde se observou as maiores taxas de prevalência desse microrganismo, enquanto são considerados patógenos menores na espécie bovina (ACOSTA et al., 2016).

Estudos epidemiológicos sobre a participação de SCN em mastite ainda são incipientes, tendo em vista o despertar, relativamente recente, para a importância desse grupo de bactérias como patógenos (VISSCHER et al., 2014). Porém, sabe-se que SCN

são mais frequentes em casos subclínicos de mastite nas diversas espécies (TAPONEN; PYÖRÄLÄ, 2009).

Em comparação com espécies de SCP, a produção de leite sofre menos impacto negativo em casos de mastite por SCN, havendo também uma menor elevação da contagem de células somáticas, surgimento de sinais sistêmicos também são menos frequentes, além de apresentarem melhor resposta ao tratamento, obtendo-se taxas de cura microbiológica de 80 a 90% (HOSSEINZADEH; SAEI, 2014; SWARTZ et al., 2016).

No entanto, o controle de mastite por SCN, pode ser dificultado devido à heterogeneidade deste grupo de bactérias. Em geral, as infecções por SCN são autolimitantes, sendo recomendado o tratamento apenas em casos necessários, segundo avaliação do médico veterinário, uma vez que estudos têm demonstrado que o uso inadequado de antimicrobianos contra SCN é capaz de selecionar cepas possuidoras de genes de resistência, servindo de reservatórios desses genes e podendo transmiti-los para outras espécies do gênero *Staphylococcus* spp. (ERGÜN et al., 2012).

SCN apresentam alto potencial de resistência antimicrobiana, sendo relatado grande número de cepas portadoras de fatores genéticos indutores de resistência antimicrobiana, especialmente para a classe dos betalactâmicos, como os genes *mecA* e *blaZ* (MEDEIROS et al., 2011b; FRANÇA et al., 2012; MERZ et al., 2016), tornando comum a produção de betalactamases em espécies desse grupo (WALLER et al., 2011).

2.4. Resistência a Betalactâmicos em *Staphylococcus* spp.

Tanto em medicina humana quanto veterinária, o surgimento e a disseminação de resistência antimicrobiana vêm se destacando como pontos críticos no controle de enfermidades infecciosas, não só por tornar o tratamento mais difícil, mas também por representar grande risco à saúde pública (MOTA et al., 2012).

Os mecanismos de resistência antimicrobiana podem ser divididos, quanto à origem, em duas categorias: intrínsecos ou adquiridos. No primeiro caso, a resistência antimicrobiana é exibida naturalmente por todos os indivíduos de uma determinada espécie bacteriana. Já a forma adquirida é resultante da obtenção de genes de resistência através de mutação em genes reguladores ou estruturais, ou por meio de elementos genéticos móveis como os plasmídeos e os transposons (MUNTA; ARIAS, 2016).

Staphylococcus spp. se destacaram, ao longo do tempo, como microrganismos com grande capacidade de desenvolver resistência antimicrobiana, seja por via enzimática, modificação metabólica ou estrutural (MATHUR; SINGH, 2005; GIEDRAITIENĖ et al., 2011). Tal fato é notável ao se observar que pouco tempo após o início do uso clínico da penicilina, em meados da década de 40 do século passado, começaram a surgir as primeiras cepas de *S. aureus* resistentes a esse antimicrobiano. Essa resistência foi atribuída à ação de uma enzima hidrolítica, na época, denominada penicilinase e, mais tarde, chamada de betalactamase (VENTOLA, 2015). Como alternativas para tratar o crescente número de infecções causadas por cepas resistentes à penicilina, no início da década de 60, surgiram as penicilinas sintéticas, como metilicina e oxacilina, antimicrobianos pertencentes à classe dos beta-lactâmicos assim como a penicilina. Entretanto, ainda no início da década foram registrados os primeiros isolados de *S. aureus* resistentes à metilicina (MRSA) na Europa e, posteriormente, no mundo inteiro (GREMA, 2015), principalmente em unidades de terapia intensiva (UTIs), onde a taxa de infecção por MRSA pode ser superior a 50% (ASLAM et al., 2013; CHO et al., 2017).

Beta-lactâmicos é uma classe antimicrobiana que possui considerável importância clínica em razão da sua elevada eficácia terapêutica e da baixa toxicidade. Esta classe representa inúmeros antimicrobianos, sendo definida quimicamente pela existência de um anel beta-lactâmico (BARD et al., 2014).

O mecanismo de ação dessa classe é determinado pelo anel beta-lactâmico através da inibição da síntese de peptidoglicanos. Este fato lhe confere também a baixa toxicidade, uma vez que sua atuação é em um componente da parede celular das bactérias, que não é encontrado em células eucarióticas (AZEVEDO, 2014). Entretanto, o anel beta-lactâmico também é o alvo das betalactamases, principal mecanismo de resistência a essa classe antimicrobiana por parte das bactérias (SHAIKH et al., 2015).

Diversas formas de resistência antimicrobiana são conhecidas, porém quando se trata de resistência a beta-lactâmicos, três mecanismos principais são descritos: ação enzimática, destruindo total ou parcialmente o anel beta-lactâmico; modificação do alvo antimicrobiano, causando diminuição, ou perda total da afinidade entre o antimicrobiano e o seu sítio de ligação; e atuação de bombas de efluxo, expulsando os fármacos antimicrobianos do citoplasma, ou periplasma bacterianos (MAJIDUDDIN et al., 2002).

2.4.1. Betalactamases

Atualmente, estão catalogadas mais de 900 betalactamases diferentes e dependendo da sua especificidade podem ser classificadas como penicilases, carbapenemases ou cefalosporinases (ÖZTÜRK et al., 2015).

Betalactamases são enzimas que têm a capacidade de hidrolisar os beta-lactâmicos, tornando-os ineficazes. Especula-se que, provavelmente, antes mesmo da descoberta dos beta-lactâmicos essas enzimas já existissem, supostamente com outras funções nas bactérias (MAJIDUDDIN et al., 2002).

Estas enzimas são produzidas por bactérias Gram positivas, anaeróbicas e Gram negativas, apresentando grande importância neste último grupo, onde a produção dessa enzima é o principal mecanismo de resistência aos betalactâmicos (SHAIKH et al., 2015). Essa produção enzimática pode ser mediada por genes plasmidiais ou cromossômicos, e nesse caso são facilmente induzíveis (WILKE et al., 2005; OLSEN et al., 2006). Por outro lado, quando estão relacionadas à presença de plasmídeos são transferidas com facilidade, como ocorre nas betalactamases produzidas por *Moraxella catarrhalis*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* (SUAREZ; GUDIOL, 2009).

O gene responsável pela indução da síntese dessa enzima é o *blaZ*. Esta síntese pode ocorrer de forma constitutiva ou regulada pela presença de antimicrobiano no meio, através do gene antirrepressor *blaRI* e do gene repressor *blaI* (LI et al., 2007), já tendo sido relatada a transferência desse gene entre cepas de SCN e *S. aureus*, o que sugeriu que SCN sejam reservatórios desses genes para outras espécies de bactérias (OLSEN et al., 2006).

A presença do gene *blaZ* vem sendo relatada em bactérias isoladas tanto em humanos (SCHMIDT et al., 2015) como em cães (KANG et al., 2014), gatos (BIEROWIEC et al., 2016), bovinos (KLIMIENE et al., 2016), bubalinos (MEDEIROS et al., 2011b), caprinos e ovinos (MERZ et al., 2016) e diversas outras espécies animais (BAGCIGIL et al., 2012).

No Brasil, o gene *blaZ* foi observado em diversos estudos que caracterizaram *Staphylococcus* spp. isolados de casos de mastite, principalmente na espécie bovina, demonstrando que este gene está amplamente distribuído entre cepas de todo o país. Na região Nordeste, por exemplo, Krewer et al. (2015) detectaram a presença desse gene

em 93,1% (203/218) das cepas isoladas de rebanhos bovinos. Já no Rio de Janeiro, a prevalência do gene foi de 5,2% (13/250) dentre as amostras avaliadas (MENDONÇA et al., 2012). Na China, Yang et al. (2015) detectaram o gene *blaZ* em 94,6% (35/37) dos *Staphylococcus aureus* resistentes à penicilina avaliados por eles. Resultado semelhante foi verificado por Szweda et al. (2014), na Polônia, ao analisarem 123 cepas de *S. aureus* e detectarem a presença do gene em 25 de 29 cepas resistentes à penicilina, demonstrando assim que esse gene também é bastante presente em diferentes regiões do mundo.

2.4.2. Modificação dos sítios de ligação (PBPs)

Outro mecanismo de resistência bacteriana frente aos beta-lactâmicos é a modificação do sítio de ligação dessa droga na bactéria. A ineficácia do antimicrobiano fica evidente, neste caso, a partir do entendimento de que, para exercerem sua atividade, os beta-lactâmicos precisam se ligar às proteínas ligadoras de penicilina, do termo em inglês *penicilin-binding-protein (PBPs)*, existentes nas camadas mais externas da membrana citoplasmática bacteriana, às quais os betalactâmicos se ligam para penetrar no citoplasma da célula (LESKI; TOMASZ, 2005).

PBPs são proteínas com atividade enzimática de grande importância na síntese da parede celular bacteriana, sendo encontrada naturalmente em quatro formas ativas denominadas de 1, 2, 3 e 4 (LESKI; TOMASZ, 2005). Entretanto, bactérias resistentes têm a capacidade de modificar essas proteínas, mais precisamente pela produção de uma PBP diferente das endógenas, chamadas de PBP2a ou PBP2', como ocorre com os *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA), mantendo sua atividade enzimática ativa, mas diminuindo a afinidade com os beta-lactâmicos e, conseqüentemente, a efetividade do antimicrobiano. Assim, na presença de beta-lactâmicos, as PBPs endógenas são desativadas, enquanto a PBP2a consegue manter a síntese de parede celular (SUAREZ; GUDIOL, 2009). Felizmente, nesses casos, as cefalosporinas de 5º geração (ceftobiprole e ceftaroline) possuem afinidade com todos os tipos de PBPs, incluindo a PBP2a, representando uma alternativa no tratamento das infecções por MRSA (SARAVOLATZ et al., 2011).

O determinante genético para a modificação dessas proteínas é o gene *mecA*. Este gene está localizado numa ilha genética móvel denominada *Staphylococcal Cassette Chromosome mec* (SCCmec), facilitando sua transferência horizontal entre

diferentes cepas bacterianas (KONDO et al., 2007). Atualmente, estão caracterizados doze tipos diferentes do SCCmec (SCCmecI a XII), de acordo com as sequências de nucleotídeos observadas (SHORE; COLEMAN, 2013; WU et al., 2015).

Além disso, em 2011, um gene homólogo ao gene *mecA*, chamado de *mecC* foi detectado em amostras de leite de vacas na Inglaterra (SHORE et al., 2011) e em amostras clínicas humanas no Reino Unido e Dinamarca (GARCÍA-ÁLVAREZ et al., 2011), passando, posteriormente, a ser detectado em vários outros países a partir de amostras clínicas humanas (KERSCHNER et al., 2015; BECKER et al., 2016; LINDGREN et al., 2016) e de leite de vacas (LAURENT et al., 2012; UNNERSTAD et al., 2013; GINDONIS et al., 2013).

A frequência de *Staphylococcus* spp. resistentes a meticilina (MRS) em medicina veterinária é relativamente baixa, quando comparada aos relatos em humanos (VANDERHAEGHEN et al., 2014). No Brasil, Mendonça et al. (2012) analisaram 250 *Staphylococcus* spp. isolados de mastite bovina no estado do Rio de Janeiro, mas não detectaram a presença dos genes *mecA* ou *mecC* em nenhum dos isolados. O mesmo resultado foi observado por França et al. (2012) em 210 cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas de mastite caprina e ovina na região Nordeste do Brasil. Já na espécie bubalina, Medeiros et al. (2011b) detectaram o gene *mecA* em 5,5% dos 199 *Staphylococcus* spp. analisados. Esse padrão se observa em outros países do mundo, como na Índia, onde Kutar et al. (2015) testaram 52 isolados de *Staphylococcus aureus* e encontraram 9,61% portadores do gene *mecA* em casos de mastite bovina e bubalina. Por outro lado, na China, 47,6% (49/103) dos isolados foram positivos para o gene *mecA*, apesar de 37 destas terem sido sensíveis, no teste fenotípico, à oxacilina, antimicrobiano padrão para detecção de resistência à meticilina, enfatizando a importância da utilização de métodos genotípicos na detecção de MRSA (PU et al., 2014).

2.4.3. Bombas de efluxo

Por fim, mas não menos importante, a ação de bombas de efluxo compõem um outro mecanismo de resistência antimicrobiana. Bombas de efluxo são proteínas de transporte envolvidas na extrusão de substâncias tóxicas à célula, incluindo todas as classes de antimicrobianos clinicamente relevantes, do meio intracelular para o ambiente externo. Estas proteínas são encontradas tanto em bactérias Gram negativas como Gram positivas, bem como em organismos eucariotos. Podem ser específicas para

um substrato ou transportar compostos estruturalmente semelhantes, incluindo antimicrobianos de diferentes classes, o que permite a algumas bombas de efluxo estarem associadas à multirresistência antimicrobiana (WEBBER; PIDDOCK, 2003).

O primeiro sistema de efluxo foi descrito no início dos anos 80, conferindo a capacidade de bombear tetraciclina para fora do citoplasma de *Escherichia coli* (MCMURRY et al., 1980). Desde então, diversos outros sistemas de efluxo foram caracterizados em inúmeras bactérias, possibilitando o bombeamento de uma grande gama de substâncias (MUNITA; ARIAS, 2016).

Cinco famílias de bombas de efluxo são conhecidas, são elas: SMR (*Small Multidrug Resistance*), RDN (*Resistance-Nodulation-Division*), ABC (*Adenosine Triphosphate (ATP)-Binding Cassette*), MFS (*Major Facilitator Superfamily*) e MATE (*Multidrug And Toxic Compound Extrusion*), formadas por diferentes proteínas que são agrupadas de acordo com a sequência de aminoácidos que as compõem (SOUSA, 2006). Nos microrganismos Gram positivos, a família MFS é a de maior relevância, com destaque para a proteína NorA em *Staphylococcus aureus* e PmrA em *Streptococcus pneumoniae* (BLANCO et al., 2016).

A expressão dessas proteínas é determinada por genes presentes no cromossomo ou em elementos genéticos móveis. Nesse contexto, as bombas de efluxo codificadas por genes presentes no cromossomo bacteriano podem explicar a resistência inerente de algumas espécies bacterianas a grupos específicos de antimicrobianos como a resistência intrínseca de *Enterococcus faecalis* à estreptogramina A (SINGH et al., 2002).

Diversos estudos têm relatado a presença de bombas de efluxo como mecanismo de resistência em *Staphylococcus* spp., com prevalências variando de 0,9% (2/218) (KREWER et al. 2015), no Nordeste do Brasil a 70% (42/60) no Irã (HASSANZADEH et al., 2017) e, em virtude dessa variação observada, mais estudos continuam sendo estimulados para tentar esclarecer a participação desse mecanismo na resistência antimicrobiana em *Staphylococcus* spp. (LEKSHMI et al., 2018).

2.5. Métodos de Detecção de Resistência *in vitro*

2.5.1. Disco-difusão em ágar

O teste de disco-difusão é o método oficial para avaliação de resistência antimicrobiana na rotina de diversos laboratórios, sendo o CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) o responsável pela publicação da maioria dos métodos aprovados e aceitos, atualmente no mundo, para análise de bactérias e leveduras (CLSI, 2015).

Este método consiste na inoculação de microrganismos, em concentração conhecida em placas contendo ágar. Em seguida, discos de papel filtro com aproximadamente 6 mm de diâmetro, impregnados com os antimicrobianos também em concentração conhecida, são aplicados sobre a superfície do ágar. As placas são então incubadas em condições adequadas, a depender do microrganismo. Geralmente, o antimicrobiano se difunde pelo ágar, inibindo o crescimento bacteriano, sendo realizada a medição do diâmetro de inibição do crescimento. Por fim, estas medidas são comparadas aos padrões previamente determinados para classificação do microrganismo como sensível, intermediário ou resistente àquele antimicrobiano específico (JORGENSEN; FERRARO, 2009).

O teste de disco-difusão tem algumas vantagens sobre outros métodos como, simplicidade na execução, baixo custo, possibilidade de testar inúmeros microrganismos e antimicrobianos com menos trabalho e a facilidade na interpretação dos resultados. Entretanto, algumas desvantagens também são observadas, pois esta técnica permite apenas uma avaliação qualitativa e nem todos os microrganismos fastidiosos podem ser avaliados com acurácia por essa técnica (BALOUIRI et al., 2016)

2.5.2. Microdiluição em caldo

A microdiluição em caldo é um dos métodos mais básicos na avaliação da suscetibilidade antimicrobiana. O procedimento envolve a diluição seriada da droga antimicrobiana (por exemplo: 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 mg/mL, podendo variar de acordo com o ponto de corte para fármaco testado) em um meio de cultura líquido distribuído em placas de microdiluição com 96 poços. Em seguida, cada poço é inoculado com o inóculo da bactéria a ser testada, previamente preparado no mesmo meio de cultura líquido, com concentração bacteriana ajustada para 0,5 na escala de

McFarland. Posteriormente, as placas são incubadas em condições que podem variar, de acordo com o microrganismo avaliado, sendo lidas em leitor de densidade óptica após o período de incubação (CLSI, 2015).

Esta técnica permite verificar a mínima concentração antimicrobiana capaz de inibir o crescimento bacteriano (concentração inibitória mínima – CIM), sendo esta uma de suas maiores vantagens. Por outro lado, esse teste pode ser entediante, quando realizado em larga escala, demanda maiores habilidades manuais, está sujeito a erros na preparação das soluções de antimicrobianos, além de necessitar de número maior de equipamentos para a sua execução, sendo estas algumas desvantagens dessa técnica (JORGENSEN; FERRARO, 2009).

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Caracterizar os perfis genotípico e fenotípico de resistência a beta-lactâmicos e outros antimicrobianos em *Staphylococcus* spp. isolados de mastite em ruminantes do Nordeste do Brasil.

3.2. Específicos

- Isolar *Staphylococcus* spp. de amostras de leite de vacas, búfalas, cabras e ovelhas com mastite;
- Identificar bioquímica e molecularmente *Staphylococcus aureus* nas amostras de leite bovino;
- Identificar bioquímica e molecularmente *Staphylococcus* coagulase negativa nas amostras de leite das espécies bubalina, caprina e ovina;
- Caracterizar o perfil de resistência antimicrobiana dos *S. aureus* e *Staphylococcus* coagulase negativa frente a beta-lactâmicos e outros antimicrobianos;
- Caracterizar as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) de betalactâmicos frente a *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* coagulase negativa isolados;
- Verificar o índice de resistência múltipla aos antimicrobianos (IRMA) entre os *S. aureus* e *Staphylococcus* coagulase negativa isolados;
- Detectar a presença molecular do gene *blaZ* codificador da produção de betalactamase em *Staphylococcus* spp;
- Detectar a presença dos genes *mecA* e *mecC* codificadores da resistência à meticilina em *Staphylococcus* spp.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEBE, R.; HATIYA, H.; ABERA, M.; MEGERSA, B.; ASMARE, K. Bovine mastitis: Prevalence, risk factors and isolation of *Staphylococcus aureus* in dairy herds at Hawassa milk shed, South Ethiopia. **BMC Vet. Resear.**, v. 12, n. 1, p. 1–12, 2016.

ABERA, M.; DEMIE, B.; ARAGAW, K.; REGASSA, F.; REGASSA, A. Isolation and identification of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitic milk and their drug resistance patterns in Adama town , Ethiopia. **J. Vet. Med. Anim. Health**, v. 2, p. 29–34, 2010.

ACOSTA, A. C.; DA SILVA, L. B. G.; MEDEIROS, E. S.; PINHEIRO JÚNIOR, J. W.; MOTA, R. A. Mastites em ruminantes no Brasil. **Pesqui. Vet. Bras.**, v. 36, n. 7, p. 565–573, 2016.

ALI, M. A.; AHMAD, M. D.; MUHAMMAD, K.; ANJUM, A. A. Prevalence of Sub-clinical MASTitis in Dairy Buffaloes of Punjab, Pakistan. **J. Anim. Plant Sci.**, v. 21, n. 3, p. 477–480, 2011.

ALTINTOPRAK, F.; KIVILCIM, T.; OZKAN, O. V. Aetiology of idiopathic granulomatous mastitis. **World J. Clinic. Cases**, v. 2, n. 12, p. 852, 2014.

AMARAL, F.R.; CARVALHO, L.B.; BRITO, J.R.F.; SILVA, N. Qualidade do leite de búfalas: contagem de células somáticas. **Rev. Bras. Rep. Anim.**, v. 29, n. 2, p. 101-105, 2005.

ANUEYIAGU, K. N.; ISIYAKU, A. W. Isolation, identification of *Staphylococcus aureus* from bovine milk and its antibiotics susceptibility. **Int. J. Livest. Prod.**, v. 6, n. 6, p. 74–77, 2015.

ARSENAULT, J.; DUBREUIL, P.; HIGGINS, R.; BÉLANGER, D. Risk factors and impacts of clinical and subclinical mastitis in commercial meat-producing sheep flocks in Quebec, Canada. **Prev. Vet. Med.**, v. 87, n. 3–4, p. 373–393, 2008.

ASLAM, N.; IZHAR, M.; MEHDI, N. Frequency of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal colonization among patients suffering from methicillin resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia. **Pak. J. Med. Sci.**, v. 29, n. 6, p. 1430–1432, 2013.

ATTILI, A. R.; PREZIUSO, S.; NGU NGWA, V.; CANTALAMESSA, A.; MORICONI, M.; CUTERI, V. Clinical evaluation of the use of enrofloxacin against *Staphylococcus aureus* clinical mastitis in sheep. **Small Rumin. Resear.**, v. 136, p. 72–77, 2016.

AZEVEDO, S. M. M. **Farmacologia dos Antibióticos Beta-lactâmicos**. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa. Porto, Portugal, 57p. 2014.

BAGCIGIL, A. F.; TAPONEN, S.; KOORT, J.; BENGTTSSON, B.; MYLLYNIEMI, A.-L.; PYÖRÄLÄ, S. Genetic basis of penicillin resistance of *S. aureus* isolated in

- bovine mastitis. **Act. Vet. Scan.**, v. 54, n. 1, p. 69, 2012.
- BAIRD-PARKER, A. C. The Staphylococci: an introduction. **J. App. Bacteriol. Symp. Supp.**, New York, p. 1S-8S, 1990.
- BAKER, M. D.; ACHARYA, K. R. Superantigens: Structure-function relationships. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 293, n. 7–8, p. 529–537, 2004.
- BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. **J. Pharmac. Analys.**, v. 6, n. 2, p. 71–79, 2016.
- BARD, J. D.; HINDLER, J. A.; GOLD, H. S.; LIMBAGO, B. Rationale for eliminating staphylococcus breakpoints for β -lactam agents other than penicillin, oxacillin or ceftaxime, and ceftaroline. **Clinic. Infect. Dis.**, v. 58, n. 9, p. 1287–1296, 2014.
- BARILLET, F.; RUPP, R.; MIGNON-GRASTEAU, S.; ASTRUC, J.-M.; JACQUIN, M. Genetic analysis for mastitis resistance and milk somatic cell score in French Lacaune dairy sheep. **Gen. Selec. Evol.**, v. 33, n. 4, p. 397–415, 2001.
- BARLOW, J. Mastitis therapy and antimicrobial susceptibility: A multispecies review with a focus on antibiotic treatment of mastitis in dairy cattle. **J. Mamm. Gl. Biol. Neop.**, v. 16, n. 4, p. 383–407, 2011.
- BECKER, K.; DENIS, O.; ROISIN, S.; MELLMANN, A.; IDELEVICH, E. A.; KNAACK, D.; ALLEN, S. Van; SCHAUMBURG, F.; PETERS, G.; BALLHAUSEN, B. Staphylococcus aureus (MRSA) Isolates by the New Xpert MRSA Gen. **J Clin Microbiol.**, v. 54, n. 1, p. 180–184, 2016.
- BERGONIER, D.; CRÉMOUX, R.; RUPP, R.; LAGRIFFOUL, G.; BERTHELOT, X. Mastitis of dairy small ruminants. **Vet. Res.**, v. 34, p. 689–716, 2003.
- BERNARDES, O. Bubalinocultura no Brasil: situação e importância econômica. **Ver. Bras. Rep. Anim.**, v. 31, n. 3, p. 239-298, 2007.
- BERRIATUA, E.; ZILUAGA, I.; MIGUEL-VIRTO, C.; URIBARREN, P.; JUSTE, R.; LAEVENS, S.; VANDAMME, P.; GOVAN, J. R. W. Outbreak of subclinical mastitis in a flock of dairy sheep associated with Burkholderia cepacia complex infection. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, n. 3, p. 990–994, 2001.
- BI, Y.; WANG, Y. J.; QIN, Y.; VALLVERDÚ, R. G.; GARCÍA, J. M.; SUN, W.; LI, S.; CAO, Z. C. Prevalence of bovine mastitis pathogens in bulk tank milk in China. **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, p. 1–14, 2016.
- BIANCHINI, S.; DA SILVA, L. B. G.; SILVA, A. P.; LIMA, J. C. O.; FALCÃO, D. P. Frequência e etiologia da mastite caprina na região do cariri paraibano. **Med. Vet.**, v. 4, n. 1, p. 1–5, 2010.
- BIEROWIEC, K.; PŁONECZKA-JANECZKO, K.; RYPUŁA, K. Is the colonisation of Staphylococcus aureus in pets associated with their close contact with owners? **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, p. 1–14, 2016.
- BLANCO, P.; HERNANDO-AMADO, S.; REALES-CALDERON, J.; CORONA, F.; LIRA, F.; ALCALDE-RICO, M.; BERNARDINI, A.; SANCHEZ, M.; MARTINEZ, J.

Bacterial Multidrug Efflux Pumps: Much More Than Antibiotic Resistance Determinants. **Microorg.**, v. 4, n. 1, p. 14, 2016.

BOGNI, C.; ODIERNO, L.; RASPANTI, C.; GIRAUDO, J.; LARRIESTRA, A.; REINOSO, E.; LASAGNO, M.; FERRARI, M.; DUCRÓS, E.; FRIGERIO, C.; BETTERA, S.; PELLEGRINO, M.; FROLA, I.; DIESER, S.; VISSIO, C. War against mastitis: Current concepts on controlling bovine mastitis pathogens. In: Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. [s.l: s.n.], p. 483–494.

BOUARI, C.; NADAS, G. C.; FLORE, C.; RAPUNTEAN, S.; CATOI, C.; TABARAN, F. A.; GAL, A.; TAULESCU, M.; FIT, N. I. Prevalence and Antimicrobial Susceptibility Profiles of Pathogen Isolated from Bovine Mastitis Milk in Transylvania, Romania. **Bull. UASVM Vet. Med.**, v. 73, n. 2, p. 329–333, 2016.

BOULAABA, A.; GRABOWSKI, N.; KLEIN, G. Differential cell count of caprine milk by flow cytometry and microscopy. **Small Rumin. Res.** v. 97, p. 117-123, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Regulamenta a Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. Diário Oficial da União (D.O.U.), Brasília, 30 dez. 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 37, de 31 de outubro de 2000. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do leite de Cabra. Diário Oficial da União (D.O.U.). Brasília,

BRASIL. Ministério do Planejamento, Desenvolvimento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Produção da Pecuária Municipal, Rio de Janeiro, 44:1-51, 2016.

BRESSAN, M.; MARTINS, C.E.; VILELA, D. Sustentabilidade da pecuária de leite no Brasil. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite; Goiânia: CNPq/Serrana Nutrição Animal, 2000. 206p.

BRITO, J. R. F.; CALDEIRA, G. A. V.; VERNEQUE, R. D. S.; PAIVA E BRITO, M. A. V. Sensibilidade e especificidade do “California Mastitis Test” como recurso diagnóstico da mastite subclínica em relação à contagem de células somáticas. **Pesqui. Vet. Bras.**, v. 17, n. 2, p. 49–53, 1997.

BRITTEN, A. M. The role of diagnostic microbiology in mastitis control programs. **Vet. Clin. N. Ame. - Food Anim. Prac.**, v. 28, n. 2, p. 187–202, 2012.

BUENO, V. F. F.; DE MESQUITA, A. J.; DE CARVALHO DIAS FILHO, F. *Prototheca zopfii*: Importante patógeno na etiologia da mastite bovina no Brasil. **Ciênc. Anim. Bras.**, v. 7, n. 3, p. 273-283, 2006.

CAPURRO, A.; ASPÁN, A.; ARTURSSON, K.; WALLER, K. P. Genotypic variation among *Staphylococcus aureus* isolates from cases of clinical mastitis in Swedish dairy cows. **Vet. J.**, v. 185, n. 2, p. 188–192, 2010.

- CARFORA, V.; CAPRIOLI, A.; MARRI, N.; SAGRAFOLI, D.; BOSELLI, C.; GIACINTI, G.; GIANGOLINI, G.; SORBARA, L.; DOTTARELLI, S.; BATTISTI, A.; AMATISTE, S. Enterotoxin genes, enterotoxin production, and methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products in Central Italy. **Int. Dairy J.**, v. 42, p. 12–15, 2015.
- CARTAXO, F. Q.; SOUSA, W. H.; CEZAR, M. F.; COSTA, R. G.; CUNHA, M. das G. G.; NETO, S. G. Características de carcaça determinadas por ultrassonografia em tempo real e pós-abate de cordeiros terminados em confinamento com diferentes níveis de energia na dieta. **Rev. Bras. Zootec.**, v. 40, n. 1, p. 160–167, 2011.
- CARVALHO, L.B.; AMARAL, F.R.; BRITO, M.A.V.P.; LANGE, C.C.; BRITO, J.R.F.; LEITE, R.C. Contagem de células somáticas e isolamento de agentes causadores de mastite em búfalas (*Bubalus bubalis*). **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 59, n. 1, p. 242-245, 2007.
- CATOZZI, C.; SANCHEZ BONASTRE, A.; FRANCINO, O.; LECCHI, C.; DE CARLO, E.; VECCHIO, D.; MARTUCCIELLO, A.; FRAULO, P.; BRONZO, V.; CUSCÓ, A.; D'ANDREANO, S.; CECILIANI, F. The microbiota of water buffalo milk during mastitis. **PLoS ONE**, v. 12, n. 9, p. 1–20, 2017.
- CAVALCANTE, M. P.; ALZAMORA FILHO, F.; ALMEIDA, M. G. Á. R.; SILVA, N. S.; BARROS, C. G. G.; SILVA, M. C. A. Bactérias envolvidas nas mastites subclínicas de cabra da região de Salvador, Bahia. **Arq. Inst. Biol.**, v. 80, n. 1, p. 19–26, 2013.
- CERÓN-MUÑOZ, M.; TONHATI, H.; DUARTE, J.M.C. Contagem de células somáticas e produção de leite em bubalinos. **Rev. Inst. Lat. Cândido Tostes**, v.57, n.324, p.8-10, 2002
- CHAHOTA, R.; KATOCH, R.; MAHAJAN, A.; VERMA, S. Clinical bovine mastitis caused by *Geotrichum candidum*. **Vet. Archiv.**, v. 71, n. 4, p. 197-201, 2001.
- CHANG, Y.; GIANOLA, D.; HERINGSTAD, B.; KLEMATSDAL, G. Longitudinal analysis of clinical mastitis at different stages of lactation in Norwegian cattle. **Lives. Prod. Sci.**, Amsterdam, v. 8, n. 3, p. 251-261, 2004.
- CHO, O.-H.; PARK, K.-H.; SONG, J. Y.; HONG, J.; KIM, T.; HONG, S. I.; KIM, S.; BAE, I.-G. Prevalence and Microbiological Characteristics of *qacA/B*- Positive Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates in a Surgical Intensive Care Unit. **Microb. Drug Resist.**, v. 0, n. 0, 2017.
- CLEMENTS, A. C. A.; TAYLOR, D. J.; FITZPATRICK, J. L. Evaluation of diagnostic procedures for subclinical mastitis in meat-producing sheep. **J. Dairy Res.**, v. 70, n. 2, p. 139–148, 2003.
- CONSTABLE, P.D.; PYORALA, S.; SMITH, G.W. Orientações para o uso de antimicrobianos em bovinos. Guia de antimicrobianos em Veterinária, Guardabassi et al., **Artmed**, Porto Alegre, p.189-195, 2010.
- CONTRERAS, A.; SIERRA, D.; SÁNCHEZ, A.; CORRALES, J. C.; MARCO, J. C.; PAAPE, M. J.; GONZALO, C. Mastitis in small ruminants. **Small Rumin. Res.**, v. 68,

n. 1–2, p. 145–153, 2007.

CORBELLINI, L. G.; DRIEMEIER, D.; CRUZ, C.; DIAS, M. M.; FERREIRO, L. Bovine mastitis due to *Prototheca zopfii*: Clinical, epidemiological and pathological aspects in a Brazilian dairy herd. **Trop. Anim. Health Pro.**, v. 33, n. 6, p. 463-470, 2001.

COSTA, C. R. M.; FEITOSA, M. L. T.; PESSOA, G. T.; BEZERRA, D. O.; FERRAZ, M. S.; MARTINS, M. A. M. Mastite caprina: etiologia e epidemiologia: revisão de literatura. **Pubvet**, v. 7, n. 8, p. 1530, 2013.

COSTA, G. M.; PEREIRA, U. P.; SOUZA-DIAS, M. A. G.; DA SILVA, N. Yeast mastitis outbreak in a Brazilian dairy herd. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 49, n. 3, p. 239-243, 2012.

COUTINHO, D. A.; COSTA, J. N.; RIBEIRO, M. G.; TORRES, J. A. Etiologia e sensibilidade antimicrobiana in vitro de bactérias isoladas de ovelhas da raça Santa Inês com mastite subclínica. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.**, v. 7, n. 2, p. 139–151, 2006.

CUNHA, A. P.; SILVA, L. B. G.; PINHEIRO JÚNIOR, J. W.; SILVA, D. R.; OLIVEIRA, A. A. F.; SILVA, K. P. C.; MOTA, R. A. Perfil de sensibilidade antimicrobiana de agentes contagiosos e ambientais isolados de mastite clínica e subclínica de búfalas. **Arq. Inst. Biol.**, v. 73, n. 1, p.17-21, 2006.

DAIRY (2017) Cow's milk production and consumption: summary for selected countries. In: ESTADOS UNIDOS. Department of Agriculture. PSD online: production, supply and distribution. Washington, DC: USDA. Disponível em: <<http://apps.fas.usda.gov/psdonline/>> Acesso em: dez. 2017.

DAMM, M.; HOLM, C.; BLAABJERG, M.; BRO, M. N.; SCHWARZ, D. Differential somatic cell count - A novel method for routine mastitis screening in the frame of Dairy Herd Improvement testing programs. **J. Dairy Sci.**, v. 100, n. 6, p. 4926–4940, 2017.

DEB, R.; KUMAR, A.; CHAKRABORTY, S.; VERMA, A. K.; TIWARI, R.; DHAMA, K.; SINGH, U.; KUMAR, S. Trends in diagnosis and control of bovine mastitis: a review. **Pakis. J. Biol. Sci. PJBS**, 2013.

DEMME, B.; ABEGAZ, S. Isolation and Identification of Major Bacterial Pathogen from Clinical Mastitis Cow Raw Milk in Addis Ababa, Ethiopia. **Acad. J. Anim. Dis.**, v. 4, n. 1, p. 44–51, 2015.

DIAS, A. P. M.; PINHEIRO, M. G.; ALVES, F. A. Características epidemiológicas e fatores de virulência em *Staphylococcus aureus*. **Acta. Sci. Tech.**, v. 3, n. 1, p. 9-20, 2015.

DINGES, M. M.; ORWIN, P. M.; SCHLIEVERT, P. M.; DINGES, M. M.; ORWIN, P. M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 13, n. 1, p. 16–34, 2000.

DINSMORE, R.P.; ENGLISH, P.B.; GONZALEZ, R.N.; SEARS, P.M. Use of augmented cultural techniques in the diagnosis of the bacterial cause of clinical bovine mastitis. **J. Dairy Sci.**, v.75, p. 2706-2712, 1992.

DOHOO, I. R.; SMITH, J.; ANDERSEN, S.; KELTON, D. F.; GODDEN, S. Diagnosing intramammary infections: Evaluation of definitions based on a single milk sample. **J. Dairy Sci.**, v. 94, n. 1, p. 250–261, 2011b.

DOHOO, I.; ANDERSEN, S.; DINGWELL, R.; HAND, K.; KELTON, D.; LESLIE, K.; SCHUKKEN, Y.; GODDEN, S. Diagnosing intramammary infections: comparison of multiple versus single quarter milk samples for the identification of intramammary infections in lactating dairy cows. **J. Dairy Sci.**, v. 94, n. 11, p. 5515–5522, 2011a.

DOMINGUES, P. F.; LUCHEIS, S. B.; SERRÃO, L. S.; FERNANDES, S.; CONTENTE, A. P. A.; MARTINS, E. C. V.; LANGONI, H. Etiologia E Sensibilidade Bacteriana Da Mastite Subclínica Em Ovelhas Da Raça Santa Inês. **Ars. Vet.**, v. 22, n. 2, p. 146–152, 2006.

DUARTE, C. M.; FREITAS, P. P.; BEXIGA, R. Technological advances in bovine mastitis diagnosis: an overview. **J. Vet. Diag. Invest.**, v. 27, n. 6, p. 665–672, 2015.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (2002) EMBRAPA GADO DE LEITE. Importância Econômica. Sistema de Produção 4. Disponível em: <<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Leite/LeiteSudeste/importancia.html>> Acesso em: dez. 2017.

ERGÜN, Y.; ASLANTAŞ, Ö.; DOĞRUER, G.; KİREÇCİ, E. Prevalence and etiology of subclinical mastitis in Awassi dairy ewes in southern Turkey. **Most**, v. 33, n. 6, p. 477–483, 2009.

ERGÜN, Y.; ASLANTAŞ, Ö.; KİREÇCİ, E.; ÖZTÜRK, F.; CEYLAN, A.; BOYAR, Y. Antimicrobial susceptibility, presence of resistance genes and biofilm formation in coagulase negative staphylococci isolated from subclinical sheep mastitis. **Kaf. Üniv. Vet. Fak. Derg.**, v. 18, n. 3, p. 449–456, 2012.

ESCRIVÃO, S.C.; GHELLER, V.A.; NASCIMENTO, E.F.; MALM, C.; AMARAL, F.R.; SERRANO, A.L.; NÉSPOLI, P.B.; FOLTYNEK, V. Avaliação clínica, ultrassonográfica e telescópica das papilas mamárias de búfalas. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 60, n. 1, p. 25-29, 2008.

FAO – **Food and Agriculture Organization of the United Nations** (2017) Disponível em: <<http://faostat.fao.org>> Acesso em: dez. 2017.

FAO. 2014. Impact of mastitis in small scale dairy production systems. Animal Production and Health Working Paper. No. 13. **Rome**.

FEITOSA, A. C.; RODRIGUES, R. M.; ANGEL, E.; TORRES, T.; SILVA, J. F. M. *Staphylococcus aureus* em alimentos. **Rev. Desaf.** v. 4, n. 4, p. 15-31, 2017.

FLUIT, A. C. Livestock-associated *Staphylococcus aureus*. **Clin. Microbiol. Infec.**, v. 18, n. 8, p. 735–744, 2012.

FONTANA, V. L. D. da S.; GIANNINI, M. J. S. M.; LEITE, C. Q. F.; MIRANDA, E. T.; ALMEIDA, A. M. F.; FONTANA, C. A. P.; SOUZA, C. M.; STELLA, A. E. Etiologia da mastite bovina subclínica, sensibilidade dos agentes às drogas antimicrobianas e detecção dos gene da beta-lactamase em *Staphylococcus aureus*.

ISSN 0102-5716 **Vet. Zootec.**, v. 17, n. 4, p. 552–559, 2010.

FOSTER, A. P. Staphylococcal skin disease in livestock. **Vet. Dermat.**, v. 23, p. 342–63, 2012.

FRANÇA, C. A.; PEIXOTO, R. M.; CAVALCANTE, M. B.; MELO, N. F.; OLIVEIRA, C. J. B.; VESCHI, J. A.; MOTA, R. A.; COSTA, M. M.; A, A. F. C.; PEIXOTO, R. M.; CAVALCANTE, M. B.; MELO, N. F.; OLIVEIRA, C. J. B.; VESCHI, J. L. A. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. from small ruminant mastitis in Brazil. **Pesqui. Vet. Bras.**, v. 32, n. 8, p. 747–753, 2012.

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

GANDA, E. K.; BISINOTTO, R. S.; DECTER, D. H.; BICALHO, R. C. Evaluation of an on-farm culture system (Accumast) for fast identification of milk pathogens associated with clinical mastitis in dairy cows. **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, p. 1–16, 2016.

GARCÍA-ÁLVAREZ, L.; HOLDEN, M. T. G.; LINDSAY, H.; WEBB, C. R.; BROWN, D. F. J.; CURRAN, M. D.; WALPOLE, E.; BROOKS, K.; PICKARD, D. J.; TEALE, C.; PARKHILL, J.; BENTLEY, S. D.; EDWARDS, G. F.; GIRVAN, E. K.; KEARNS, A. M.; PICHON, B.; HILL, R. L. R.; LARSEN, A. R.; SKOV, R. L.; PEACOCK, S. J.; MASKELL, D. J.; HOLMES, M. A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: A descriptive study. **Lan. Infect. Dis.**, v. 11, n. 8, p. 595–603, 2011.

GARINO, F.; MATOS, R. A. T.; MIRANDA NETO, E. G.; BERNARDINO, J. N. N.; SANTOS, E. D.; AGUIAR, G. M. N. Mastite clinica caprina causada por *Arcanobacterium pyogenes*. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 64, n. 4, p. 1070–1073, 2012.

GIEDRAITIENĖ, A.; VITKAUSKIENĖ, A.; NAGINIENĖ, R.; PAVILONIS, A. Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. **Med. (Kaunas, Lithuania)**, v. 47, n. 3, p. 137–46, 2011.

GINDONIS, V.; TAPONEN, S.; MYLLYNIEMI, A. L.; PYÖRÄLÄ, S.; NYKÄSENOJA, S.; SALMENLINNA, S.; LINDHOLM, L.; RANTALA, M. Occurrence and characterization of methicillin-resistant staphylococci from bovine mastitis milk samples in Finland. **Act. Vet. Scan.**, v. 55, n. 61, p. 2-8, 2013.

GITAU, G. K.; BUNDI, R. M.; VANLEEUEWEN, J.; MULEI, C. M. Mastitogenic bacteria isolated from dairy cows in Kenya and their antimicrobial sensitivity. **J. S. Afric. Vet. Assoc.**, v. 85, n. 1, p. 1–8, 2014.

GREMA, H. A. Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): A Review. **Adv. Anim. Vet. Sci.**, v. 3, n. 2, p. 79–98, 2015.

GUIMARÃES, F. F.; LANGONI, H. Leite: alimento imprescindível, mas com riscos para a saúde pública. **Rev. Vet. Zootec.**, v. 16, n. 1, p. 38-51, 2009.

GUNAWARDANA, S.; THIKARATHNE, D.; ABEGUNAWARDANA, I.S.; ABEYNAYAKE, P.; ROBERTSON, C.; STEPHEN, C. Risk factors for bovine mastitis in the Central Province of Sri Lanka. **Trop. Anim. Health Prod.**, v. 46, n. 7, p. 1105-1012, 2014.

HAENLEIN, G. F. Goat milk in human nutrition. **Small Rumin. Res.**, v. 51, n. 2, p. 155–163, 2004.

HAENLEIN, G. F. W. Relationship of somatic cell counts in goat milk to mastitis and productivity. **Small Rumin. Res.**, v. 45, n. 2, p. 163–178, 2002.

HAGNESTAM-NIELSEN, C.; EMANUELSON, U.; BERGLUND, B.; STRANDBERG, E. Relationship between somatic cell count and milk yield in different stages of lactation. **J.Dairy Sci.**, v. 92, n. 7, p. 3124–3133, 2009.

HALASA, T.; HUIJPS, K.; ØSTERÅS, O.; HOGVEEN, H. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: A review. **Vet. Quart.**, v. 29, n. 1, p. 18–31, 2007.

HAND, K. J.; GODKIN, A.; KELTON, D. F. Milk production and somatic cell counts: A cow-level analysis. **J.Dairy Sci.**, v. 95, n. 3, p. 1358–1362, 2012.

HASSANZADEH, S.; MASHHADI, R.; YOUSEFI, M.; ASKARI, E.; SANIEI, M.; POURMAND, M. R. Frequency of efflux pump genes mediating ciprofloxacin and antiseptic resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. **Microb. Pathog.**, v. 111, p. 71–74, 2017.

HOSSEINZADEH, S.; SAEI, H. D. Staphylococcal species associated with bovine mastitis in the North West of Iran: Emerging of coagulase-negative staphylococci. **Int. J Vet. Sci. Med.**, v. 2, n. 1, p. 27–34, 2014.

HUSSAIN, R.; JAVED, M. T.; KHAN, A.; MUHAMMAD, G. Risks factors associated with subclinical mastitis in water buffaloes in Pakistan. **Trop. Anim. Health Prod.**, v. 45, n. 8, p. 1723–1729, 2013.

HUSSAIN, R.; JAVED, M.T.; KHAN, A. Changes in some biochemical parameters and somatic cell counts in the milk of buffalo and cattle suffering from mastitis. **Pak. Vet. J.**, v. 32, p. 418-421, 2012

IRAGUHA, B.; HAMUDIKUWANDA, H.; MUSHONGA, B. Bovine mastitis prevalence and associated risk factors in dairy cows in Nyagatare District, Rwanda. **J. S. Afr. Vet. Assoc.**, v. 86, p. 1228-1233, 2015.

JAEGER, S.; VIRCHOW, F.; TORGERSON, P. R.; BISCHOFF, M.; BINER, B.; HARTNACK, S.; RÜEGG, S. R. Test characteristics of milk amyloid A ELISA, somatic cell count, and bacteriological culture for detection of intramammary pathogens that cause subclinical mastitis. **J.Dairy Sci.**, v. 100, n. 9, p. 7419–7426, 2017.

JAMALI, H.; RADMEHR, B.; ISMAIL, S. Short communication: Prevalence and

antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis. **J. Dairy Sci.**, v. 97, n. 4, p. 2226–2230, 2014.

JIMÉNEZ-GRANADO, R.; SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, M.; ARCE, C.; RODRÍGUEZ-ESTÉVEZ, V. Factors affecting somatic cell count in dairy goats: a review. **Spa. J. Agric. Res.**, v. 12, n. 1, p. 18, 2014.

JINGAR, S. C.; SINGH, M.; ROY, A. K. Economic losses due to Clinical Mastitis in Cross-Bred Cows. **J. Dairy Vet. Sci.**, v. 3, n. 2, 2017.

JORGENSEN, J.H.; FERRARO, M.J. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. **Med. Microbiol. Clin. Infect. Dis.**, v. 49, p. 1749-1755, 2009.

JUHÁSZ-KASZANYITZKY, E.; JÁNOSI, S.; SOMOGYI, P.; DÁN, A.; VAN DER GRAAF-VAN BLOOIS, L.; VAN DUIJKEREN, E.; WAGENAAR, J. A. MRSA transmission between cows and humans. **Emerg. Infect. Dis.**, v.13, p. 630-632, 2007.

KANG, M. H.; CHAE, M. J.; YOON, J. W.; KIM, S. G.; LEE, S. Y.; YOO, J. H.; PARK, H. M. Antibiotic resistance and molecular characterization of ophthalmic *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from dogs. **J. Vet. Sci.**, v. 15, n. 3, p. 409–415, 2014.

KEEFE, G. Update on control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for management of mastitis. **Vet. Clin. N. Ame. - Food Animal Practice**, v. 28, n. 2, p. 203–216, 2012.

KERSCHNER, H.; HARRISON, E. M.; HARTL, R.; HOLMES, M. A.; APFALTER, P. First report of mecC MRSA in human samples from Austria: Molecular characteristics and clinical data. **New Microb. New Infect.**, v. 3, n. C, p. 4–9, 2015.

KIVARIA, F. M.; NOORDHUIZEN, J. P. T. M.; NIELEN, M. Interpretation of California mastitis test scores using *Staphylococcus aureus* culture results for screening of subclinical mastitis in low yielding smallholder dairy cows in the Dar es Salaam region of Tanzania. **Prev. Vet. Med.**, 78, p. 274–285, 2007.

KLIMIENE, I.; VIRGAILIS, M.; PAVILONIS, A.; SIUGZDINIENE, R.; MOCKELIUNAS, R.; RUZAUSKAS, M. Phenotypical and Genotypical Antimicrobial Resistance of Coagulase-negative staphylococci Isolated from Cow Mastitis. **Pol. J. Vet. Sci.**, v. 19, n. 3, p. 639–646, 2016.

KONDO, Y.; ITO, T.; MA, X.X.; WATANABE, S.; KREISWIRTH, B.N.; ETIENNE, J. Combination of multiplex PCRs for Staphylococcal Cassette Chromosome mec type assignment: rapid identification system for mec, ccr, and major differences in junkyard regions. **Antimicrob. Agents Chemot.**, v. 51, p. 264-74, 2007.

KONEMAN, E.W., ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN JUNIOR, W.C. 2008. Diagnóstico Microbiológico: texto e atlas colorido. 6th ed. **Guanabara Koogan**, Rio de Janeiro, RJ.

KOOP, G.; ISLAM, N.; RAHMAN, M.; KHATUN, M.; FERDOUS, J.; SAYEED, A.; ISLAM, S.; AHADUZZAMAN, S.; AKTER, A.; MANNAN, M.M.; HASSAN, R.

Dissanayake and A. Hoque. Risk factors and therapy for goat mastitis in a hospital-based case-control study in Bangladesh. **Prev. Vet. Med.**, v. 124, p. 52-57, 2016.

KREWER, C. C.; AMANSO, E. S.; GOUVEIA, G. V.; SOUZA, R. L.; COSTA, M. M.; MOTA, R. A. Resistance to antimicrobials and biofilm formation in *Staphylococcus* spp. isolated from bovine mastitis in the Northeast of Brazil. **Trop. Anim. Health Prod.**, v. 47, n. 3, p. 511–518, 2015.

KREWER, C. C.; IZABELA, I. P.; AMANSO, E. S.; CAVALCANTE, N. B.; DE M. PEIXOTO, R.; PINHEIRO, J. W.; DA COSTA, M. M.; MOTA, R. A. Etiology, antimicrobial susceptibility profile of *Staphylococcus* spp. and risk factors associated with bovine mastitis in the states of Bahia and pernambuco. **Pesqui. Vet. Bras.**, v. 33, n. 5, p. 601–606, 2013.

KRISHNAMOORTHY, P.; SATYANARAYANA, M. L.; SHOME, B. R. Coagulase Negative Staphylococcal Species Mastitis: An Overview. **Res. J. Vet. Sci.**, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2016.

KRISHNAMOORTHY, P.; SURESH, K. P.; SAHA, S.; GOVINDARAJ, G.; SHOME, B. R.; ROY, P. Meta-analysis of Prevalence of Subclinical and Clinical Mastitis, Major Mastitis Pathogens in Dairy Cattle in India. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.**, v. 6, n. 3, p. 1214–1234, 2017.

KULKARNI, A. G.; KALIWAL, B. Bovine mastitis: A review. **Int. J. Recent Sci. Res.**, v. 4, n. 5, p. 543-548, 2013.

KUTAR, K.; VERMA, A. K.; SHARMA, B.; KUMAR, A.; YADAV, S. K. Analysis of *mecA* gene and antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. **Ind. J. Comp. Microbiol., Immunol. Infec. Dis.**, v. 6, n. 1, p. 22-27, 2015.

LAD, S. S.; APARNATHI, K. D.; MEHTA, B.; VELPULA, S. Goat Milk in Human Nutrition and Health – A Review. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.**, v. 6, n. 5, p. 1781–1792, 2017.

LAGO, A.; GODDEN, S. M.; BEY, R.; RUEGG, P. L.; LESLIE, K. The selective treatment of clinical mastitis based on on-farm culture results: I. Effects on antibiotic use, milk withholding time, and short-term clinical and bacteriological outcomes. **J. Dairy Sci.**, v. 94, n. 9, p. 4441–4456, 2011.

LAM, T. J. G. M.; OLDE RIEKERINK, R. G. M.; SAMPIMON, O. C.; SMITH, H. Mastitis diagnostics and performance monitoring: A practical approach. **Irish Vet. J.**, v. 62, n. 4, p. 34–39, 2009.

LANGONI, H.; PENACHIO, D. S.; CITADELLA, J. C. C.; LAURINO, F.; FACCIOLI-MARTINS, P. Y.; LUCHEIS, S. B.; MENOZZI, B. D.; SILVA, A. V. Aspectos microbiológicos e de qualidade do leite bovino. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 31, n. 12, p. 1059-1065, 2011.

LAURENT, F.; CHARDON, H.; HAENNI, M.; BES, M.; REVERDY, M. E.; MADEC, J. Y.; LAGIER, E.; VANDENESCH, V.; TRISTAN, A. MRSA harboring *mecA* variant gene *mecC*, France. **Emer. Infec. Dis. J.**, v.18, n. 9, p. 1465-1467, 2012.

- LEITNER, G.; LAVON, Y.; MATZRAFI, Z.; BENUN, O.; BEZMAN, D.; MERIN, U. Somatic cell counts, chemical composition and coagulation properties of goat and sheep bulk tank milk. **Int. Dairy J.**, v. 58, p. 9–13, 2016.
- LEKSHMI, M.; AMMINI, P.; ADJEI, J.; M. SANFORD, L.; SHRESTHA, U.; KUMAR, S.; F. VARELA, M. Modulation of antimicrobial efflux pumps of the major facilitator superfamily in *Staphylococcus aureus*. **AIMS Microbiol.**, v. 4, n. 1, p. 1–18, 2018.
- LESKI, T. A.; TOMASZ, A. Role of Penicillin-Binding Protein 2 (PBP2) in the Antibiotic Susceptibility and Cell Wall Cross-Linking of *Staphylococcus aureus*. **J. Bacteriol.**, v. 2, n. 5, p. 1815–1824, 2005.
- LI, X.; MEHROTRA, M.; GHIMIRE, S.; ADEWOYE, L. β -Lactam resistance and β -lactamases in bacteria of animal origin. **Vet. Microbiol.**, v.121, n.197, p.214, 2007.
- LIBERA, A. M. M. P. D.; ARAUJO, W. P.; KITAMURA, S. S.; ROSENFELD, A. M. F.; BIRGEL, E. H. Citologia do leite de búfalas (*Bubalus bubalis*) híidas criadas no Estado de São Paulo, Brasil. **Ciênc. Rural.**, v. 34, n. 4, p. 1087–1092, 2004.
- LIM, S.; NAM, H.; JANG, G.; LEE, H.; JUNG, S.; KIM, T. Transmission and Persistence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Milk, Environment, and Workers in Dairy Cattle Farms. **Foodborne Pathog. Dis.**, v. 10, n. 8, p. 731-736, 2013.
- LINDGREN, A. K.; GUSTAFSSON, E.; PETERSSON, A. C.; MELANDER, E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with mecC: a description of 45 human cases in southern Sweden. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infec. Dis.**, v. 35, n. 6, p. 971–975, 2016.
- LIU, G. Y.; ESSEX, A.; BUCHANAN, J. T.; DATTA, V.; HOFFMAN, H. M.; BASTIAN, J. F.; FIERER, J.; NIZET, V. *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity. **J. Exper. Med.**, v. 202, n. 2, p. 209–215, 2005.
- LIVERMORE, D. M. Antibiotic resistance in *staphylococci*. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 16, n.1, p. 3-10, 2000.
- LOPES, L. O.; LACERDA, M. S.; RONDA, J. B. Controle E Profilaxia De Mastite Causada Por *Staphylococcus* Sp. Em Vacas Leiteiras: Revisão De Literatura. **Prev.**, v. 12, n. 22, p. 1–15, 2014.
- LOPES, M. A.; DEMEU, F. A.; NETO, A. F.; LAVRAS, U. F. Avaliação do impacto econômico da mastite em rebanhos bovinos leiteiros. **Arq. Inst. Biol.**, v. 79, n. 4, p. 477–483, 2012.
- LÜTHJE, P.; SCHWARZ, S. Antimicrobial resistance of coagulase-negative staphylococci from bovine subclinical mastitis with particular reference to macrolide-lincosamide resistance phenotypes and genotypes. **J. Antimicrob. Chemot.**, v. 57, n. 5, p. 966–969, 2006.
- MAJIDUDDIN, F. K.; MATERON, I. C.; PALZKILL, T. G. Molecular analysis of beta-lactamase structure and function. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 292, n. 2, p. 127–137,

2002.

MARIN, P.; ESCUDERO, E.; FERNANDEZ-VARON, E.; CARCELES, C. M.; CORRALES, J. C.; GOMEZ-MARTIN, A.; MARTINEZ, I. Fluoroquinolone susceptibility of *Staphylococcus aureus* strains isolated from caprine clinical mastitis in southeast Spain. **J. Dairy Sci.**, v. 93, n. 11, p. 5243–5245, 2010.

MAROGNA, G.; PILO, C.; VIDILI, A.; TOLA, S.; SCHIANCHI, G.; LEORI, S. G. Comparison of clinical findings, microbiological results, and farming parameters in goat herds affected by recurrent infectious mastitis. **Small Rumin. Res.**, v. 102, n. 1, p. 74–83, 2012.

MATHUR, S.; SINGH, R. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria - A review. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 105, n. 3, p. 281–295, 2005.

MCDUGALL, S.; MURDOUGH, P.; PANKEY, W.; DELANEY, C.; BARLOW, J.; SCRUTON, D. Relationships among somatic cell count, California mastitis test, impedance and bacteriological status of milk in goats and sheep in early lactation. **Small Rumin. Res.**, v. 40, n. 3, p. 245–254, 2001.

MCDUGALL, S.; SUPRÉ, K.; DE VliegHER, S.; HAESEBROUCK, F.; HUSSEIN, H.; CLAUSEN, L.; PROSSER, C. Diagnosis and treatment of subclinical mastitis in early lactation in dairy goats. **J. Dairy Sci.**, v. 93, n. 10, p. 4710–4721, 2010.

MCMURRY, L.; PETRUCCI, R. E.; LEVY, S. B. Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 77, n. 7, p. 3974–3977, 1980.

MEDEIROS, E. S.; DE FREITAS, M. F. L.; SAUKAS, T. N.; AZEVEDO, S. S.; JUNIOR, J. W. P.; BRANDESPIM, D. F.; NETO, O. L. de S.; MOTA, R. A. Risk factors associated with buffalo mastitis in the Brazilian Northeast. **Pesqui. Vet. Bras.**, v. 31, n. 6, p. 499–504, 2011a.

MEDEIROS, E. S.; FRANÇA, C. A.; KREWER, C. C.; PEIXOTO, R. M.; SOUZA JÚNIOR, A. F.; CAVALCANTE, M. B.; COSTA, M. M.; MOTA, R. A. Antimicrobial resistance of staphylococcus spp. isolates from cases of mastitis in buffalo in Brazil. **J. Vet. Diag. Inv.**, v. 23, n. 4, p. 793–796, 2011b.

MEDEIROS, E. S.; FREITAS, M. F. L.; PINHEIRO JÚNIOR, J. W.; SAUKAS, T. N.; KREWER, C. C.; SANTOS, A. S.; COSTA, M. M.; MOTA, R. A. Bubaline mastitis etiology in Northeast of Brazil. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 65, n. 6, p. 1891–1894, 2013.

MEGERSA, B.; TADESSE, C.; ABUNNA, F.; REGASSA, A.; MEKIBIB, B.; DEBELA, E. Occurrence of mastitis and associated risk factors in lactating goats under pastoral management in Borana, Southern Ethiopia. **Trop. Anim. Health Prod.**, v. 42, n. 6, p. 1249–1255, 2010.

MENDONÇA, E. C. L.; MARQUES, V. F.; MELO, D. A.; ALENCAR, T. A.; COELHO, I. S.; COELHO, S. M. O.; SOUZA, M. M. S. Caracterização fenogenotípica da resistência antimicrobiana em *Staphylococcus* spp. isolados de mastite bovina. **Pesqui. Vet. Bras.**, v. 32, n. 9, p. 859–864, 2012.

MERZ, A.; STEPHAN, R.; JOHLER, S. *Staphylococcus aureus* isolates from goat and sheep milk seem to be closely related and differ from isolates detected from bovine milk. **Front. Microbiol.**, v. 7, n. MAR, p. 1–7, 2016.

MORGANTE, M.; RANUCCI, S.; PAUSELLI, M.; BEGHELLI, D.; MENCARONI, G. Total and differential cell count by direct microscopic method on ewe milk. **Zentralbl. Vet. A.**, v. 43, n. 8, p. 451-458, 1996.

MORONI, P. C.; Rossi, S.; PISONI, G.; BRONZO, V.; CASTIGLIONI, B.; BOETTCHER, P.J. Relationships between somatic cell count and intramammary infection in buffaloes. **J. Dairy Sci.**, v. 89, n. 3, p. 98-1003, 2006.

MOTA, R. A.; DE MEDEIROS, E. S.; DOS SANTOS, M. V.; JÚNIOR, J. W. P.; MOURA, A. P. B. L.; COUTINHO, L. C. A. Participação dos *Staphylococcus* spp. na etiologia das mastites em bovinos leiteiros no estado de pernambuco (Brasil). **Ciênc. Anim. Bras.**, v. 13, n. 1, p. 124–130, 2012.

MOUSSAVI, A. H.; MESGARAN, M. D.; GILBERT, R. O. Effect of mastitis during the first lactation on production and reproduction performance of Holstein cows. **Trop. Anim. Health Prod.**, v. 44, n. 7, p. 1567-1573, 2012.

MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Microbiol. Spect.**, v. 4, n. 2, p. 1–37, 2016.

MURICY R.F. **Ocorrência de mamite subclínica em caprinos e qualidade higiênicosanitária do leite produzido em propriedades associadas à Cooperativa Languiru, Teutônia, RS.** Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. 83p. 2003.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; PFALLER, M.A. *Staphylococcus* e Cocos Gram Positivos Relacionados. In: *Microbiologia Médica*. 6ªed. Rio de Janeiro: **Mosby**; p. 209-223, 2009.

MUSTAFA, Y. S.; AWAN, F. N.; ZAMAN, T. Prevalence And Antibacterial Susceptibility In Mastitis In Buffalo And Cow In District Lahore-Pakistan. **Buff. Bull.**, v. 32, n. 4, 2013.

NAJEEB, M. F.; ANJUM, A. A.; AHMAD, M. U. D.; KHAN, H. M.; ALI, M. A.; SATTAR, M. M. K. Bacterial Etiology of Subclinical Mastitis in Dairy Goats and Multiple Drug Resistance of the Isolates. **J. Anim. Plan. Sci.**, v. 23, n. 6, p. 1541–1544, 2013.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL (NMC). **Laboratory Handbook on Bovine Mastitis**. Madison- WI, 2017, 148-p.

NEVES, P.B.; MEDEIROS, E.S.; SÁ, V.V.; CAMBOIM, E.K.A.; GARINO JR, F.; MOTA, R.A.; AZEVEDO, S.S. Perfil microbiológico, celular e fatores de risco associados à mastite subclínica em cabras no semiárido da Paraíba. **Pesqui. Vet. Bra.**, v. 30, n. 5, p. 379-384, 2010.

NUNES, G. R.; BLAGITZ, M. G.; FREITAS, C. B.; SOUZA, F. N.; RICCIARDI, M.;

STRICAGNOLO, C. R.; SANCHES, B. G. S.; SUCUPIRA, M. C. A.; DELLA LIBERA, A. M. M. P. Avaliação de indicadores inflamatórios no diagnóstico da mastite ovina. **Arq. Inst. Biol.**, v. 75, n. 3, p. 271–278, 2008.

OLDE REIKERINK, R.G.; BARKEMA, H.; KELTON, D.; SCHOLL, D. Incidence rate of clinical mastitis on Canadian dairy farms. **J. Dairy Sci.**, v. 91, p.1366-1377, 2008.

OLIVARES-PÉREZ, J.; KHOLIF, A. E.; ROJAS-HERNÁNDEZ, S.; ELGHANDOUR, M. M. M. Y.; SALEM, A. Z. M.; BASTIDA, A. Z.; VELÁZQUEZ-REYNOSO, D.; CIPRIANO-SALAZAR, M.; CAMACHO-DÍAZ, L. M.; ALONSO-FRESÁN, M. U.; DILORENZO, N. Prevalence of bovine subclinical mastitis, its etiology and diagnosis of antibiotic resistance of dairy farms in four municipalities of a tropical region of Mexico. **Trop. Anim. Health Prod.**, v. 47, n. 8, p. 1497–1504, 2015.

OLIVEIRA, A. A.; SIMÕES, T. V. M. D.; AZEVEDO, H. C.; TEIXEIRA, K. M.; MELO, P. O.; EMÍDIO, K. S.; OLIVEIRA, S. S. Monitoramento de Mastite e Determinação da Composição do Leite em Ovelhas Santa Inês de Primeiro Parto. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento - **Embrapa**, v. 66, p. 19p., 2012.

OLIVEIRA, C. M. C.; SOUSA, M. G. S.; DA SILVA E SILVA, N.; MENDONÇA, C. L.; SILVEIRA, J. A. S.; OAIGEN, R. P.; ANDRADE, S. J. T.; BARBOSA, J. D. Prevalência e etiologia da mastite bovina na bacia leiteira de Rondon do Pará, estado do Pará. **Pesqui. Vet. Bras.**, v. 31, n. 2, p. 104–110, 2011.

OLIVEIRA, C. S. F.; HOGEVEEN, H.; BOTELHO, A. M.; MAIA, P. V; COELHO, S. G.; HADDAD, J. P. A. Cow-specific risk factors for clinical mastitis in Brazilian dairy cattle. **Prev. Vet. Med.**, v. 121, p. 297–305, 2015.

OLIVEIRA, M. V.; MOTA, R. A.; OLIVEIRA, A.A.; MEIRELLES, F. S.; SILVA, F. F. Utilização do whiteside modificado e califórnia mastitis test no diagnóstico da mastite subclínica em búfalas e sua relação com o exame microbiológico. **Ciênc. Anim.**, v. 14, n. 1, p. 39–45, 2004.

OLIVER, S. P.; GILLESPIE, B.; HEADRICK, S.; MOOREHEAD, H.; LUNN, P.; DOWLEN, H.; JOHNSON, D.; LAMAR, K.; CHESTER, S.; MOSELEY, W. Efficacy of extended ceftiofur intramammary therapy for treatment of subclinical mastitis in lactating dairy cows. **J Dairy Sci.**, v. 87, n. 8, p. 2393-2400, 2004.

OLSEN, J. E.; CHRISTENSEN, H.; AARESTRUP, F. M. Diversity and evolution of blaZ from *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. **J. Antimicrob. Chemot.**, v. 57, n. 3, p. 450–460, 2006.

OSMAN, K. M.; EL-ENBAAWY, M. I.; EZZELDEEN, N. A.; HUSSEIN, H. M. G. Mastitis in dairy buffalo and cattle in Egypt due to *Clostridium perfringens*: prevalence, incidence, risk factors and costs. **Rev. Sci. Tech.** - Office International des Épizooties, v. 28, n. 3, p. 975–986, 2009.

ÖZTÜRK, H.; OZKIRIMLI, E.; ÖZGÜR, A. Classification of beta-lactamases and Penicillin Binding Proteins using ligand-centric network models. **PLoS ONE**, v. 10, n. 2, p. 1–23, 2015.

PAAPE, M. J.; WIGGANS, G. R.; BANNERMAN, D. D.; THOMAS, D. L.; SANDERS, A. H.; CONTRERAS, A.; MORONI, P.; MILLER, R. H. Monitoring goat and sheep milk somatic cell counts. **Small Rumin. Res.**, v. 68, n. 1–2, p. 114–125, 2007.

PACHAURI, S.; VARSHNEY, P.; DASH, S. K.; GUPTA, M. K. Involvement of fungal species in bovine mastitis in and around Mathura, India. **Vet. World**, v. 6, n. 7, p. 393–395, 2013.

PANCHAL, I.; SAWHNEY, I. K.; SHARMA, A. K.; DANG, A. K. Classification of healthy and mastitis Murrah buffaloes by application of neural network models using yield and milk quality parameters. **Comp. Elect. Agric.**, v. 127, p. 242–248, 2016.

PATERSON, G.K.; MORGAN, F.J.E.; HARRISON, E.M.; PEACOCK, S.J.; PARKHILL, J.; ZADOKS, R.N.; HOLMES, M.A. Prevalence and properties of mecC methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in bovine bulk tank milk in Great Britain. **J. Antimicrob. Chemo.**, v.69, p.598-602, 2014.

PEACOCK, S.J.; PATERSON, G.K. Mechanisms of MRSA resistance. **Annu. Rev. Biochem.**, v.84, p.577-601, 2015.

PEIXOTO, R. M.; ARAÚJO, R. M. P.; PEIXOTO, L. J. S.; REGES, A. M.; ALVES, A. P. P.; PINHEIRO JÚNIOR, J. W.; MOTA, R. A.; AZEVEDO, S. S.; COSTA, M. M. Indirect diagnostic tests for the detection of subclinical mastitis in dairy goats experimentally infected with *Staphylococcus aureus*. **Ciênc. Rural**, v. 46, n. 7, p. 1217–1222, 2016.

PEIXOTO, R. M.; DE FRANÇA, C. A.; DE SOUZA JÚNIOR, A. F.; VESCHI, J. L. A.; DA COSTA, M. M. Etiologia e perfil de sensibilidade antimicrobiana dos isolados bacterianos da mastite em pequenos ruminantes e concordância de técnicas empregadas no diagnóstico. **Pesqui. Vet. Bras.**, v. 30, n. 9, p. 735–740, 2010b.

PEIXOTO, R. M.; MOTA, R. A.; COSTA, M. M. Mastite em pequenos ruminantes no Brasil. **Pesqui. Vet. Bras.**, v. 30, n. 9, p. 754–762, 2010a.

PEREIRA, A. V.; LOBO, K. M. da S.; BEZERRA, D. A. C.; RODRIGUES, O. G.; ATHAYDE, A. C. R.; MOTA, R. A.; LIMA, E. Q. de; MEDEIROS, E. S. de. Perfil de sensibilidade antimicrobiana in vitro de Jurema Preta e Neem sobre amostras de *Staphylococcus* sp. isoladas de mastite em búfalas. **Arq. Inst. Biol.**, v. 76, n. 3, p. 341–346, 2009.

PEREIRA, P. F. V.; STOTZER, E. S.; PRETTO-GIORDANO, L. G.; MÜLLER, E. E.; LISBÔA, J. A. N. Fatores de risco, etiologia e aspectos clínicos da mastite em ovelhas de corte no Paraná. **Pesqui. Vet. Bras.**, v. 34, n. 1, p. 1–10, 2014.

PERES NETO, F.; ZAPPA, V. Mastite em vacas leiteiras – Revisão de literatura. **Ver. Cient. Elet. Med. Vet.**, Garça- SP, ano IX, n.16, 2011.

PERSSON, Y.; OLOFSSON, I. Direct and indirect measurement of somatic cell count as indicator of intramammary infection in dairy goats. **Acta Vet. Scand.**, v. 53, n. 1, p. 15, 2011.

- PETERS, M. D. P.; SILVEIRA, I. D. B.; FISCHER, V. Impact of subclinical and clinical mastitis on sensitivity to pain of dairy cows. **Anim.**, v. 9, n. 12, p. 2024–2028, 2015.
- PICCININI, R.; TASSI, R.; DAPRÀ, V.; PILLA, R.; FENNER, J.; CARTER, B.; ANJUM, M. F. Study of *Staphylococcus aureus* collected at slaughter from dairy cows with chronic mastitis. **J. Dairy Res.**, v. 79, n. 2, p. 249–255, 2012.
- PIZAURO, L. J. L.; SILVA, D. G.; SANTANA, A. M.; CLEMENTE, V.; LARA, G. H. B.; LISTONI, F. J. P.; VAZ, A. C. N.; VIDAL-MARTINS, A. M. C.; RIBEIRO, M. G.; FAGLIARI, J. J. Prevalence and etiology of buffalo mastitis and milk somatic cell count in dry and rainy seasons in a buffalo herd from Analândia, São Paulo State, Brazil. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 66, n. 6, p. 1703–1710, 2014.
- POPOV, L.; KOVALSKI, J.; GRANDI, G.; BAGNOLI, F.; AMIEVA, M. R. Three-dimensional human skin models to understand *Staphylococcus aureus* skin colonization and infection. **Front. Immunol.**, v. 5, p. 1–6, 2014.
- PRAX, M.; LEE, C. Y.; BERTRAM, R. An update on the molecular genetics toolbox for staphylococci. **Microbiol.**, v. 159, n. PART3, p. 421–435, 2013.
- PRICE, L. B.; STEGGER, M.; HASMAN, H.; AZIZ, M.; LARSEN, J.; ANDERSEN, S.; PEARSON, T. Adaptation and emergence of *Staphylococcus aureus* CC39: Host adaptation and emergence of methicillin resistance in livestock. **mBio**, v. 3, n. 1, p. 1–6, 2012.
- PU, W.; SU, Y.; LI, J.; LI, C.; YANG, Z.; DENG, H.; NI, C. High incidence of oxacillin susceptible mecA-positive *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA) associated with bovine mastitis in China. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, e88134, 2014.
- PUBLIC HEALTH ENGLAND. Identification of *Staphylococcus* species, *Micrococcus* species and *Rothia* species, [Nota técnica], 2014.
- PUROHIT, G. N.; GAUR, M.; SHEKHER, C. Mammary gland pathologies in the parturient buffalo. **Asian Pac. J. Rep.**, v. 3, n. 4, p. 322–336, 2014.
- RAEMY, A.; MEYLAN, M.; CASATI, S.; GAIA, V.; BERCHTOLD, B.; BOSS, R.; WYDER, A.; GRABER, H. U. Phenotypic and genotypic identification of streptococci and related bacteria isolated from bovine intramammary infections. **Acta Vet. Scand.**, v. 55, n. 53, p. 1–9, 2013.
- RAZI, K. M. A.; RAHMAN, M. B.; FLORES-GUTIÉRREZ, G. H.; RAHMAN, M. T. Prevalence of caprine subclinical mastitis in Mymensingh Area, Bangladesh and characterization of associated bacterial agents and the risk factors. **Microb. Health**, v. 1, n. 1, p. 1–5, 2012.
- REIS, C. B.M.; BARREIRO, J.; MORENO, J.; PORCIONATO, M.; SANTOS, M. Evaluation of somatic cell count thresholds to detect subclinical mastitis in Gyr cows. **J. Dairy Sci.**, v. 94, n. 9, p. 4406–4412, 2011.
- RIBEIRO, W. O.; OLIVEIRA, R. L.; MARTINS, M. L.; MARTINS, J. M.; ARCANJO, A. H. M.; ALMEIDA NETO, O. B. Enumeração de microrganismos causadores da

mastite bovina e estudo da ação de antimicrobianos. **Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, n. 1, p. 45-52, 2014.

RIGGIO, V.; PESCE, L. L.; MORREALE, S.; PORTOLANO, B. Receiver-operating characteristic curves for somatic cell scores and California mastitis test in Valle del Belice dairy sheep. **Vet. J.**, v. 196, n. 3, p. 528–532, 2013.

RISTOW, L.E.; PEREZ JÚNIOR, A.A. Coleta de material para análise laboratorial e diagnóstico da mastite. Leite Integral, Ano 3. Caderno Especial 4 – [Nota técnica] Mastite, março, 2008.

RIVAS, A. L.; QUIMBY, F. W.; BLUE, J.; COKSAYGAN, O. Longitudinal evaluation of bovine mammary gland health status by somatic cell counting, flow cytometry, and cytology. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 13, p. 399–407, 2001.

ROBERSON, J. R. Establishing treatment protocols for clinical mastitis. **Vet. Clin. N. Ame. - Food Animal Practice**, v. 19, n. 1, p. 223–234, 2003.

ROLLIN, E.; DHUYVETTER, K. C.; OVERTON, M. W. The cost of clinical mastitis in the first 30 days of lactation : An economic modeling tool. **Prev. Vet. Med.**, v. 122, n. 3, p. 257–264, 2015.

ROYSTER, E.; WAGNER, S. Treatment of Mastitis in Cattle. **Vet. Clin. N. Ame. - Food Animal Practice**, v. 31, n. 1, p. 17–46, 2015.

SÁ, M. E. P.; CUNHA, M. D. L. R. D. S. D.; ELIAS, A. O.; VICTÓRIA, C.; LANGONI, H. Importância do *Staphylococcus aureus* nas mastites subclínicas: pesquisa de enterotoxinas e toxina do choque tóxico, e a relação com a contagem de células somáticas. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 41, n. 5, p. 320–326, 2004.

SAAB, A. B.; ZAMPROGNA, T. O.; LUCAS, T. M.; MARTINI, K. C.; MELLO, P. L.; DA SILVA, A. V.; MARTINS, L. A. Prevalence and etiology of bovine mastitis in the Nova Tebas, Parana. **Semin. Cienc. Agrar.**, v. 35, n. 2, p. 835-843, 2014.

SAGLAM, A. G.; SAHIN, M.; ÇELİK, E.; ÇELEBI, Ö.; AKÇA, D.; OTLU, S. The role of staphylococci in subclinical mastitis of cows and lytic phage isolation against to *Staphylococcus aureus*. **Vet. World**, v. 10, n. 12, p. 1481–1485, 2017.

SAHIN, A.; YILDIRIM, A.; ULUTAS, Z.; UGURLUTEPE, E. The effects of stage of lactation, parity and calving season on somatic cell counts in Anatolian water buffaloes. **Ind. J. Anim. Res.**, v. 51, n. 1, p. 35–39, 2017.

SAKWINSKA, O.; GIDDEY, M.; MOREILLON, M.; MORISSET, D.; WALDVOGEL, A.; MOREILLON, P. *Staphylococcus aureus* host range and human-bovine host shift. **App. Environm. Microbiol.**, v. 77, n. 17, p. 5908–5915, 2011.

SALABERRY, S. R. S.; SAIDENBERG, A. B. S.; ZUNIGA, E.; GONSALES, F. F.; MELVILLE, P. A.; BENITES, N. R. Análise microbiológica e perfil de sensibilidade do *Staphylococcus* spp. em mastite subclínica de caprinos leiteiros. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 68, n. 2, p. 336–344, 2016.

SALVADOR, R. T.; BELTRAN, J. M. C.; ABES, N. S.; GUTIERREZ, C. A.;

- MINGALA, C. N. Short communication : prevalence and risk factors of subclinical mastitis as determined by the California mastitis test in water buffaloes (*Bubalis bubalis*) in Nueva Ecija, Philippines. **J. Dairy Sci.**, v. 95, p. 1363–1366, 2012.
- SANI, R. N.; MAHDAVI, A.; MOEZIFAR, M. Prevalence and etiology of subclinical mastitis in dairy ewes in two seasons in Semnan province, Iran. **Trop. Anim. Health Prod.**, v. 47, n. 7, p. 1249–1254, 2015.
- SANTOS, H.C. **Mastite Clínica Em Ovelhas Da Raça Santa Inês No Semi-Árido Da Paraíba**. Dissertação (Pós – Graduação em Medicina Veterinária – Ruminantes e Equídeos) - Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande. - Patos - PB: CSTR, UFCG, 2008.
- SANTOS, R.; FERNÁNDEZ, M.; CARRO, S.; ZUNINO, P. Characterisation of *Staphylococcus aureus* isolated from cases of bovine subclinical mastitis in two Uruguayan dairy farms. **Arc. Med. Vet.**, v. 46, p. 315–320, 2014.
- SARAVOLATZ, L. D.; STEIN, G. E. E JOHNSON, L. B. Ceftaroline: a novel cephalosporin with activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Clin. Infect. Dis.**, 52, pp. 1156-1163. (2011).
- SCHALM, O.W.; NOORLANDER, D.D. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. **J. Am. Vet. Med. Associat.**, v.130, p.199-204, 1957.
- SCHMIDT, T.; KOCK, M. M.; EHLERS, M. M. Diversity and antimicrobial susceptibility profiling of staphylococci isolated from bovine mastitis cases and close human contacts. **J. Dairy Sci.**, v. 98, n. 9, p. 6256–6269, 2015.
- SCHMIDT, V.; PINTO, A. T.; SCHNEIDER, R. N.; SILVA, F. F. P.; MELLO, F. A. Caracterização da mastite subclínica em caprinos produzidos em sistema orgânico no Rio Grande do Sul. **Pesqui. Vet. Bras.**, v. 29, n. 9, p. 774–778, 2009.
- SCHUKKEN, Y.; CHUFF, M.; MORONI, P.; GURJAR, A.; SANTISTEBAN, C.; WELCOME, F.; ZADOKS, R. The “ Other ” Gram-Negative Bacteria in Mastitis. **Vet. Clin. Food Anim.**, v. 28, n. 2, p. 239–256, 2012.
- SEEGERS, H.; FOURICHON, C.; BEAUDEAU, F. Review article Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. **Vet. Res.**, v. 34, p. 475–491, 2003.
- SFACIOTTE, R. P.; VIGNOTO, V. K. C.; WOSIACKI, S. R. Perfil de resistência antimicrobiana de isolados bacterianos de afecções clínicas do Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Maringá. **Rev. Ciênc. Vet. S. Púb.**, v. 1, n. 1, p. 29-38, 2014.
- SHAIKH, S.; FATIMA, J.; SHAKIL, S.; RIZVI, S. M. D.; KAMAL, M. A. Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. **Sau. J. Biol. Sci.**, v. 22, n. 1, p. 90–101, 2015.
- SHARIF, A.; MUHAMMAD, T. Prevalence of severity of mastitis in buffaloes in District Faisalabad (Pakistan). **J. Agric. Soc. Sci.**, v. 3, n. 1, p. 34-36, 2007.

SHARMA, N.; KANG, T. Y.; LEE, S. J.; KIM, J. N.; HUR, C. H.; HA, J. C.; VOHRA, V.; JEONG, D. K. Status of bovine mastitis and associated risk factors in subtropical Jeju Island, South Korea. **Trop. Anim. Health Prod.**, v. 45, p. 1829–1832, 2013.

SHARMA, N.; SINGH, N. K.; BHADWAL, M. S. Relationship of Somatic Cell Count and Mastitis: An Overview. **Asi.-Austral. J. Anim. Sci.**, v. 24, n. 3, p. 429–438, 2011.

SHORE, A. C.; COLEMAN, D. C. Staphylococcal cassette chromosome mec: Recent advances and new insights. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 303, n. 6–7, p. 350–359, 2013.

SHORE, A. C.; DEASY, E. C.; SLICKERS, P.; BRENNAN, G.; O'CONNELL, B.; MONECKE, S.; EHRLICH, R.; COLEMAN, D. C. Detection of staphylococcal cassette chromosome mec type XI carrying highly divergent *mecA*, *mecI*, *mecR1*, *bla_Z*, and *ccr* genes in human clinical isolates of clonal complex 130 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob. Agents Chemo.**, v. 55, n. 8, p. 3765–3773, 2011.

SILVA, N. da S. e; SILVEIRA, J. A. S. da; OLIVEIRA, C. M. C.; MENDONÇA, C. L.; ALBERNAZ, T. T.; GUARANÁ, E. L. S.; LIMA, D. H. S.; BARBOSA, J. D. Ocorrência de mastite em búfalas (*Bubalus bubalis*) criadas em sistema extensivo no estado do Pará, Brasil. **Biosci. J.**, v. 30, n. 5, p. 839–846, 2014.

SILVA, N. S.; SILVEIRA, J. A. S.; PINHEIRO, C. P.; SOUSA, M. G. S.; OLIVEIRA, C. M. C.; MENDONÇA, C. L.; DUARTE, M. D.; BARBOSA, J. D. Etiologia e perfil de sensibilidade de bactérias isoladas de ovelhas com mastite na região nordeste do estado do Pará. **Pesqui. Vet. Bras.**, v. 30, n. 12, p. 1043–1048, 2010.

SIMÕES, T. V. M. D.; OLIVEIRA, A. A. Mastite Bovina, Considerações e Impactos Econômicos. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros. (Documentos / Embrapa Tabuleiros Costeiros, ISSN 1678-1953; 170), **EMBRAPA**, 2012. 25 p.

SINGH, K.V.; WEINSTOCK, G.M.; MURRAY, B.E. An *Enterococcus faecalis* ABC Homologue (Lsa) Is Required for the Resistance of This Species to Clindamycin and Quinupristin-Dalfopristin. **Antimicrob. Agents Chemo.**, v. 46, n. 6, p. 1845–1850, 2002.

SINHA, M. K.; THOMBARE, N. N.; MONDAL, B. Subclinical mastitis in dairy animals: Incidence, economics, and predisposing factors. **Sci. World J.**, 2014.

SIUGZDAITE, J.; ZILINSKAS, H.; LAURINAVICIUTE, V.; BANYS, A.; RUTKAUSKAS, A. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* isolated from milk of goats with mastitis. **Vet. Zootec.**, v. 29, n. 51, 2005.

SOMMERHÄUSER, J.; KLOPPERT, B.; WOLTER, W.; ZSCHÖCK, M.; SOBIRAJ, A.; FAILING, K. The epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections from subclinical mastitis in dairy cows during a control programme. **Vet. Microbiol.**, v. 96, n. 1, p. 91–102, 2003.

SOUSA, J. C. Manual de Antibiótico Antibacterianos. **Porto**, Fundação Fernando Pessoa, 2006.

SOUZA, F. N.; BLAGITZ, M. G.; PENNA, C. F. A. M.; DELLA LIBERA, A. M. M. P.; HEINEMANN, M. B.; CERQUEIRA, M. M. O. P. Somatic cell count in small

ruminants: Friend or foe? **Small Rumin. Res.**, v. 107, n. 2–3, p. 65–75, 2012.

STEVENS, M.; PIEPERS, S.; VliegHER, S. De. Mastitis prevention and control practices and mastitis treatment strategies associated with the consumption of (critically important) antimicrobials on dairy herds in Flanders, Belgium. **J. Dairy Sci.** v. 99, p. 2896–2903, 2016.

SUAREZ, C.; GUDIOL, F. Beta-lactam antibiotics. **Enferm. Infec. Microbiol. Clin.**, 27, pp. 116-129. (2009).

SWARTZ, T.; STUDENT, P. D.; SCIENCE, D.; TECH, V. Coagulase-Negative Staphylococci and *Staphylococcus hyicus*: A Practical Summary for Controlling Mastitis. **Publication DASC-63P**. 2016.

SZWEDA, P.; SCHIELMANN, M.; FRANKOWSKA, A.; KOT, B.; ZALEWSKA, M. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis in eastern poland and analysis of susceptibility of resistant strains to alternative nonantibiotic agents: lysostaphin, nisin and polymyxin B. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 76, n. 3, p. 355-362, 2014.

TANIMOMO, B. K.; HENA, S. A.; NGBEDE, E. O.; TARHYEL, R.; OWOLEKE, O. E. Prevalence of mastitis in goat herds in some northwestern villages in Nigeria. **Sci. J. Vet. Adv.**, v. 1, n. 2, p. 52–56, 2012.

TANMAY, O.; MANJU, R.; SUSHOVAN, R.; NAMRATA, O. Prevalence of subclinical mastitis in buffaloes (*Bubalus bubalus*), in chhattisgarh, India. **Int. J. Agric.**, v. 8, n. 1, p. 9–16, 2018.

TAPONEN, S.; PYÖRÄLÄ, S. Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis-Not so different from *Staphylococcus aureus*? **Vet. Microbiol.**, v. 134, n. 1–2, p. 29–36, 2009.

TEJADA, T. S.; SILVA, D. T.; DIAS, P. A.; CONCEIÇÃO, R. C. S.; MÜLLER NETO, H.; TIMM, C. D. Mastite subclínica por *Staphylococcus coagulase negativa* em ovinos de corte. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 64, n. 4, p. 1074–1076, 2012.

TURIN, L.; PISONI, G.; GIANNINO, M. L.; ANTONINI, M.; ROSATI, S.; RUFFO, G.; MORONI, P. Correlation between milk parameters in CAEV seropositive and negative primiparous goats during an eradication program in Italian farm. **Small Rumin. Res.**, v. 57, n. 1, p. 73–79, 2005.

TURK, R. The role of oxidative stress and inflammatory response in the pathogenesis of mastitis in dairy cows. **Mljekarstvo**, v. 67, n. 2, p. 91–101, 2017.

TZORA, A.; FTHENAKIS, G. Mastitis in dairy ewes associated with *Serratia marcescens*. **Small Rumin. Res.**, v. 29, n. 1, p. 125–126, 1998.

UNNERSTAD, H. E.; BENGTSSON, B.; AF RANTZIEN, M. H.; BORJESSON, S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* containing *mecC* in Swedish dairy cows. **Acta Vet. Scan.**, v. 55, n.6, p. 46, 2013.

VAKKAMÄKI, J.; TAPONEN, S.; HEIKKILÄ, A. M.; PYÖRÄLÄ, S. Bacteriological

etiology and treatment of mastitis in Finnish dairy herds. **Acta Vet. Scan.**, v. 59, n. 33, p. 1–9, 2017.

VANDERHAEGHEN, W.; PIEPERS, S.; LEROY, F.; VAN COILLIE, E.; HAESEBROUCK, F.; DE VliegHER, S. Invited review: Effect, persistence, and virulence of coagulase-negative *Staphylococcus* species associated with ruminant udder health. **J. Dairy Sci.**, v. 97, n. 9, p. 5275–5293, 2014.

VAUTOR, E.; COCKFIELD, J.; MARECHAL, C. Le; LOIR, Y. Le; CHEVALIER, M.; ASHLEY ROBINSON, D.; THIERY, R.; LINDSAY, J. Difference in virulence between *Staphylococcus aureus* isolates causing gangrenous mastitis versus subclinical mastitis in a dairy sheep flock. **Vet. Res.**, v. 40, n. 6, 2009.

VENTOLA, C. L. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. **P & T : A peer-reviewed journal for formulary management**, v. 40, n. 4, p. 277–83, 2015.

VERÍSSIMO, C. J.; ZAFALON, L. F.; OTSUK, L. P.; NASSAR, A. F. C. Prejuízos causados pela mastite em ovelhas Santa Inês. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 77, n. 4, p. 583-591, 2010.

VIEIRA, B. C. R. LORENZONI, L. S.; SOUZA, M. H.; ALFAIATE, M. B.; XAVIER, T. M. T. Etiologia infecciosa associada à mastite subclínica em bovinos de propriedades rurais no município de Alegre-ES. **Enciclo Biosf**, v. 9, n. 16, p. 1154-1172, 2013.

VISSCHER, A.; SUPRÉ, K.; HAESEBROUCK, F.; ZADOKS, R. N.; PIESENS, V.; VAN COILLIE, E.; PIEPERS, S.; DE VliegHER, S. Further evidence for the existence of environmental and host-associated species of coagulase-negative staphylococci in dairy cattle. **Vet. Microbiol.**, v. 172, n. 3–4, p. 466–474, 2014.

WALLER, K. P.; ASPÁN, A.; NYMAN, A.; PERSSON, Y.; ANDERSSON, U. G. CNS species and antimicrobial resistance in clinical and subclinical bovine mastitis. **Vet. Microbiol.**, v. 152, n. 1–2, p. 112–116, 2011.

WEBBER, M. A.; PIDDOCK, L. J. V. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. **J. Antimicrob. Chemo.**, v. 51, n. 1, p. 9–11, 2003.

WILKE, M. S.; LOVERING, A. L. E.; STRYNADKA, N. C. β -Lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 8, p. 525-533, 2005.

WU, Z.; LI, F.; LIU, D.; XUE, H.; ZHAO, X. Novel type XII staphylococcal cassette chromosome mec harboring a new cassette chromosome recombinase, CcrC2. **Antimicrob. Agents Chemo.**, v. 59, n. 12, p. 7597–7601, 2015.

YAHIA, A.; MREZGUI, D.; HAMRAT, K.; KAIDI, R. Prevalence Of Subclinical Mastitis In The Local Goats In The Province Of Laghouat. **Bull. UASVM Vet. Med.**, v. 73, n. 2, p. 441–442, 2016.

YANG, F. L.; LI, X. S.; LIANG, X. W.; ZHANG, X. F.; QIN, G. S.; YANG, B. Z. Detection of virulence-associated genes in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis milk samples in Guangxi. **Trop. Anim. Health Prod.**, v. 44, n. 8, p. 1821–1826, 2012.

YANG, F.; WANG, Q.; WANG, X.; WANG, L.; XIAO, M.; LI, X.; LUO, J.; ZHANG, S.; LI, H. Prevalence of blaZ gene and other virulence genes in penicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis cases in Gansu, China. **Turk. J. Vet. Anim. Sci.**, v. 39, n. 5, p. 634–636, 2015.

ZADOKS, R. N.; WATTS, J. L. Species identification of coagulase-negative staphylococci: Genotyping is superior to phenotyping. **Vet. Microbiol.**, v. 134, n. 1–2, p. 20–28, 2009.

ZAFALON, L. F.; POZZI, C. R.; CAMPOS, F. P.; ARCARO, J. R. P.; SARMENTO, P.; MATARAZZO, S. V. Boas Práticas de Ordenha. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2008. 50p.

ZAFALON, L. F.; VERISSIMO, C. J.; MAMIZUKA, E. M.; MARTINS, K. B.; ALMEIDA, L. M. Estafilococos resistentes à oxacilina isolados em casos de mastite subclínica em ovinos. **Arq. Inst. Biol.**, v. 79, n. 1, p. 1–7, 2012.

ZHANG, L.; SUN, L.; WEI, R.; GAO, Q.; HE, T.; XU, C.; LIU, X.; WANG, R. Study of intracellular *Staphylococcus aureus* control by virulent bacteriophage within MAC-T bovine mammary epithelial cells. **Antimicrob. Agents Chemo.**, n. December, p. AAC.01990-16, 2016.

ZHAO, Y.; LIU, H.; ZHAO, X.; GAO, Y.; ZHANG, M.; CHEN, D. Prevalence and pathogens of subclinical mastitis in dairy goats in China. **Trop. Anim. Health Prod.**, v. 47, n. 2, p. 429–435, 2015.

ZHOU, Y.; REN, Y.; FAN, C.; SHAO, H.; ZHANG, Z.; MAO, W.; WEI, C.; NI, H.; ZHU, Z.; HOU, X.; PIAO, F.; CUI, Y. Survey of mycotic mastitis in dairy cows from Heilongjiang Province, China. **Trop. Anim. Health Prod.**, v. 45, n. 8, p.1709-1714, 2013.

CAPÍTULO 1

**High frequency of beta-lactam resistance among *Staphylococcus aureus* isolated
from bovine mastitis in Northeast of Brazil**

(Submetido ao periódico Microbial Drug Resistance)

High frequency of beta-lactam resistance among *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Northeast of Brazil

ABSTRACT

Beta-lactams are antimicrobials commonly used in the treatment of bovine mastitis caused by *Staphylococcus aureus*. Resistance to beta-lactams may occur through mechanisms such as beta-lactamases production, alteration of the antimicrobial target or reduction in the amount of the antimicrobial that reaches the target caused by decrease permeability or by an exit increase. The objective of this study was to evaluate the resistance profile of *Staphylococcus aureus* isolated from mastitis in Northeastern Brazil against beta-lactam and other antimicrobials. A total of 161 strains of *Staphylococcus aureus* isolated from milk samples with mastitis were analyzed. 68.9% (111/161) of *S. aureus* were positive for the blaZ gene, while mecA and mecC genes were not detected. The highest rates of antimicrobial resistance occurred for amoxicillin, ampicillin and penicillin with 77.6% (125/161), 67.7% (109/161) and 64.6% (104/161), respectively, in the disk-diffusion technique. Amoxicillin had 91.3% (147/161) of resistance in minimal inhibitory concentration detection and 9.3% (15/161) of *S. aureus* were multidrug resistant. It is concluded that there is a high prevalence of beta-lactam resistant *S. aureus* in the Northeast region of Brazil, and the blaZ gene is the main inducer of resistance to this antimicrobial class. These levels of antimicrobial resistance should be considered as an alert to animal and human health.

Key words: multidrug resistance, blaZ, betalactamase, milk.

INTRODUCTION

Mastitis is a plurietiological and multifactorial disease of the mammary gland, responsible for considerable damages to the properties with creations directed to milk production and to the dairy industry, as much for the expenses with control and prophylaxis, as for the decrease in quantity, quality and industrial yield of the milk produced.¹

Main microorganisms involved in the infectious etiology of bovine mastitis are those of contagious origin, especially bacteria of the genus *Staphylococcus* spp., because they have high frequency in the world herds and are difficult to treat due to the high antimicrobial resistance and the presence of several mechanisms of virulence.² *Staphylococcus aureus* is the most important bacteria in the etiology of this disease, found in both clinical and subclinical cases,³ and has an impact on public health due to its capacity to cause food poisoning and to transfer antimicrobial resistance.⁴

Prophylactic or therapeutic use of antibiotic in mastitis is one of the main reasons for the use of antimicrobials in dairy herds,⁵ and beta-lactams are the most frequently used antimicrobials in dairy cattle. As a result, worrying rates of resistance to this antimicrobial class are observed in microorganisms involved in mastitis.⁶

Considering the importance of *Staphylococcus aureus* as mastitis cause in cows and its impact on the milk production chain in Northeast region of Brazil, aimed to study the resistance profile of this bacterium to beta-lactams.

MATERIAL AND METHODS

Ethical approval

This study was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA) of the Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE), Recife, Brazil (License No. 079/2014).

Bacterial isolates

A total of 936 cow milk samples, from 25 farms, located in the states of Alagoas, Bahia, and Pernambuco, Northeast of Brazil, were analyzed. Milk samples with California Mastitis Test (CMT) $\geq 1+$ or positive samples in the screened cup test, 538 in total, were plated in 5% sheep blood agar and incubated at 37°C for 24 to 48 hours. Afterwards, a presumptive classification of *S. aureus* based on colony morphology, dyeing characteristics in the Gram technique and biochemical tests such as DNase production, catalase, coagulase and mannitol fermentation was performed.⁷

Genomic DNA extraction and Polymerase Chain Reaction (PCR)

Isolates classified as *S. aureus* in the biochemical tests had the genomic DNA extracted from 1mL of culture grown in BHI broth (Brain Heart Infusion) using the Wizard Kit SV Genomic DNA Purification System (Promega® - Madison, Wisconsin, USA), according to the manufacturer's instructions. For molecular confirmation of isolates such as *Staphylococcus aureus*, PCR was performed for amplification of the nuc gene, specific for *S. aureus*, and then for the blaZ gene encoding betalactamases, in addition to mecA and mecC genes, inducers of alteration of the antimicrobial target.

Reactions were assembled separately for each gene in a final volume of 15µL per well, containing 100ng DNA template, 10pmol of each oligonucleotide (Tab.1), Taq buffer (10mM Tris, 50mM KCl, 2.5mM MgCl₂), 200mM dNTPs and 1U Taq DNA polymerase (Cenbiot, Taq DNA polymerase, Ludwig Biotec, Porto Alegre, RS, Brazil). Thermal profiles of the amplifications was 4 min. at 94 °C, followed by 32 cycles of denaturation at 94 °C for 30 sec., annealing at 65 °C for 30 sec. (nuc gene), 50.5 °C for 30 sec. (blaZ gene) or 55 °C (mecA and mecC genes) and extended at 72 °C for 30 sec, with final extension at 72 °C for 5 min. Then 10µL of each reaction was electrophoresed for 40 minutes at 100V in 1.5% agarose gel stained with BlueGreen, visualized and photo documented under ultraviolet light.

Antimicrobial susceptibility test

In vitro antimicrobial resistance was determined by disc-diffusion method for the following drugs: amoxicillin (30µg), ampicillin (10µg), cefotaxime (30µg), ceftiofur (30µg), ceftriaxone (30µg), gentamicin (10µg), norfloxacin (10µg), oxacillin (1µg), penicillin G (10U), sulfazotrim (23.75/1.25µg), tetracycline (30µg) and vancomycin

(30µg). Multiple antimicrobial resistance (MAR) index was calculated according to literature.¹² Minimum inhibitory concentration (MIC) for antimicrobials (amoxicillin, cephalixin, cefotaxime, ceftriaxone and oxacillin) was also detected according to CLSI.¹³

Statistical analysis

Statistical differences in antimicrobial resistance frequencies were calculated using the Fisher Exact test ($p \leq 0.05$) (Epi Info™, version 7.2). For the other analyzes, descriptive statistics were used, calculating the absolute and relative frequencies of the results.¹⁴

RESULTS

A total of 298 *Staphylococcus* spp. were recovered from the 538 cultivated samples, of which 161 (54.0%) had a presumptive classification of *Staphylococcus aureus* in the biochemical tests and 100% of them (161/161) were confirmed in the molecular test (nuc gene) (Fig.1).

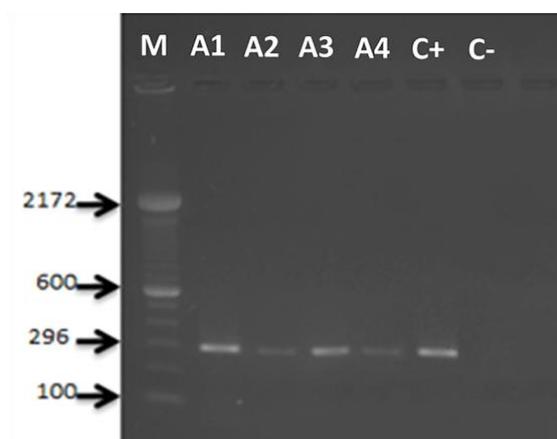


Figure 1: Amplification of nuc gene fragment in *S. aureus* isolated from cow's milk with mastitis. **Column M:** 100pb molecular weight marker; **Columns A1 to A4:** Samples tested; **Column C+:** Positive control; **Column C-:** Negative control.

BlaZ gene (Fig. 2) was detected in 68.9% (111/161) of the *S. aureus* isolates and the mecA and mecC genes were not detected in any of the isolates tested.

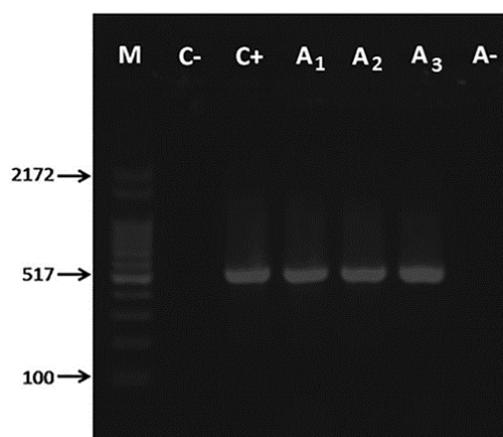


Figure 2: Amplification of blaZ gene fragment in *S. aureus* isolated from cow's milk with mastitis. **Column M:** 100pb molecular weight marker; **Column C-:** Negative control; **Column C+:** Positive control; **Columns A₁ to A₃:** Samples tested with positive result; **Column A-:** Sample tested with negative result.

Percentage of resistance in the *S. aureus* disc-diffusion technique for the tested antimicrobials is shown in table 2.

There was a significant difference between the antimicrobial resistance indexes per group, especially amoxicillin, ampicillin and penicillin, belonging to the beta-lactam group, compared with norfloxacin (fluoroquinolones), gentamicin (aminoglycosides), vancomycin (glycopeptides) and sulfazotrim ($p < 0.05$). There was no statistical difference between the representatives of beta-lactams and tetracycline (tetracyclines) ($p \geq 0.05$).

Multiple antimicrobial resistance (MAR) index ranged from 0 to 0.6 among the isolates, 9.3% (15/161) of which were considered multidrug resistant, while 26.7% (43/161) of the strains were sensitive to all the drugs tested.

Minimum inhibitory concentration (MIC) showed that amoxicillin had a higher resistance index, 91.3% (147/161) were resistant to this drug, requiring at least 128 $\mu\text{g/mL}$ of this drug to have antimicrobial action, while the cutoff point is 8 $\mu\text{g/mL}$. Cephalexin was ineffective for 39.1% (63/161) of *S. aureus*, followed by ceftriaxone with 20.5% (33/161), oxacillin with 18.6% (30/161), and cefotaxime with 7.5% (12/161).

DISCUSSION

These data include the most extensive study on the antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* to beta-lactams, fluoroquinolones, sulfonamides, tetracyclines, aminoglycosides and glycopeptides in Alagoas, Bahia, and Pernambuco states, and they are widely used in the treatment of bacterial diseases in ruminants, including mastitis.

Staphylococcus aureus were identified by biochemical and molecular tests in 29.9% (161/538) of the cultivated samples. This finding is similar to that described in the

worldwide literature on the etiology of mastitis.¹⁵⁻¹⁷ Studies in Brazil have shown that the frequency of *S. aureus* in bovine mastitis can vary between 3.2% and 70.9%.^{18, 19} In Northeast of Brazil, where this study was conducted, the dry climate prevails most of the year, mainly in the municipalities where the milk basins are located. According to researchers, the dry climate may favor the prevalence of contagious agents in mastitis.³ In addition, *S. aureus* as well as other contagious microorganisms are generally found in the udder and on the surface of the infected cows' teat, which is the primary source of infection for healthy animals, which usually occurs during milking.²⁰ High prevalence of *S. aureus* has been associated with the absence of pre- and post-dipping, washing and disinfection of the hands of milkers and equipment between milking and non-discarding of cows with chronic mastitis.²¹

High in vitro resistance rates of *S. aureus* to amoxicillin, penicillin and ampicillin were observed in this study, limiting the indication of these antimicrobials in the treatment of mastitis in this region. These data are in agreement with those described in the Brazilian literature²²⁻²⁵ and worldwide.^{5,8,26} The constant and unaddicted use of these antimicrobials in dairy herds from the studied region has also been reported in other countries in world.^{26,27} In this region, beta-lactams (amoxicillin, ampicillin and penicillin) are widely used in the intramammary or systemic treatment of mastitis and other infectious diseases without sensitivity tests.² This strongly contributes to the high rates of resistance to these antimicrobials through various mechanisms such as efflux pump, alteration of target drug in the microorganism, and degradation or modification of drug molecules by enzymes.²⁸ These mechanisms are conferred by genes that can be acquired by horizontal transfer or by spontaneous mutation,^{29,30} being the populations, carriers and resistant, selected through selection pressure, mainly by antimicrobial sub-dosages.³¹ Often, the choice by the cattle rancher of the antimicrobials used in the herd is made without laboratory support such as lactoculture and antibiogram, considering only the cost of the drug and the period of discarding the milk after treatment.³² To reduce the negative impact of antimicrobial use in dairy herds, it is important to obtain guidance from the veterinary service with a technical and judicious basis to reduce the multiplication of resistant microorganisms.

On the other hand, considering the high efficacy observed in vitro for antimicrobials: sulfazotrim, gentamicin, cefoxitin and norfloxacin compared to *S. aureus* strains analyzed, these may be indicated as an alternative for the treatment of intramammary infections in the herds of this region.

Based on MAR, which in this study ranged from 0 to 0.6, multidrug resistance observed among *S. aureus* isolates was 9.3% (15/161), being smaller than the results obtained by Nader Filho²³, Ribeiro³³ and Krewer²⁵ who reported 48.6%, 39.6% and 65.6% of multidrug resistance, respectively. Although the multidrug resistance rate observed is relatively low, determining antimicrobial sensitivity profiles favors the rational control of mastitis, allowing the selection of drugs more appropriate for the treatment of mastitis and reducing the selection pressure of the microorganisms involved.³⁴

High amoxicillin resistance (91.3%) detected in the minimal inhibitory concentration technique reinforced the results obtained in the disk-diffusion technique, in addition to dimensioning the resistance intensity, where a high tolerance of *S. aureus* strains was observed for this antimicrobial base. Although all drugs tested in the MIC are beta-lactams, the mechanisms of resistance involved may vary according to the genetic characteristics of the microorganism, so susceptibility to different beta-lactams may also vary.³⁵ In this case, resistance to amoxicillin is associated with beta-lactamases production, which is the same mechanism observed in penicillin-resistant strains, while resistance to oxacillin, ceftriaxone and cefotaxime would be related to the modification of the penicillin binding protein (PBP), a mechanism present in methicillin-resistant strains (MRSA).^{36,37}

Although the disk-diffusion method is the routine test used to determine susceptibility to antimicrobials, cutoff points for this methodology are based on serum drug concentration,¹³ and there may be variations between the concentration of circulating antimicrobial and in the sites of action, where these drugs may be more, or less concentrated.³⁸ In the case of intramammary application, the mammary gland can concentrate the antimicrobial and, with this, the minimum inhibitory concentration (MIC) may be reached at this site. Therefore, many microorganisms considered resistant in the antibiogram may respond to the intramammary treatment of mastitis.³⁹ To confirm this hypothesis, studies are needed to assess MIC in association with the pharmacokinetics and pharmacodynamics of antimicrobials in the mammary gland.

Presence of the blaZ gene in 68.9% (111/161) analyzed *S. aureus* is compatible with the proportion of isolates resistant to ampicillin and penicillin, which were 67.7 and 64.6% respectively. According to researchers,⁴⁰ in Gram positive bacteria, the production of beta-lactamase enzyme occurs only in the presence of inducers such as penicillin, which is generally observed in bovine herds studied because they are exposed to antimicrobials more frequently due to the management intensive, exerting selection pressure for resistant microorganisms.

Use of penicillin in the treatment of infections caused by *Staphylococcus aureus* is in disuse in human and veterinary medicine due to the high frequency of resistant isolates for many decades, especially in animal species of production.^{2,8,22,40} However, the empirical and constant use of this drug is still a reality in many dairy herds,⁴¹ and constant monitoring of the circulating strains should be maintained in addition to dose and treatment period attention, avoiding sub-dosages.

Absence of *S. aureus* strains carrying the mecA and mecC genes in this study differs from studies in other countries that have demonstrated the presence of these genes in *S. aureus* isolates from bovine mastitis.⁴²⁻⁴⁵ This absence of mecA and mecC genes reinforces the participation of the blaZ gene in the beta-lactam resistance mechanism verified in this study, once a high production of betalactamases may lead to oxacillin resistance in strains of *Staphylococcus* spp.⁴⁶

Studies of this nature have a great impact on national livestock, as they contribute to the planning of control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in herds,

which would make them reservoirs of antimicrobial resistance genes with risk of transmission to humans, in addition to making it increasingly difficult to treat intramammary infections.

CONCLUSION

Results obtained in this study demonstrate that bacteria of the genus *Staphylococcus* spp. have great importance in the epidemiology of bovine mastitis in this region, with emphasis on *S. aureus*. Profile of beta-lactam resistance among *S. aureus*. from this region is due the expression of blaZ gene, determining betalactamase production. Levels of beta-lactam resistance observed alert to the risk of transmission of these microorganisms to humans. It is recommended the constant monitoring of circulating microorganisms, as well as the choice and judicious use of antimicrobial drugs to control mastitis, avoiding the selection of resistant bacteria.

REFERENCES

1. Le Maréchal, C., R. Thiéry, E. Vautor, and Le Loir. 2011. Mastitis impact on technological properties of milk and quality of milk products: a review. *Dairy Sci Technol.* 91:247-282.
2. Acosta, A.C., L.B.G. Silva, E.S. Medeiros, J.W. Pinheiro Júnior, and R.A. Mota. 2016. [Mastitis in ruminants in Brazil.] *Mastites em ruminantes no Brasil. Pesq Vet Bra.* 36:565-573.
3. Mota, R.A., E.S. Medeiros, M.V. Santos, J.W. Pinheiro-Júnior, A.P.B.L. Moura, and L.C.A. Coutinho. 2012. Participação dos *Staphylococcus* spp. na etiologia das mastites em bovinos leiteiros no estado de Pernambuco (Brasil). *Ciênc Anim Bras.* 13:124-130.
4. Peacock, S.J., and G.K. Paterson. 2015. Mechanisms of MRSA resistance. *Annu Rev Biochem.* 84:577-601.
5. Saini, V., J.T. McClure, D. Léger, G.P. Keefe, D.T. Scholl, D.W. Worck, and H.W. Barkema. 2012. Antimicrobial use on Canadian dairy farms. *J Dairy Sci.* 95:1209-1221.

6. Paterson, G.K., F.J.E. Morgan, E.M. Harrison, S.J. Peacock, J. Parkhill, R.N. Zadoks, and M.A. Holmes. 2014. Prevalence and properties of *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in bovine bulk tank milk in Great Britain. *J Antimicrob Chemo.* 69:598-602.
7. Koneman, E.W., S.D. Allen, W.M. Janda, P.C. Schreckenberger, and W.C. Winn Junior. 2008. *Diagnóstico Microbiológico: texto e atlas colorido*. 6th ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ.
8. Kateete, D.P., U. Kabugo, H. Baluku, L. Nyakarahuka, S. Kyobe, M. Okee, C.F. Najjuka, and M.L. Joloba. 2013. Prevalence and Antimicrobial Susceptibility Patterns of Bacteria from Milkmen and Cows with Clinical Mastitis in and around Kampala, Uganda. *Plos ONE.* 8:1-12.
9. Sawant, A.A., B.E. Gillespie, and S.P. Oliver. 2009. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative *Staphylococcus* species isolated from bovine milk. *Vet Microbiol.* 134:73-81.
10. Nakagawa, S., I. Taneike, D. Mimura, N. Iwakura, T. Nakayama, T. Emura, M. Katatsuji, A. Fujimoto, and T. Yamamoto. 2005. Gene sequences and specific detection for Pantón-Valentine leukocidin. *Bioch Biophy Res Commun.* 328:995-1002.
11. Paterson, G.K., A.R. Larsen, A. Robb, G.E. Edwards, T.W. Pennycott, G. Foster, D. Mot, K. Hermans, K. Baet, S.J. Peacock, J. Parkhill, R.N. Zadoks, and M.A. Holmes. 2012. The newly described *mecA* homologue, *mecALGA251*, is present in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from a diverse range of host species. *J Antimicrob Chemother.* 67:2809-2813.
12. Krumperman, P.H. 1983. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. *Appl Environ Microbiol.* 46:165-170.

13. CLSI. 2015. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. CLSI document M100-S25. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
14. Sampaio, I.B.M. 2002. Estatística aplicada à experimentação animal. 1st ed. Fundação de ensino e pesquisa em medicina veterinária e zootecnia, Belo Horizonte, MG.
15. Gitau, G.K.; R.M. Bundi, J. Vanleeuwen, and C.M. Mulei. 2014. Mastitogenic bacteria isolated from dairy cows in Kenya and their antimicrobial sensitivity. J South African Vet Assoc. 85:8p.
16. El-Ashker, M., M. Gwida, H. Tomaso, S. Monecke, R. Ehricht, F. El-Gohary, and H. Hotze. 2015. Staphylococci in cattle and buffaloes with mastitis in Dakahlia Governorate, Egypt. J Dair Sci. 98:7450-7459.
17. Saglam, A.G., M. Sahin, E. Çelik, Ö. Çelebi, D. Akça, and S. Otlu. 2017. The role of staphylococci in subclinical mastitis of cows and lytic phage isolation against to *Staphylococcus aureus*. Vet Worl. 10:1481-1485.
18. Zanette, E., D. Scapin, and E.M. Rossi. 2010. Suscetibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite de bovinos com suspeita de mastite. Unoesc & Ciência – ACBS. 1:65-70.
19. Castelani, L., A.F.S. Santos, and M.S. Miranda. 2013. Molecular Typing of Mastitis-Causing *Staphylococcus aureus* Isolated from Heifers and Cows. Int J Mol Sci. 14:4326-4333.
20. Abebe, R., H. Hatiya, M. Abera, B. Megersa, and K. Asmare. 2016. Bovine mastitis: prevalence, risk factors and isolation of *Staphylococcus aureus* in dairy herds at Hawassa milk shed, South Ethiopia. BMC Vet Res. 12:1-11.

21. Bi, Y., Y.J. Wang, Y. Qin, R.G. Vallverdú, J.M. García, W. Sun, S. Li, and Z. Cao. 2016. Prevalence of Bovine Mastitis Pathogens in Bulk Tank Milk in China. *PLoS ONE*. 11:1-13.
22. Freitas, M.F.L., J.W. Pinheiro Júnior, T.L.M. Stamford, S.S.A. Rabelo, D.R. Silva, V.M. Silveira Filho, F.G.B. Santos, M.J. Sena, and R.A. Mota. 2005. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus* coagulase positivos isolados de leite de vacas com mastite no agreste do estado de Pernambuco. *Arq Inst Biol*. 72:171-177.
23. Nader Filho, A., L.M. Ferreira, L.A. Amaral, O.D. Rossi Júnior, and R.P. Oliveira. 2007. Sensibilidade antimicrobiana dos *Staphylococcus aureus* isolados no leite de vacas com mastite. *Arqs Inst Biol*. 74:1-4.
24. Medeiros, E.S., R.A. Mota, M.V. Santos, M.F.L. Freitas, J.W. Pinheiro Júnior, and J.A.A. Teles. 2009. Sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus* spp. isoladas do leite de vacas com mastite subclínica. *Pesq Vet Bras*. 29:569-574.
25. Krewer, C.C., I.P.S. Lacerda, E.S. Amanso, N.B. Cavalcante, R.M. Peixoto, J.W. Pinheiro Júnior, M.M. Costa, and R.A. Mota. 2013. Etiology, antimicrobial susceptibility profile of *Staphylococcus* spp. and risk factors associated with bovine mastitis in the states of Bahia and Pernambuco. *Pesq Vet Bras*. 33:601-606.
26. Belmamoun, A.R., K.B. Reguig, S. Bouazza, and M.M. Dif. 2016. Subclinical mastitis on the raw milk as a risk factor for the transmission of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci, multidrug resistance in Sidi. *Adv Environm Biol*. 10:1-11.
27. Saini, V., J.T. McClure, and D. Léger. 2012. Antimicrobial use on Canadian dairy farms. *J Dairy Sci*. 95:1209-1221.
28. Oz, T., A. Guvenek, S. Yildiz, E. Karabogha, Y.T. Tamer, N. Mumcuyan, V.B. Ozan, G.H. Senturk, M. Cokol, P. Yeh, and E. Toprak. 2014. Strength of Selection

- Pressure Is an Important Parameter Contributing to the Complexity of Antibiotic Resistance Evolution. *Mol Boil Evol.* 31:2387-2401.
29. Davies, J., and D. Davies. 2010. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Mic Mol Biol Rev.* 74:417-433.
30. Martinez, J.L. 2012. Natural antibiotic resistance and contamination by antibiotic resistance determinants: the two ages in the evolution of resistance to antimicrobials. *Front Mic.* 3:1-3.
31. Gullberg, E., L.M. Albrecht, C. Karlsson, L. Sandegren, and D.A. Andersson. 2014. Selection of a multidrug resistance plasmid by sublethal levels of antibiotics and heavy metals. *mBio.* 5:1-9.
32. Mcdougall, S., C. Compton, and N. Botha. 2016. Factors influencing antimicrobial prescribing by veterinarians and usage by dairy farmers in New Zealand. *N Z Vet J.* 2:1-9.
33. Ribeiro, M.G., J.S. Geraldo, H. Langoni, G.H.B. Lara, A.K. Siqueira, T. Salerno, and M.C. Fernandes. 2009. Microrganismos patogênicos, celularidade e resíduos de antimicrobianos no leite bovino produzido no sistema orgânico. *Pesq Vet Bras.* 29:52-58.
34. Jamali, H., B. Radmehr, and S. Ismail. 2014. Short communication: prevalence and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis. *J Dair Sci.* 97:2226-2230.
35. Malachowa, N., and F.R. Deleo. 2010. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. *Cell Mol Life Sci.* 67:3057-3071.
36. El Feghaly, R.E., J.E. Stamm, S.A. Fritz, and C.A. Burnham. 2012. Presence of the bla_Z beta-lactamase gene in isolates of *Staphylococcus aureus* that appear penicillin susceptible by conventional phenotypic methods. *Diag Microb Infect Dis.* 74:388-393.

37. Argudín, M.A., A. Deplano, A. Meghraoui, M. Dodémont, A. Heinrichs, O. Denis, C. Nonhoff, and S. Roisin. 2017. Bacteria from Animals as a Pool of Antimicrobial Resistance Genes. *Antib.* 6:12.
38. Frimodt-Moller, N. 2002. Correlation between pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters and efficacy for antibiotics in the treatment of urinary tract infection. *Inter J Antimic Agents.* 19:546-553.
39. Erskine, R.J., S. Wagner, and F.J., Degraives. 2003. Mastitis therapy and pharmacology. *Vet Clin Food Anim.* 19:109-138.
40. Ruegg, P.L., L. Oliveira, W. Jin, and O. Okwumabua. 2015. Phenotypic antimicrobial susceptibility and occurrence of selected resistance genes in gram-positive mastitis pathogens isolated from Wisconsin dairy cows. *J Dairy Sci.* 98:4521-4534.
41. Barlow, J. 2011. Mastitis Therapy and Antimicrobial Susceptibility: a Multispecies Review with a Focus on Antibiotic Treatment of Mastitis in Dairy Cattle. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 16:383-407.
42. Laurent, F., H. Chardon, M. Haenni, M. Bes, M.E. Reverdy, J.Y. Madec, E. Lagier, F. Vandenesch, and A. Tristan. 2012. MRSA Harboring mecA Variant Gene mecC, France. *Emerg Infec Dis.* 18:1465-1467.
43. Haenni, M., P. Châtre, J. Tasse, N. Nowak, M. Bes, J.Y. Madec, and F. Laurent. 2014. Geographical clustering of mecC-positive *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis in France. *J Antimicrob Chemother.* 69:2292-2297.
44. Pajic, M.J., Z.B. Rasic, Z.B. Velebit, S.F. Bobos, M.M. Mihajlović-Ukropina, M.Z. Radinović, A.L. Galfi, J.M. Petković, and S.I. Trojačanec. 2014. The prevalence of methicillin resistance and Panton-Valentine leukocidin synthesis genes in *Staphylococcus aureus* isolates of bovine and human origin. *Vet Archiv.* 84:205-214.

45. Mistry, H., P. Sharma, S. Mahato, R. Saravanan, P.A. Kumar, and V. Bhandari. 2016. Prevalence and Characterization of Oxacillin Susceptible *mecA* Positive Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus* Causing Bovine Mastitis in India. PLoS ONE. 11:1-10.
46. Soares, L.C., I.A. Pereira, B.R. Pribul, M.S. Oliveira, S.M.O. Coelho, and M.M.S. Souza. 2012. Antimicrobial resistance and detection of *mecA* and *blaZ* genes in coagulase-negative *Staphylococcus* isolated from bovine mastitis. Pesq Vet Bras. 32:692-696.

Table 1: Oligonucleotides sequences and sizes of the amplified fragments, in base pairs (bp), used in this study

Oligonucleotide	Sequence (5'-3')	Amplicon (bp)
nuc ⁸	F-GCGATTGATGGTGATACGGTT R-AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC	279
blaZ ⁹	F-AAGAGATTTGCCTATGCTTC R-GCTTGACCACTTTTATCAGC	517
mecA ¹⁰	F-TGGTATGTGGAAGTTAGATTGGGAT R-CTAATCTCATATGTGTTCTGTATTGGC	155
mecC ¹¹	F-CATTAATAATCAGAGCGAGGC R-TGGCTGAACCCATTTTTGAT	188

Table 2. Percentage of antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from mastitis in cows of Alagoas, Bahia and Pernambuco, Brazil, by disc-diffusion technique

<i>S. aureus</i> (n=161)	
Amoxicillin (30µg)	125 (77,6%)
Ampicillin (10µg)	109 (67,7%)
Penicillin G (10U)	104 (64,6%)
Tetracycline (30µg)	24 (14,9%)
Ceftriaxone (30µg)	12 (7,5%)
Oxacillin (1µg)	11 (6,8%)
Cefotaxime (30µg)	7 (4,3%)
Cefoxitin (30µg)	2 (1,2%)
Gentamicin (10µg)	2 (1,2%)
Norfloxacin (10µg)	1 (0,6%)
Sulfazotrim (23,75/1,25µg)	0 (0,0%)
Vancomycin (30µg)	0 (0,0%)

CAPÍTULO 2

**Genotypic and phenotypic profiles of beta-lactam resistance in coagulase-negative
Staphylococcus isolated from buffalo, goat and sheep mastitis in the Northeast of
Brazil**

(Submetido ao periódico Veterinary Microbiology)

Genotypic and phenotypic profiles of beta-lactam resistance in coagulase-negative *Staphylococcus* isolated from buffalo, goat and sheep mastitis in the Northeast of Brazil

ABSTRACT

Resistance to beta-lactams occurs through different mechanisms. This class of antimicrobial is widely used in the treatment of mastitis, including in buffaloes, goats and sheep where coagulase-negative *Staphylococcus* (CNS) has emerged as an important etiologic agent of mastitis. The objective of this study was to analyze the genotypic and phenotypic profiles of beta-lactams and other antimicrobials resistance in CNS isolated from buffalo, goat and sheep mastitis in Northeast of Brazil. A total of 190 isolates were analyzed and 42.3% (22/52), 43.9% (29/66) and 23.6% (17/72) of them were positive for the blaZ gene in the buffalo, goat and sheep, respectively. 71.2% (37/52) of CNS from buffalo origin, 72.7% (48/66) from goat origin and 68.1% (49/72) from sheep origin were resistant to amoxicillin, being this the antimicrobial with higher resistance index in the disk-diffusion technique. 30.8% (16/52) of CNS isolates from buffalo milk samples, 25.8% (17/66) from goats and 25.0% (18/72) from sheep presented multiple antimicrobial resistances. In the minimum inhibitory concentration (MIC) technique, amoxicillin MIC₉₀ and MIC₅₀ were 128 and 64 µg/mL, respectively, among the isolates of the three animal species. It is concluded that the resistance to beta-lactams between CNS isolated from buffalo, goat and sheep milk in the Northeast region of Brazil is very worrisome and corrective management measures should be adopted to reduce the circulation of these bacteria in the agricultural environment.

Key words: multidrug resistance, blaZ gene, betalactamase, minimal inhibitory concentration, intramammary infection

INTRODUCTION

Brazil's Northeast, where Alagoas, Bahia, Paraíba and Pernambuco states are located, are home to 93.0% of the goat herd, and 63.0% and 9.5% of the national sheep and buffalo herds, respectively, being very important for this region (IBGE, 2016).

However, health problems such as bacterial mastitis limit the livestock exploitation of these species (França et al., 2012).

Staphylococcus spp. are the main pathogens causing intramammary infection in small ruminants and buffaloes (Acosta et al., 2016), with emphasis on coagulase-negative *Staphylococcus* (CNS) (Medeiros et al., 2013).

Mastitis caused by CNS usually occurs without noticeable clinical signs. However, they often cause persistent infections in the mammary gland, resulting in higher somatic cell counts (SCC) in the milk, besides the emergence of antimicrobial resistance, being considered reservoirs of resistance genes with potential transmission for other species (Taponen and Pyörälä, 2009).

In the veterinary environment, beta-lactams are the most widely used drugs in the world to treat both mastitis and other infectious diseases, either in cattle, goats, sheep, buffaloes or other species (Fejzić et al., 2014), being the constant and wholesale use of these drugs as a stimulant for the development of antimicrobial resistance (Fernandes et al., 2013).

Considering the important role of coagulase-negative *Staphylococcus* in the etiology of mastitis in small ruminants and buffaloes, the objective was to study CNS genotypic and phenotypic resistance profiles to beta-lactams and other antimicrobials in strains isolated from goat, sheep and buffalo mastitis in the Northeast region of Brazil.

MATERIAL AND METHODS

Ethical approval

This study was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA) of the Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE), Recife, Brazil (License No. 079/2014).

Bacterial isolates

It was analyzed a total of 190 coagulase-negative *Staphylococcus* (CNS) strains, previously isolated and stored under freezing in glycerinated BHI (Brain Heart Infusion) broth at -20°C at the Laboratory of Infectious Diseases (LDIC) of the Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE). 52 strains were isolated from buffalo, 66 of from goats, and 72 from sheep's mastitis. Biochemical identification of the isolates was performed by testing the coagulase and acetoin as recommended by the National Mastitis Council (2017).

Genomic DNA Extraction and Polymerase Chain Reaction (PCR)

Genomic DNA of the bacterial isolates was extracted from 1 mL of culture grown in BHI (Brain Heart Infusion) broth using the Wizard Kit SV Genomic DNA Purification System (Promega®-Madison, Wisconsin, USA) according to manufacturer's instructions. Polymerase chain reaction (PCR) was performed for amplification of blaZ gene, which encodes beta-lactamases, in addition to mecA and mecC genes detection, which are inducers of the beta-lactam site of action modification.

Reactions were assembled separately for each gene in a final volume of 15µL per well, containing 100ng of DNA template, 10pmol of each oligonucleotide (Tab.1), Taq buffer (10mM Tris, 50mM KCl, 2.5mM MgCl₂), 200mM dNTPs and 1U Taq DNA polymerase (Cenbiot, Taq DNA polymerase, Ludwig Biotec, Porto Alegre, RS, Brazil).

Thermal profiles of the amplifications were 4 min. at 94 °C, followed by 32 cycles of denaturation at 94 °C for 30 sec., annealing at 50.5 °C for 30 sec. (*blaZ* gene) or 55 °C (*mecA* and *mecC* genes) and extended at 72 °C for 30 sec., with final extension at 72 °C for 5 min. Then 10µL of each reaction was electrophoresed for 40 minutes at 100V in 1.5% agarose gel stained with BlueGreen, visualized and photo documented under ultraviolet light.

Antimicrobial susceptibility test

In vitro antimicrobial resistance was determined by disc-diffusion method for the following drugs: amoxicillin (30µg), ampicillin (10µg), cefotaxime (30µg), cefoxitin (30µg), ceftriaxone (30µg), gentamicin (10µg), norfloxacin (10µg), oxacillin (1µg), penicillin G (10U), sulfazotrim (23.75/1.25µg), tetracycline (30µg) and vancomycin (30µg). Multiple antimicrobial resistances (MAR) index was calculated according to Krumperman (1983). The minimum inhibitory concentration (MIC) for antimicrobials (amoxicillin, cephalixin, cefotaxime, ceftriaxone and oxacillin) was also detected according to CLSI (2015).

Statistical analysis

Epi Info™ software (version 7.2) was used to statistical analyzes. Chi-square test was used to verify the statistical significance in the antimicrobial resistance frequencies and MIC values for different species studied. Less than 0.05 p-values were considered statistically significant (Sampaio, 2002).

RESULTS

In this study, 42.3% (22/52) of buffalo origin isolates were positive for *blaZ* gene. Among isolates from goat origin, this percentage was 43.9% (29/66), while those of

sheep origin 23.6% (17/72) were positive for this gene (Fig. 1). All the isolates analyzed were negative for *mecA* and *mecC* genes.

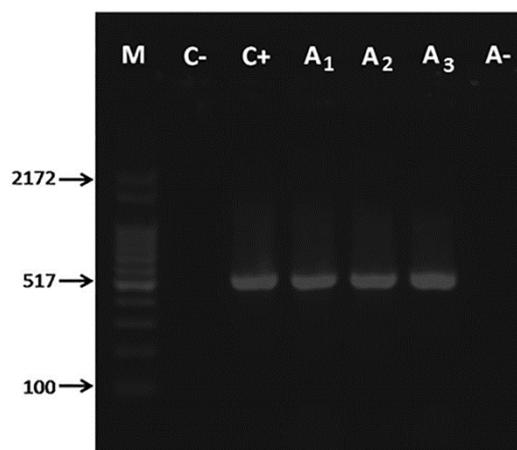


Figure 1: Amplification of *blaZ* gene fragment in CNS isolated from buffalo, goat and sheep with mastitis. **Column M:** 100bp molecular weight marker (Invitrogen); **Column C-:** negative control; **C+ column:** positive control; **Column A1:** Positive bubaline sample; **Column A2:** Positive goat sample; **Column A3:** Positive sheep sample; **Column A-:** Negative sample.

Percentages of antimicrobial resistance detected in the disc-diffusion technique for coagulase-negative *Staphylococcus* analyzed are described in Table 2.

According to MAR index calculated, 30.8% (16/52), 25.8% (17/66) and 25.0% (18/72) of the isolates analyzed presented multidrug resistance for buffalo, goat and sheep, respectively. Only 7.7% (4/52) of buffalo isolates, 6.1% (4/66) of goats and 11.1% (8/72) of sheep were susceptible to all antimicrobials simultaneously. None of the isolates were resistant to all antimicrobials at the same time.

Observed MICs, by species, for each of the beta-lactams tested are described in Table 3.

DISCUSSION

In this study, the presence of the *blaZ* gene detected in 23.6% (17/72) coagulase-negative *Staphylococcus* (CNS) from sheep milk samples was statistically lower ($p = 0.0233$) than

observed for buffalo isolates (42.3% - 22/52) and goats (43.9% - 29/66). There was no statistical difference between the results obtained for buffalo and goat isolates. In the Northeast region of Brazil, sheep are mainly exploited for slaughter, less frequent use of antimicrobials compared to buffalo and goat species. Thus, there is a lower selection pressure of microorganisms carrying resistance genes such as blaZ (Ruegg et al., 2015). Despite the importance of CNS in the etiology of mastitis, data on the presence of the blaZ gene in this group of microorganisms are still scarce, especially in Brazil. The frequencies of the blaZ gene detected in this study are in accordance with the literature consulted for buffalo (Medeiros et al., 2011), goat and sheep (França et al., 2012).

In the CNS originating from the three animal species, the detection frequencies of the blaZ gene were compatible with the phenotypic resistance profiles of penicillin, amoxicillin and ampicillin also observed in this study. According to Dias et al. (2015), this usually occurs by the action of beta-lactamases, whose production is induced by blaZ gene, this being an expected result.

Lower frequency of blaZ gene in CNS from sheep isolates compared to isolates of goat and buffalo origin, even with the same phenotypic resistance index to penicillin, suggest that other genetic mechanisms may be involved in the induction of resistance to penicillin in this group of microorganisms, as described by Van Hoek et al. (2011), who cite the importance of mobile genetic elements, such as plasmids, as determinants of beta-lactam resistance, not just chromosome genes (Giedraitienė et al., 2011).

We did not detect the presence of the mecA and mecC genes in the analyzed CNS isolates of the three species, in agreement with a study carried out by França et al. (2012) in this same region. Studies in other regions of Brazil have already demonstrated the presence of mecA or mecC gene in CNS from buffalo (Guimarães et al., 2012) and sheep origin (Zafalon et al., 2012). But for goat isolates, there are still no published reports of

the occurrence of these genes in Brazilian territory. According to Soares et al. (2008), the mean frequency of CNS carriers of the *mecA* gene is 5.6% in isolates from animal origin, and the presence of this gene is still considered not very active in Veterinary Medicine (Leigue et al., 2017), despite the growing concern with the impact of methicillin-resistant *Staphylococcus* (MRS) on public and animal health (Helal et al., 2015). The absence of the *mecA* and *mecC* genes suggests a greater epidemiological importance of the *blaZ* gene as an inducer of beta-lactam resistance mechanisms among the isolated CNS in the Northeast region of Brazil.

Gentamicin, norfloxacin, sulfazotrim and vancomycin were the antimicrobials with the highest sensitivity indexes in vitro, among the evaluated CNS, constituting good alternatives for the treatment of mastitis in this region. However, amoxicillin, ampicillin and penicillin were the antimicrobials with the highest resistance indexes, corroborating with the genotypic findings, since resistance to non-stable penicillin, (e.g. penicillin and ampicillin) is determined by the action of beta-lactamases that are encoded by the *blaZ* gene, while resistance to groups such as cephalosporin (e.g. ceftriaxone and cefotaxime) and stable penicillin (e.g. oxacillin and methicillin) is determined by other genetic elements, such as the *mecA* and *mecC* genes responsible for encoding the alternative penicillin binding protein (PBP2a) (Rudkin et al., 2012).

In the region where this study was conducted, the indiscriminate use of antimicrobial drugs may have contributed to the selection of resistant CNS in the herds, especially for the class of beta-lactams which are commonly used to treat mastitis in the properties, also previously reported by Medeiros et al. (2009) and Krewer et al. (2013), thus favoring the occurrence of selection pressure of resistant microorganisms (Ruegg et al., 2015).

Multiple antimicrobial resistance (MAR) frequencies observed for the analyzed CNS were 30.8% (16/52) for buffalo, 25.8% (17/66) in goat and 25.0% (18/72) in sheep,

agreeing with the literature consulted (França et al., 2012; Kürekci, 2016; Mesquita et al., 2017), but disagreeing with 56.3% of MAR reported by Medeiros et al. (2011) for CNS from buffalo mastitis in a study carried out in the Northeast region of Brazil. Such disagreement may suggest that the therapeutic management implemented in mastitis treatment is showing a positive effect on the decrease of multiresistant microorganism populations in this region. In spite of this, it should be noted that CNS are present in the skin of animals and of people who deal with these animals, besides being considered reservoirs of resistance genes for strains of *S. aureus* that are generally more virulent and present greater clinical importance for human and other animal species (Tulinski et al., 2012).

Considering the results of the MIC, where amoxicillin showed the highest resistance rates with 76.9% (40/52) among the CNS from buffalo origin, 80.3% (53/66) of goat origin and 76.4% (55/72) of sheep origin, once again evidence the importance of betalactamases as resistance inducing mechanisms in the CNS studied. Despite the variation of only one dilution between the MIC₅₀ and MIC₉₀ observed, in agreement with the results obtained by Oliveira et al. (2012), MIC₅₀ (64 µg/mL) compared to the cutoff point for this antimicrobial (8 µg/mL) demonstrates a worrying tolerance to this antimicrobial.

The phenotypic analysis showed a discrepancy in relation to the genotypic analysis of the isolates, once strains resistant to oxacillin, ceftriaxone and cefotaxime were detected, but they were negative for *mecA* and *mecC* genes detection. According to Zafalon et al. (2012), the absence of *mecA* and *mecC* genes in oxacillin-resistant isolates can be explained by the existence of other resistance mechanisms independent of the expression of these genes. According to Mendonça et al. (2012), the explanation would be the

occurrence of homologous genes and the production of other classes of penicillin binding proteins, or due to a beta-lactamase hyper production (Brown et al., 2001).

A study by Frimodt-Moller (2002) has shown that varying concentrations of a drug can be obtained in different organs, as well as in the circulation, varying mainly according to the route of administration of the drug. Thus, the exclusive use of the disc-diffusion technique to determine antimicrobial susceptibility may lead to misleading results, especially for the control of mastitis, where in most cases the antimicrobial application is by intramammary route; in this case, the concentration of the drug in the gland may be higher than the cutoff points used in the disc-diffusion technique, which is based on the serum concentration of the drug (CLSI, 2015). However, studies evaluating MIC in association with the pharmacokinetics and pharmacodynamics of antimicrobials in the mammary gland are necessary to confirm the hypothesis that microorganisms considered resistant in the antibiogram may respond to intramammary mastitis treatment as suggested by Erskine et al. (2003). Thus, in view of the results presented and the existing gaps in the literature on antimicrobial resistance, especially beta-lactams, it is evident the need to carry out studies of this nature that contribute to monitoring resistant microorganisms expansion.

CONCLUSION

High rates of resistance to beta-lactams are present among CNS isolated from mastitis cases in buffaloes, goats and sheep in the Northeast region of Brazil. Among these isolates, the most active mechanism of resistance is beta-lactamase production that may be causing resistance even to the more stable classes of beta-lactams. These results serve as an alert to animal and human health for decision making that seek to reduce the frequency of these resistant microorganisms that are reservoirs of resistance genes for other microorganisms.

REFERENCES

- Acosta, A. C., Da Silva, L. B. G., Medeiros, E. S., Pinheiro Júnior, J. W. Mota, R. A., 2016. Mastites em ruminantes no Brasil. *Pesqui. Vet. Bra.* 36:7, 565–573.
- Brown, D.F.J., 2001. Detection of methicillin/oxacillin resistance in staphylococci. *J. Antimicrob. Chemo.* 48, 65-70.
- CLSI. 2015. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. CLSI document M100-S25. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Dias, A.P.M., Pinheiro, M.G., Aguiar-Alves, F., 2015. Características clínicas, resistência e fatores de virulência em *Staphylococcus aureus*. *Acta Sci. Tech.* 3:1, 9-23.
- Erskine, R.J., Wagner, S., Degraives, F. J., 2003. Mastitis therapy and pharmacology. *Vet. Clin. N. Ame. - Food Animal Practice.* 19:1, 109–138.
- Fejzić, N., Begagić, M., Šerić-Haračić, S., Smajlović, M., 2014. Beta lactam antibiotics residues in cow's milk: Comparison of efficacy of three screening tests used in Bosnia and Herzegovina. *Bos. J. Basic Med. Sci.* 14:3, 155–159.
- Fernandes, R., Amador, P., Prudêncio, C., 2013. β -Lactams: Chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance. *Rev.Med. Microb.* 24:1, 7–17.
- França, C.A., Peixoto, R.M., Cavalcante, M.B., Melo, N.F., Oliveira, C.J.B., Veschi, J.A., Mota, R.A., Costa, M.M., 2012. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp . from small ruminant mastitis in Brazil. *Pesqui. Vet. Bra.* 32:8, 747–753.
- Frimodt-Moller, N., 2002. Correlation between pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters and efficacy for antibiotics in the treatment of urinary tract infection. *Int. J. Antimic. Ag.* 19:6, 546–553.

Giedraitienė, A., Vitkauskienė, A., Naginienė, R., Pavilionis, A., 2011. Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. *Med. (Kaunas, Lithuania)* 47:3, 137–46.

Guimarães, G., De França, C.A., Krug, F.S., Peixoto, R.M., Krewer, C.C., Lazzari, A.M.; Costa, M.M., 2012. Caracterização fenotípica, produção de biofilme e resistência aos antimicrobianos em isolados de *Staphylococcus* spp. obtidos de casos de mastite em bovinos e bubalinos. *Pesqui. Vet. Bra.* 32:12, 1219–1224.

Helal, G.T.Y., El-Enbaawy, M.I., Nasef, S.A., 2015. Genetic Expression of Mec A Gene in Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains of Animal and Human Samples. *J. Microb. Res.* 5:3, 77–83.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2016) Produção da Pecuária Municipal, Rio de Janeiro, 44:1-51.

Krewer, C.C., Izabela, I.P., Amanso, E.S., Cavalcante, N.B., Peixoto, R.M., Pinheiro Júnior, J.W., Costa, M.M., Mota, R.A., 2013. Etiology, antimicrobial susceptibility profile of *Staphylococcus* spp. and risk factors associated with bovine mastitis in the states of Bahia and Pernambuco. *Pesqui. Vet. Bra.* 33:5, 601–606.

Krumperman, P.H., 1983. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 46:1, 165-170.

Kürekci, C., 2016. Short communication: Prevalence, antimicrobial resistance, and resistant traits of coagulase-negative staphylococci isolated from cheese samples in Turkey. *J. Dair. Sci.* 99:4, 2675–2679.

Leigue, L., Hilgert, A.R., Fiorini, A., Santos, M.F., Vendruscolo, E.C.G., 2017.

Occurrence and genetic characterization of *Staphylococcus aureus* in milk samples of

cattle with mastitis, and in the Veterinary Hospital personnel and dairy workers. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. 54:2, 117.

Medeiros, E.S., Freitas, M.F.L., Saukas, T.N., Azevedo, S.S., Pinheiro Junior, J.W., Brandespim, D.F., Souza Neto, O.L., Mota, R.A., 2011. Risk factors associated with buffalo mastitis in the Brazilian Northeast. *Pesqui. Vet. Bras.* 31:6, 499–504.

Medeiros, E.S., Freitas, M.F.L., Pinheiro Júnior, J.W., Saukas, T.N., Krewer, C.C., Santos, A.S., Costa, M.M., Mota, R. A., 2013. Bubaline mastitis etiology in Northeast of Brazil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 65:6, 1891–1894.

Medeiros, E.S., Mota, R.A., Santos, M.V., Freitas, M.F.L., Pinheiro Júnior, J.W., Teles, J.A.A., 2009. Perfil de sensibilidade microbiana in vitro de linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de vacas com mastite subclínica. *Pesqui. Vet. Bra.* 29:7, 569–574.

Mendonça, E.C.L., Marques, V.F., Melo, D.A., Alencar, T.A., Coelho, I.S., Coelho, S.M.O., Souza, M.M.S.. 2012. Caracterização fenogenotípica da resistência antimicrobiana em *Staphylococcus* spp. isolados de mastite bovina. *Pesqui. Vet. Bra.* 32:9, 859–864.

Mesquita, A.A., Marcio, G., Vieira, F., Almeida, M., Demeu, F.A., Mitke, E., Reis, B., 2017. Mastite em rebanhos antimicrobianos bubalinos e sua suscetibilidade a Mastitis in buffalo herds and their susceptibility to antimicrobial. *PubVet.* 11:1, 62–73.

Nakagawa, S., Taneike, I., Mimura, D., Iwakura, N., Nakayama, T., Emura, T., Kitatsuji, M., Fujimoto, A., Yamamoto, T., 2005. Gene sequences and specific detection for Panton-Valentine leukocidin. *Bioch. Biophys. Res. Commun.* 328:4, 995–1002.

National Mastitis Council (Nmc), 2017. Laboratory Handbook on Bovine Mastitis. Madison - WI, 148-p.

Oliveira, L., Langoni, H., Hulland, C., 2012. Recovered From Clinical and Subclinical

Cases of Bovine Mastitis. *J. Dair. Sci.* 95, 1913–1920.

Paterson, G.K., Larsen, A.R., Robb, A., Edwards, G.E., Pennycott, T.W., Foster, G., Mot, D., Hermans, K., Baert, K., Peacock, S.J., Parkhill, J., Zadoks, R.N., Holmes, M.A., 2012. The newly described *mecA* homologue, *mecALGA251*, is present in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from a diverse range of host species. *J. Antimicrob. Chemo.* 67:12, 2809–2813.

Rudkin, J.K., Edwards, A.M., Bowden, M.G., Brown, E.L., Pozzi, C., Waters, E.M., Chan, W.C., Williams, P., O'gara, J.P., Massey, R. C., 2012. Methicillin resistance reduces the virulence of healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by interfering with the *agr* quorum sensing system. *J. Infect. Dis.* 205:5, 798–806.

Ruegg, P.L., Oliveira, L., Jin, W., Okwumabua, O., 2015. Phenotypic antimicrobial susceptibility and occurrence of selected resistance genes in gram-positive mastitis pathogens isolated from Wisconsin dairy cows. *J. Dair. Sci.* 98:7, 4521–4534.

Sampaio, I.B.M., 2002. Estatística aplicada à experimentação animal. Belo Horizonte: Fundação De Ensino E Pesquisa Em Medicina Veterinária E Zootecnia, 265p.

Sawant, A.A., Gillespie, B.E., Oliver, S.P., 2009. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative *Staphylococcus* species isolated from bovine milk. *Vet. Microbiol.* 134, 73-81.

Soares, L.D.C., Pereira, I.A., Coelho, S.D.M.D.O., Cunha, C.M.M., Oliveira, D.F.B., Miranda, A.N., Souza, M.M.S., 2008. Caracterização fenotípica da resistência a antimicrobianos e detecção do gene *mecA* em *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos isolados de amostras animais e humanas. *Ciênc. Rural.* 38:5, 1346–1350.

Taponen, S., Pyörälä, S., 2009. Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine

mastitis-Not so different from *Staphylococcus aureus*? Vet. Microbiol. 134:1–2, 29–36.

Tulinski, P., Fluit, A.C., Wagenaar, J.A., Mevius, D., Van De Vijver, L., Duim, B., 2012. Methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci on pig farms as a reservoir of heterogeneous staphylococcal cassette chromosome mec elements. App. Environm. Microbiol. 78:2, 299–304.

Van Hoek, A.H.A.M., Mevius, D., Guerra, B., Mullany, P., Roberts, A.P., Aarts, H.J.M., 2011. Acquired antibiotic resistance genes: An overview. Front.Microbiol. 2, 1–27.

Zafalon, L.F., Verissimo, C.J., Mamizuka, E.M., Martins, K.B., Almeida, L.M., 2012. Estafilococos resistentes à oxacilina isolados em casos de mastite subclínica em ovinos. Arq. Inst. Biol. 79:1, 1–7.

Table 1: Sequences of the oligonucleotides used in this study and sizes of the amplified fragments, in base pairs (bp)

Oligonucleotide	Sequence (5'-3')	Amplicon (bp)	Reference
blaZ	F-AAGAGATTTGCCTATGCTTC	517	Sawant et al. (2009)
	R-GCTTGACCACTTTTATCAGC		
mecA	F-TGGTATGTGGAAGTTAGATTGGGAT	155	Nakagawa et al. (2005)
	R-CTAATCTCATATGTGTTCTGTATTGGC		
mecC	F-CATTA AAAATCAGAGCGAGGC	188	Paterson et al. (2012)
	R-TGGCTGAACCCATTTTTGAT		

Table 2. Percentage of antimicrobial resistance of coagulase-negative *Staphylococcus* isolated from mastitis in buffaloes, goats and sheep in the Northeast of Brazil by disc-diffusion technique

Antimicrobial	Buffaloes (N=52)		Goats (N=66)		Sheep (N=72)		p-value
	R	%	R	%	R	%	
Amoxicillin	37	71,2	48	72,7	49	68,1	0,829
Ampicillin	18	34,6	23	34,9	31	43,1	0,5187
Cefotaxime	4	7,7	4	6,1	0	0	0,0711
Cefoxitin	1	1,9	1	1,5	2	2,8	0,8703
Ceftriaxone	7	13,5	8	12,1	8	11,1	0,9246
Gentamicin	0	0	1	1,5	1	1,4	0,6815
Norfloxacin	0	0	2	3,0	2	2,8	0,4606
Oxacillin	8	15,4	11	16,7	7	9,7	0,4536
Penicillin G	27	51,9	27	40,9	29	40,3	0,3714
Sulfazotrim	0	0	2	3,0	2	2,8	0,4606
Tetracycline	2	3,9	8	12,1	12	16,7	0,0873
Vancomycin	1	1,9	1	1,5	2	2,8	0,8703

Conventions: N - total of samples analyzed; R - Resistant; % - Relative Frequency.

Table 3. Comparison of resistance percentages to different beta-lactams in coagulase-negative *Staphylococcus* isolates of buffalo, goat and sheep mastitis in Northeast Brazil in MIC technique ($\mu\text{g/mL}$)

Species	AMO ^b			CFX ^b			CTX ^b			CRO ^b			OXA ^b		
	%	CIM ₅₀	CIM ₉₀	%	CIM ₅₀	CIM ₉₀	%	CIM ₅₀	CIM ₉₀	%	CIM ₅₀	CIM ₉₀	%	CIM ₅₀	CIM ₉₀
Buffalo^a (N=52)	76,9	64	128	32,7	8	≥ 128	17,3	4	128	21,2	8	≥ 128	32,7	2	8
Goat^a (N=66)	80,3	64	128	24,2	8	≥ 128	13,6	4	64	16,7	4	128	21,2	0,25	8
Sheep^a (N=72)	76,4	64	128	26,4	8	≥ 128	22,2	4	128	30,6	16	≥ 128	23,6	0,25	16
Total (N=190)	77,9	64	128	27,4	8	≥ 128	17,9	4	128	23,2	8	≥ 128	25,3	0,25	8

Conventions: N - total of samples analyzed; % - Relative Frequency; **AMO**-amoxicillin; **CFX**-cephalexin; **OXA**-oxacillin; **CTX**-cefotaxime; **CRO**-ceftriaxone. ^a-Superscripted cells with equal letters in the same column do not differ statistically from each other ($p \geq 0.05$); ^b- Superscripted cells with equal letters on the same line do not differ statistically from each other ($p \geq 0.05$).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos a partir da caracterização dos perfis genotípico e fenotípico de resistência a beta-lactâmicos em *Staphylococcus* spp. isolados de mastite em ruminantes na região Nordeste do Brasil permitem concluir que:

- *Staphylococcus aureus* possuem grande importância na epidemiologia da mastite bovina na região Nordeste, assim como *Staphylococcus* coagulase negativa nas espécies bubalina, caprina e ovina;
- Altos níveis de resistência a beta-lactâmicos estão presentes entre *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* coagulase negativa isolados de mastite nesta região;
- Além dos betalactâmicos, tetraciclina foi um dos antimicrobianos com maiores índices de resistência entre *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* coagulase negativa isolados de mastite no Nordeste brasileiro;
- As altas frequências do gene blaZ indicam que o principal mecanismo de resistência aos betalactâmicos nesses microrganismos seja a produção de betalactamases;
- A ausência de detecção dos genes mecA e mecC, mesmo com isolados fenotipicamente resistentes à meticilina sugere que outros mecanismos de resistência estejam atuando, possivelmente uma hiperprodução de betalactamases.

De modo geral, os resultados observados alertam para o risco das elevadas prevalências desses microrganismos em rebanhos leiteiros e da iminente transmissão destes patógenos aos humanos. Sobretudo, por se tratarem de bactérias resistentes a fármacos de grande utilização na terapêutica antimicrobiana em humanos. Sendo assim, recomenda-se a adoção de medidas de contenção de microrganismos patogênicos e multirresistentes, como a escolha criteriosa de fármacos antimicrobianos, sempre respaldada em testes de sensibilidade *in vitro*, minimizando as chances de seleção de bactérias resistentes.

ANEXOS

**ANEXO A - Parecer de aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais da
UFRPE.**

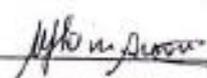


Universidade Federal Rural de Pernambuco
Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n,
Dois Irmãos - CEP: 52171-900 - Recife/PE

Comissão de ética no uso de animais - CEUA
Licença para o uso de animais em experimentação e/ou ensino

O Comitê de ética no uso de animais CEUA da Universidade Federal Rural de Pernambuco, no uso de suas atribuições, autoriza a execução do projeto discriminado abaixo. O presente projeto também se encontra de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11794/2008.

Número da licença	079/2014
Número do processo	23082.009382/2013
Data de emissão da licença	07 de Julho de 2014
Título do Projeto	Caracterização genética dos isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> causadores de mastite nos rebanhos caprinos e bovinos no estado de Pernambuco, Brasil.
Finalidade (Ensino, Pesquisa, Extensão)	Pesquisa
Responsável pela execução do projeto	Rinaldo Aparecido Mota
Colaboradores	José Wilton Pinheiro Júnior; Atzel Candido Acosta Abad.
Tipo de animal e quantidade total autorizada	


 Prof. Dr. Marleyne José Afonso Accioly Lins Amorim



Prof.ª Dr. Marleyne Amorim
Coordenadora CEUA

ANEXO B – Comprovante de submissão do manuscrito intitulado “High frequency of beta-lactam resistance among *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Northeast of Brazil”

27/01/2018

Mail - André Santos - Outlook

Microbial Drug Resistance - Manuscript ID MDR-2018-0037

Microbial Drug Resistance <onbehalf@manuscriptcentral.com>

Sat 1/27/2018, 9:30 PM

To: andresouza_santos@hotmail.com <andresouza_santos@hotmail.com>;

27-Jan-2018

Dear Mr. SANTOS:

Your manuscript entitled "HIGH FREQUENCY OF BETA-LACTAM RESISTANCE AMONG *Staphylococcus aureus* ISOLATED FROM BOVINE MASTITIS IN NORTHEAST OF BRAZIL" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in Microbial Drug Resistance.

Your manuscript ID is MDR-2018-0037.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to Manuscript Central at <https://mc.manuscriptcentral.com/mdr> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc.manuscriptcentral.com/mdr>.

Thank you for submitting your manuscript to Microbial Drug Resistance.

Sincerely,

Microbial Drug Resistance Editorial Office

Ensure you stay informed. Register to receive email alerts for the Journal(s) that are critical to advancing your work: www.liebertpub.com/liebertconnect (copy/paste the link into your browser).

ANEXO C – Comprovante de submissão do manuscrito intitulado “Genotypic and phenotypic profiles of beta-lactam resistance in coagulase-negative *Staphylococcus* isolated from buffalo, goat and sheep mastitis in the Northeast of Brazil”

27/01/2018

Mail - André Santos - Outlook

Successfully received: submission Genotypic and phenotypic profiles of beta-lactam resistance in coagulase-negative *Staphylococcus* isolated from buffalo, goat and sheep mastitis in the Northeast of Brazil for Veterinary Microbiology
Veterinary Microbiology <EvisSupport@elsevier.com>
Sat 1/27/2018, 3:30 PM
To: andresouza_santos@hotmail.com <andresouza_santos@hotmail.com>;

This message was sent automatically. Please do not reply.

Ref: VETMIC_2018_118

Title: Genotypic and phenotypic profiles of beta-lactam resistance in coagulase-negative *Staphylococcus* isolated from buffalo, goat and sheep mastitis in the Northeast of Brazil
Journal: Veterinary Microbiology

Dear Dr. Souza Santos,

Thank you for submitting your manuscript for consideration for publication in Veterinary Microbiology. Your submission was received in good order.

To track the status of your manuscript, please log into EVISE® at: http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL_ACR=VETMIC and locate your submission under the header 'My Submissions with Journal' on your 'My Author Tasks' view.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Veterinary Microbiology

Have questions or need assistance?

For further assistance, please visit our [Customer Support](#) site. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about EVISE® via interactive tutorials. You can also talk 24/5 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email.

Copyright © 2018 Elsevier B.V. | [Privacy Policy](#)

Elsevier B.V., Radarweg 29, 1043 NX Amsterdam, The Netherlands, Reg. No. 33156677.