



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**PERFIL DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM *Staphylococcus* spp. DE
ORIGEM LÁCTEA NA REGIÃO NORDESTE**

ABIMAELESTEVAM DA SILVA JÚNIOR

Médico Veterinário

**AREIA – PB
MARÇO – 2016**

ABIMAEEL ESTEVAM DA SILVA JÚNIOR

PERFIL DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM *Staphylococcus* spp. DE ORIGEM LÁCTEA NA REGIÃO NORDESTE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia, da Universidade Federal da Paraíba, como parte das exigências para a obtenção do Título de Mestre em Zootecnia.

Comitê de Orientação:

Prof. Dr. Celso José Bruno de Oliveira – Orientador principal

Prof. Dr. Lauro Santos Filho

Dr. Denis Augusto Spricigo

**AREIA-PB
MARÇO – 2016**

*Ficha Catalográfica Elaborada na Seção de Processos Técnicos da
Biblioteca Setorial do CCA, UFPB, campus II, Areia - PB*

S586p	<i>Silva Júnior, Abimael Estevam da.</i> <i>Perfil de resistência antimicrobiana em Staphylococcus spp. de origem láctea na região nordeste / Abimael Estevam da Silva Júnior. – Areia - PB: CCA/UFPB, 2016.</i> 42 f. : il. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Centro de Ciências Agrárias. Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2016. Bibliografia. Orientador: Celso José Bruno de Oliveira. 1. Leite – Infecção intramamária 2. <i>Staphylococcus</i> spp. – Resistência antimicrobiana 3. Leite bovino – Infecção estafilocócica 4. Queijo caprino – Infecção estafilocócica I. Oliveira, Celso José Bruno de (Orientador) II. Título. UFPB/BSAR CDU: 637.12(043.3)
-------	--



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

PARECER DE DEFESA DO TRABALHO DE DISSERTAÇÃO

TÍTULO: “Perfil de resistência antimicrobiana em *Staphylococcus spp.* de origem láctea na região Nordeste”.

AUTOR: Abimael Estevam da Silva Junior

ORIENTADOR: Prof. Dr. Celso José Bruno de Oliveira

JULGAMENTO

CONCEITO: APROVADO

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Lauro Santos Filho
Presidente
Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dr. Mateus Matinzzi da Costa
Examinador
Universidade Federal do Vale de São Francisco

Prof. Dr. Paulo Sérgio de Azevedo
Examinador
Universidade Federal da Paraíba

Areia, 16 de fevereiro de 2016

A DEUS, pela presença constante em minha vida e pelo amor incondicional e encorajamento todos os dias a mim concedido.

A ELE minha gratidão por mais essa vitória alcançada.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Durante a realização de qualquer caminhada sempre contamos com a competência, o carinho, a dedicação e a amizade de inúmeras pessoas. Nesta que agora termina, quero agradecer a todos embora difícil relacionar os nomes.

Inicialmente, agradeço a Deus por permitir a minha existência, ser a fortaleza nas lutas diárias por sustentar e levantar-me diante as quedas da vida.

Aos meus familiares, a base de tudo em minha vida. Em particular a minha mãe, Ezilda Maria e meu pai, Abimael Estevam pela educação que recebi, pelo amor incondicional que sempre me deram, por me apoiarem em meus sonhos, me incentivarem e permitirem meus estudos; a minha irmã, Karla Ilsa pela preocupação e companheirismo.

A todos da família LAPOA, os quais nunca mediram esforços para ajudar, compreender e incentivar. Nunca esquecerei o companheirismo, dedicação e conselhos. Vocês tornaram meus dias menos árduos e mais alegres. E, acima de tudo, se tornaram bons amigos, aos quais sempre serei grato.

Aos amigos de longa data que deixaram um pouco de si e levaram um pouco de mim: Robson Castro, Tiago Santos, Weyber Oliveira, Delson Chaves e Fabio Alves.

Ao meu orientador Dr. Celso José Bruno de Oliveira pelo incentivo e dedicação.

Ao professor Dr. Lauro Santos Filho, pela disponibilidade e atenção.

À todos os professores do Centro de Ciências Agrárias (CCA) por todos os ensinamentos.

Ao Programa de Pós Graduação em Zootecnia e a CAPES pela bolsa concedida.

À Universidade Federal da Paraíba, agradeço pela oportunidade e privilégio de estudar nessa instituição.

RESUMO

SILVA JÚNIOR, ABIMAEEL ESTEVAM. **Perfil de resistência antimicrobiana em *Staphylococcus* spp. de origem láctea.** 2016. 44 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Centro de Ciências Agrárias. Universidade Federal da Paraíba, Areia, PB, 2016.

A infecção intramamária é considerada uma enfermidade que acarreta grandes prejuízos econômicos à atividade leiteira, em decorrência do descarte do leite e dos custos com medicamentos e assistência técnica, reduzindo a quantidade e a qualidade do leite e dos seus derivados. Além disso, representa sério problema de saúde pública quando veicula microrganismos resistentes para a população humana. Devido à falta de informações sobre esses microrganismos torna difícil avaliar o impacto destes alimentos contaminados na saúde pública. Neste intuito esse trabalho teve como objetivo investigar os perfis de resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus* spp. cultivadas a partir de amostras de leite bovino e caprino e queijo caprino, assim como determinar a concentração inibitória mínima (CIM) para os antimicrobianos testados. Foram analisados um total de 549 isolados de *Staphylococcus* spp., onde dentre esses 195/549 eram coagulase positiva e 354/549 eram coagulase negativa, estes foram oriundos de diferentes estados do Nordeste. A resistência antimicrobiana foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo, usando um sistema semi-automatizado (Autoscan4[®], Siemens) determinando a CIM para os antimicrobianos nas seguintes diluições: amoxilina/ clavulanato de K [Aug] (4/2 µg/ml), gentamicina [Gen] (4-8 µg/ml), clindamicina [Cli] (0,5- 4µg/ml), Ciprofloxacina [Cip] (1-2 µg/ml), eritromicina [Eri] (0,5- 4 µg/ml), oxacilina [Oxa] (0,25- 2 µg/ml), penicilina G [Pen] (0,03- 8 µg/ml), linezolid [Lin] (1- 4 µg/ml), trimetoprim/sulfametoxazol [T/S] (0,5/9,5- 2/38 µg/ml), tetraciclina [4- 8µg/ ml) e vancomicina [Van] (0,25- 16µg/ ml). Para avaliar possíveis associações entre a resistência antimicrobiana e as variáveis independentes foi utilizado o teste do Qui-Quadrado com nível de significância de 5%. As espécies encontradas com mais frequência foi *S. epidermidis* 80/354 (22,6%), dentre os SCN, enquanto que *S. aureus* foi à espécie mais comum entre SCP 122/195 (62,6%) e as espécie mais isoladas dentre as demais. Foram observadas as maiores percentuais de resistência para, PEN (38,62%), ERY (22,22%) e TET (18,58%). Contudo os antimicrobianos Pen, Tet, Oxa, Cli, Eri, Lin e Van obtiveram diferença significativa ($P < 0,05$) quando comparados suas frequências entre os grupos SCN e SCP, obtendo um maior percentual de resistência para o SCN. A Multirresistência foi observada em 21/195 SCP e em 71/354 SCN. Dentre os isolados de *Staphylococcus*, 291 apresentaram perfil de resistência enquanto 258 foram pan- susceptíveis aos determinados antimicrobianos estudados. O estudo

gerou um total de 51 perfis de resistências com uma maior prevalências para os perfis: Pen (12,75%), Pen/Tet (7,83%), Pen/Mac (5,65%) e Pen/Lin/Mac/Oxa/Gli (2,37%). Diante disso o presente estudo oferece subsídios quanto ao perfil de resistência aos antimicrobianos, a partir das concentrações inibitórias mínimas, contribuindo dessa forma para o tratamento e controle das infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus* nos rebanhos estudados.

Palavras-chave: multirresistência, leite, queijo, CIM.

ABSTRACT

SILVA JÚNIOR, ABIMAEEL ESTEVAM. **Antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus* spp. of dairy origin. 2016.** 44 p. Master Thesis (Masters in Animal Science). Agricultural Sciences Center. University of Paraíba, Areia, PB, 2016.

The intramammary infection is considered a disease that causes great economic losses to dairy industry due to discarded milk, drug costs and technical assistance, reducing the quantity and quality of milk and its derivatives. Moreover, it presents serious problem to public health when conveys resistant microorganisms to human population. Due to lack of information about these microorganisms it is difficult to assess the impact of contaminated food on public health. To that end, this paper aimed to investigate the antimicrobial resistance patterns in *Staphylococcus* spp. grown from samples of cow and goat milk and goat cheese, as well as determine the minimum inhibitory concentration (MIC) for the tested antimicrobials. A total of 549 isolates of *Staphylococcus* spp. were analyzed, among those, 195 were coagulase-positive and 354 were coagulase-negative, which were from different states of the Northeast. Antimicrobial resistance was evaluated by broth microdilution method using a semi-automated system (Autoscan4® Siemens) determining the MIC for the antimicrobial agents in the following dilutions: amoxicillin/clavulanate [Aug] (2.4 µg/ml), gentamicin [Gen] (4 - 8 µg/ml), clindamycin [Cli] (0.5 - 4 µg/ml), Ciprofloxacin [Cip] (1 - 2 µg/ml), erythromycin [Eri] (0.5 - 4 µg/ml), oxacillin [Oxa] (0,25 - 2 µg/ml), penicillin G [Pen] (0,03 - 8 µg/ml), linezolid [Lin] (1 - 4 µg/ml), trimethoprim/sulfamethoxazole [T/S] (0,5/9,5 - 2/38 µg/ml), tetracycline (4 - 8 mg/mL) and vancomycin [Van] (0,25- 16 µg/ml). To evaluate possible associations between antimicrobial resistance and the independent variables we used chi-square test with 5% significance level. The most frequent species were *S. epidermidis* 80/354 (22.6%) among the SCN, whereas *S. aureus* was the most common specie of SCP 122/195 (62.6%) and the most isolated specie among the others. The highest resistance rates were observed for, PEN (38.62%), ERY (22.22%) and TET (18.58%). However the antimicrobial Pen, Tet, Oxa, Cli, Eri, Lin and Van had significant difference ($P < 0.05$) when compared their frequencies between the SCN and SCP groups, obtaining a higher percentage of resistance to SCN. Multidrug resistance was observed in 21/195 SCP and in 71/354 SCN. Among *Staphylococcus* isolates, 291 showed resistance profile while 258 were pan-susceptible to certain studied antibiotics. The study generated a total of 51 resistance profiles with a greater prevalence for profiles: Pen (12.75%), Pen/Tet (7.83%), Pen/Mac (5.65%), and Pen/Lin/Mac/Oxa/Cli (2.37%). Thus this study provides grants on the resistance profile to

antimicrobials from the minimum inhibitory concentrations, thereby contributing to the treatment and control of intramammary infections caused by *Staphylococcus* in the studied herds.

Keywords: multidrug resistance, milk, cheese, MIC.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	1
2.	REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1	Infecção intramamária	3
2.1.1	Etiologia	4
2.1.1.1	Contagiosos	4
2.1.1.2	Ambiental	5
2.1.2	Diagnóstico da infecção intramamária bacteriana.....	5
2.1.3	Tratamento.....	6
2.2	Microbiologia do leite.....	6
2.3	Gênero <i>Staphylococcus</i> spp.	8
2.3.1	Caracterização do gênero	8
2.3.2	Identificação fenotípica e genotípica.....	9
2.4	Sensibilidade antimicrobiana <i>in vitro</i>	10
2.5	Resistência antimicrobiana	12
2.5.1	Resistência aos beta-lactâmicos.....	14
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1	Amostragem	16
3.2	Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos	17
3.2.1	Método de Microdiluição em Caldo.....	17
3.3	Análise dos dados	17
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
5.	CONCLUSÃO.....	29
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	30
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	31

1. INTRODUÇÃO

As infecções intramamárias caracterizam-se pela inflamação da glândula mamária do animal, com etiologia complexa e multivariada, se fazendo necessário uma identificação do microrganismo causador e sua suscetibilidade antimicrobiana, tanto para fins de controle e prevenção, quanto para o monitoramento dos rebanhos.

A infecção intramamária é considerada uma enfermidade que acarreta grandes prejuízos econômicos à atividade leiteira, em decorrência do descarte do leite e dos custos com medicamentos e assistência técnica, reduzindo a quantidade e a qualidade do leite e dos seus derivados. Além disso, representa sério problema de saúde pública quando veicula microrganismos patogênicos resistentes para a população humana. Durante os últimos anos, soluções simples têm permitido controlar pontualmente a ocorrência deste enfermidade em alguns rebanhos, porém, ela continua representando um dos problemas mais difíceis na produção leiteira mundial.

Para o tratamento de tal enfermidade, são utilizados antibióticos de largo espectro, aplicados preferencialmente pela via intramamária, esgotando-se previamente o teto afetado. Entretanto, o amplo e indiscriminado uso de antibióticos pode conduzir a seleção de microrganismos resistentes, e bactérias inerentemente resistentes podem tornar-se predominantes em uma população e transferir material genético para bactérias suscetíveis, que então adquirem resistência (QUINN et al., 2005).

A resistência aos antibióticos é inevitável e irreversível uma consequência natural da adaptação da célula bacteriana a exposição aos antibióticos, sendo um fenômeno genético, relacionado à existência de genes contidos no microrganismo que codificam diferentes mecanismos bioquímicos que impedem a ação das drogas. O uso intenso de antimicrobianos na medicina humana e veterinária, na produção animal e na agricultura tem causado um aumento na resistência a estas drogas o que torna um sério problema de saúde pública no mundo.

O leite por ser um dos mais nobres produtos de origem animal, notadamente pelo seu elevado valor nutricional, bem como seus derivados que, igualmente, se constituem em alimentos de alto valor nutritivo, e fonte de renda para os diferentes segmentos da cadeia produtiva é motivo de preocupação por ser uma provável fonte de propagação dessas bactérias resistentes para a população humana.

Nas últimas décadas é notória a preocupação com a qualidade e inocuidade desses produtos e subprodutos de origem animal consumido pela população. Esta tendência mundial fomentou o crescimento significativo, em vários países, das propriedades rurais de produção, das quais o leite e derivados figuram dentre os principais itens de interesse comercial. Desta forma, é de extrema importância o isolamento e identificação desses agentes em laboratório, como prova definitiva no diagnóstico das enfermidades e, a análise *in vitro* da sensibilidade antimicrobiana, contribuindo para um melhor controle, com a utilização de terapêutica adequada, além de promover um decréscimo na resistência aos antibióticos.

Dentre os microrganismos resistentes aos antibióticos encontrados no leite e produtos lácteos, o gênero *Staphylococcus* representa uma grande preocupação devido à sua virulência intrínseca, principalmente associada à produção de enterotoxinas (GUCUKOGLU et al., 2013), e a capacidade de adquirir resistência a várias classes de antibióticos sendo um microrganismo de importância epidemiológica (RIZEK et al., 2011; SPANU et al., 2012) contribuindo com as crescentes taxas de mortalidade, acarretando prejuízos na economia por aumentar os custos com a saúde.

Portanto, o presente estudo tem como objetivo investigar o perfil de resistência aos antimicrobianos em isolados do gênero *Staphylococcus* cultivados a partir de leite bovino e caprino e queijo caprino, assim como avaliar a resistência antimicrobiana em *in vitro* e determinar a concentração inibitória mínima (CIM) dos antimicrobianos testados.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Infecção intramamária

A infecção intramamária é considerada a doença que acarreta os maiores prejuízos econômicos à atividade leiteira, pela redução da quantidade e pelo comprometimento da qualidade do leite produzido, ou até pela perda total da capacidade secretora da glândula mamária. Caracteriza-se pela inflamação da glândula mamária, geralmente de caráter infeccioso, podendo ser classificada como clínica ou subclínica (RIBEIRO et al., 2003).

A resposta inflamatória que se desenvolve no interior do úbere tem a finalidade de destruir ou neutralizar os agentes infecciosos, suas toxinas e permitir que a glândula mamária retome a sua produção normal. Pode ocorrer destruição de células epiteliais, responsáveis pela síntese dos principais constituintes do leite, como proteína, gordura e lactose, com redução da capacidade produtiva do animal (BRITO et al., 2002).

A infecção intramamária na sua forma clínica apresenta sinais evidentes como: edema, aumento da temperatura, endurecimento e dor na glândula mamária, além da presença de grumos, pus ou qualquer alteração das características físicas do leite (FONSECA; SANTOS, 2001; RIBEIRO et al., 2003). É a forma menos frequente e, geralmente, ocorre após a parição (LADEIRA, 2007). A forma subclínica é a mais prevalente, onde não ocorrem alterações macroscópicas, resultando em queda na produção leiteira, alterações na composição do leite e aumento na contagem de células somáticas (CCS), sendo necessário realizar testes auxiliares para o seu diagnóstico e o exame bacteriológico como método de identificação definitivo (CULLOR et al., 1994; RIBEIRO et al., 2003).

Enquanto a forma clínica pode ser visualmente perceptível, recursos indiretos de diagnóstico são necessários para identificar a infecção intramamária subclínica, o que favorece a disseminação desta no rebanho e proporciona ao produtor uma falsa tranquilidade em relação à ocorrência desta doença. No entanto, estima-se que para cada caso clínico da enfermidade ocorram 35 subclínicos (FONSECA; SANTOS, 2001; BUENO et al., 2002).

Pode ser ainda dividida quanto ao seu tipo de agente patogênico, podendo ser classificada, em contagiosa e ambiental. Na contagiosa, os agentes etiológicos necessitam do animal para sobreviverem, pois se multiplicam na glândula mamária, canal do teto ou sobre a pele. A transmissão ocorre de um animal infectado para outro sadio, principalmente durante a ordenha (PRESTES et al., 2003). Caracterizam-se por apresentarem alta incidência de casos subclínicos, com tendência a cronicidade e elevada CCS (FONSECA; SANTOS, 2001; SILVA, et al., 2001).

A infecção intramamária ambiental é causada por agentes que vivem preferencialmente no hábitat do animal, em locais que apresentam esterco, urina, barro e matéria orgânica (FREITAS et al., 2005). Este tipo caracteriza-se por alta incidência de casos clínicos (geralmente de curta duração) e frequentemente com manifestação aguda, ocorrendo em maior concentração nos momentos de pré e pós-parto imediato (ERSKINE, 1988).

2.1.1 Etiologia

A etiologia é complexa e multivariada, o que torna necessária a identificação dos microrganismos que causam a infecção da glândula mamária, tanto para o controle e a prevenção, quanto para o monitoramento dos rebanhos (RIBEIRO et al., 2003). Porém, pode ser de origem tóxica, traumática, alérgica, metabólica ou infecciosa. Os microrganismos são os agentes etiológicos mais comuns e as bactérias as mais envolvidas, destacando-se as bactérias do gênero *Staphylococcus* (FREITAS et al., 2004), tanto para a forma clínica e subclínica, além do isolamento frequente de *Streptococcus* spp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas* e *Mycoplasma* (CONTRERAS et al., 2003).

Aproximadamente 95% das infecções que resultam em infecção intramamária são causadas pelas bactérias *Streptococcus agalactiae*, *S. aureus*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* e *Escherichia coli*. Os outros 5% são causadas por outros microrganismos. Os microrganismos causadores da mastite são comumente classificados em dois grupos: os contagiosos e os ambientais (BRITO; SALES, 2007).

2.1.1.1 Contagiosos

Os principais microrganismos pertencentes a esse grupo são: *S. agalactiae*: habita o úbere e não sobrevive fora da glândula por longos períodos e, uma vez eliminado, não é novamente isolado dos animais, a não ser que o animal infectadas sejam incorporadas ao rebanho (BRITO; SALES, 2007).

S. aureus: é encontrado no úbere, na pele e pelo dos animais, em abscessos, feridas, na pele do homem e de vários animais. Dificilmente é eliminado de um rebanho, mas pode ser controlado efetivamente com bons procedimentos de manejo especialmente durante a ordenha (BRITO; SALES, 2007). Alguns casos severos de infecção estafilocócica podem resultar em morte do animal.

S. dysgalactiae: pode habitar praticamente qualquer ambiente: úbere, pele, rúmen, fezes, currais. Podem ser controlados com medidas adequadas de higiene (BRITO; SALES, 2007).

Mycoplasma bovis: é um microrganismo peculiar, ocupando uma posição intermediária entre as bactérias e os vírus. Como não possui parede celular como as bactérias, não são afetados pela maioria dos antibióticos que atuam na formação da parede celular. Como não existe um tratamento eficaz disponível, a melhor maneira de controlar esse patógeno é evitar sua introdução no rebanho através de animais infectados. Felizmente, no Brasil os casos de infecção por esse agente são raros (BRITO; SALES, 2007).

2.1.1.2 Ambiental

Os principais microrganismos desse grupo são: *Escherichia coli*: são habitantes normais do trato intestinal de todos os animais. São encontradas principalmente nos dejetos, em águas poluídas e em camas de material orgânico contaminadas com fezes. O tratamento antibiótico tem pouco efeito nesses microrganismos porque em geral são resistentes à maioria deles (BRITO; SALES, 2007).

S. uberis: habitam todos os espaços da fazenda: fezes, úbere, pele dos animais, rúmen. Podem ser controlados pela manutenção de úberes sempre secos, ambiente de ordenha limpo e higiene geral adequada (BRITO; SALES, 2007).

Pseudomonas aeruginosa: habitam ambientes úmidos e enlameados. Frequentemente são introduzidas na glândula mamária da vaca como resultado de tratamentos intramamários realizados de forma errada. Por isso, devem ser tomados cuidados especiais sempre que se inocular qualquer medicamento por via intramamária. São resistentes à maioria dos antibióticos, mas seu controle pode ser realizado com adoção de bons procedimentos higiênicos (BRITO; SALES, 2007).

2.1.2 Diagnóstico da infecção intramamária bacteriana

O diagnóstico do processo inflamatório da glândula mamária inicia-se com a inspeção do úbere, feita pela palpação para a detecção de anormalidades no tecido mamário, como a presença de nódulos difusos no parênquima, consistência endurecida da glândula e aumento da temperatura local, assim como pela inspeção visual do leite, realizada pelo uso da Caneca Telada ou Tamis para a visualização de alterações macroscópicas no leite, como grumos, pus,

estrias de sangue ou coloração alterada (*National Mastitis Council* - NMC, 1999). Nas formas agudas e crônicas, observa-se o aparecimento súbito de febre (40° a 42°C), perda de apetite, apatia, dispneia e dificuldade locomotora (MOTA, 2008).

A infecção intramamária na sua forma subclínica pode ser detectada pela contagem direta ou indireta de células somáticas no leite, sendo o *California Mastitis Test* (CMT) um dos testes mais aplicados, devendo ser realizado antes da ordenha, logo após o descarte dos primeiros jatos de leite. Este método utiliza um detergente que ao reagir com o material genético das células somáticas forma um gel que tem a sua consistência graduada em escores aritméticos, sendo 0, para as reações negativas (sem reação entre o reagente e o leite), traços (suspeita), 1+ (fracamente positiva), 2+ (positiva) e 3+ (fortemente positiva), respectivamente (SANTOS et al., 1995; SILVA et al., 2001). No entanto, para evitar resultados falso-positivos e devido à fisiologia da glândula mamária da espécie caprina, o CMT deve ser associado ao exame microbiológico do leite (BEZERRA et al., 2006; CHAPAVAL, 2007), que tem como objetivo a identificação do agente etiológico mediante cultivo e posterior prova de sensibilidade a antimicrobianos (MOTA, 2008).

2.1.3 Tratamento

O tratamento da mastite subclínica não é recomendado devido ao baixo sucesso alcançado. Em casos de infecções recorrentes ou crônicas, os animais devem ser substituídos ou descartados (MOTA, 2008), e na mastite clínica o uso de antibióticos de largo espectro é recomendado, aplicados preferencialmente pela via intramamária, esgotando-se previamente o teto afetado, ou se necessário, via sistêmica (MACIEL, 2006).

Devido à grande diversidade de agentes patogênicos envolvidos na etiologia da infecção intramamária, o ideal é que seja feito o cultivo, isolamento e antibiograma para melhor indicação terapêutica; uma vez que o emprego exagerado e indiscriminado de antibióticos conduz a resistência antimicrobiana (GERMANO; GERMANO, 2003; LADEIRA, 2007).

2.2 Microbiologia do leite

O leite é um alimento considerado de elevado consumo em todo o Brasil, principalmente por crianças e idosos, por apresentar um elevado valor nutricional como vitaminas, gorduras, proteínas, carboidratos, sais minerais e água, podendo ser considerado fundamental para a dieta humana (SALVADOR, et al., 2012).

Devido a esta riqueza nutricional, o leite torna-se um meio ideal para o crescimento de diferentes microrganismos. Esta contaminação se inicia durante a ordenha pelos microrganismos presentes no teto da vaca, e depois do meio ambiente, pela ordenha realizada de forma manual ou ordenha mecânica por meio dos equipamentos e utensílios utilizados sem a higienização correta, também transporte, armazenamento e distribuição (SALVADOR, et al., 2012).

No Brasil, de modo geral, o leite é obtido sob condições higiênico-sanitárias deficientes, e em consequência, apresenta elevados números de microrganismos, o que constitui um risco à saúde da população, principalmente quando consumido sem tratamento térmico. (CATÃO; CEBALLOS, 2001).

Um dos maiores problemas, segundo SCHUSTER et al., (2006), é a oferta deste produto de forma “*in natura*” ao consumidor sem qualquer inspeção sanitária. Uma prática comum onde a venda se faz de forma que o leite não é pasteurizado, transportado em caminhões, motos e bicicletas, armazenados em garrafas descartáveis sem refrigeração e sem controle higiênico-sanitário. Para SILVA et al., (2004), este controle é fundamental, desde a obtenção de leite cru nas propriedades rurais até a embalagem do produto final, pois a sua produção de forma higiênica inadequada torna o alimento um veículo de transmissão de doenças aos consumidores.

A deficiência no controle sanitário do rebanho leiteiro, a falta de higiene durante a ordenha, a ausência de uma infraestrutura adequada de transporte até as indústrias e a precariedade dos sistemas de refrigeração são fatores que contribuem para diminuir a qualidade microbiológica do leite (PADILHA et al, 2001).

O controle microbiológico do leite e produtos lácteos torna-se importante para a saúde do consumidor. A multiplicação de bactérias torna este alimento impróprio para o consumo humano, pois provoca alterações químicas das gorduras, açúcares e proteínas modificando as suas características normais assim como pode vincular microrganismo patogênicos muitas vezes resistentes a diversas classes de antimicrobianos. Esta contaminação com alguns tipos de microrganismos e/ou suas toxinas constitui uma das causas mais frequentes de problemas sanitários e perdas econômicas e saúde pública (PADILHA et al, 2001).

O leite pode se tornar um alimento seguro para o consumo por meio da pasteurização. Este processo visa à destruição dos microrganismos causadores de doenças presentes no alimento, sem alterar as características próprias do produto. A quantidade de microrganismos encontrados após esse processo é influenciada pela quantidade de microrganismos presentes

no leite cru, antes do processo. A pasteurização elimina uma grande quantidade de bactérias, mas não se obtém a esterilização do alimento. Por este motivo, tornam-se imprescindíveis os cuidados com a contaminação do leite durante a ordenha e a refrigeração adequada para diminuir a multiplicação celular microbiana e obter-se um produto de qualidade após a pasteurização (SALVADOR, et al., 2012).

A maioria dos microrganismos contaminantes do leite são bactérias, apesar de que algumas leveduras e bolores também serem capazes de se desenvolverem (WALSTRA et al., 2006). Quando as contagens totais de bactérias, ainda são baixas, no leite cru o conteúdo bacteriano é dominado por micrococcos e estreptococos (CHAMBERS, 2002). Estes grupos fazem parte da microbiota normal do úbere, tetos e pele dos animais. À medida que o número de bactérias começa a aumentar, a dinâmica da população também é substancialmente alterada. O crescimento é limitado pelo resfriamento, armazenamento adequado e concorrência das bactérias não patogênicas. Desse modo, o risco potencial apresentado por eventuais patógenos depende do nível da contaminação inicial (FRANK; HASSAN, 2003).

No Brasil, os produtos de origem animal devem ser processados em indústrias obrigatoriamente sob Inspeção seja ela federal, estadual ou municipal e assim são amostrados e analisados pela rede de laboratórios oficiais, seguindo a legislação vigente que torna a enumeração desses microrganismos de suma importância propiciando a formação de uma coleção abrangente de isolados bacterianos, que pode ser utilizada para monitorar a contaminação e o desenvolvimento de resistência microbiana.

2.3 Gênero *Staphylococcus* spp.

2.3.1 Caracterização do gênero

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são cocos gram positivos, anaeróbios facultativos e não formadores de esporos. São microrganismos imóveis, pequenos com 0,5-1,5 μ de diâmetro e, quando observados ao microscópio, pode apresentar-se em diversas formas, que vão desde isolados aos pares, em cadeias curtas ou agrupados irregularmente (cachos de uva). Existem 49 espécies descritas e 26 subespécies pertencentes a este gênero (LPSN, 2014), colonizando diferentes ambientes e espécies animais. As espécies que compõem o gênero *Staphylococcus* são divididas de acordo com a capacidade de sintetizar a enzima coagulase em dois grupos: coagulase positivos (SCP) e coagulase negativos (SCN). A produção de coagulase está ligada à virulência dos SCP, pois, liga-se a proteína plasmática e

catalisa a transformação de fibrinogênio em fibrina, formando uma rede de proteção, mecanismo este que, impede a fagocitose (KONEMAN et al., 2010).

Os *Staphylococcus* spp., são produtores da enzima catalase, a qual tem capacidade de modificar o peróxido de hidrogênio (BAIRD PARKER, 1963). Além disso, apresentam fatores de virulência como cápsula, peptidoglicano, proteína A, adesinas, enzimas extracelulares, leucocidinas e hemolisinas (SPANU et al., 2012). Para o isolamento de *Staphylococcus* spp., o meio seletivo mais utilizado é o manitol salgado, o qual é aproveitado aerobiamente e anaerobiamente por cepas produtoras de coagulase (BAIRD PARKER, 1963). É capaz de formar colônias amarelas em meio enriquecido além de produzir α e beta-hemólise em placas de ágar sangue desfibrinado de carneiro a 5% (PINCHUK et al., 2010).

2.3.2 Identificação fenotípica e genotípica

A identificação de *Staphylococcus* spp. tem sido tradicionalmente realizada através de métodos fenotípicos, com base em suas características morfofisiológicas e bioquímicas. Para a identificação do gênero, utiliza-se a coloração de Gram para observar as características morfotintoriais; e por meio do teste de produção de catalase. A identificação das espécies é realizada através de painel de fermentação de açúcares e testes bioquímicos, como a prova de produção de coagulase. No entanto, bactérias com comportamento bioquímico atípico representam um problema na acurácia da identificação realizada apenas através de testes fenotípicos (KONEMAN et al., 2010).

Os avanços no diagnóstico e caracterização molecular tem proporcionado o desenvolvimento de testes genotípicos importantes para a adequada identificação e caracterização dos *Staphylococcus* spp. A taxonomia do gênero foi esclarecida nos últimos anos devido, à utilização de técnicas moleculares que permitiram relacionar os resultados dos testes fenotípicos e genotípicos (LANGE et al., 2011).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) possibilitou a detecção de microrganismos que não podiam ser cultivados, assim como aqueles que eram fastidiosos ou de crescimento lento. A técnica também tem sido utilizada para identificação de microrganismos, incluindo *Staphylococcus* spp. (SASAKI et al., 2010). Dessa forma, na última década, a PCR tornou-se o método genético mais utilizado em diagnóstico microbiológico (MALORNY et al., 2003). Várias modificações da PCR foram descritas, dentre essas, destaca-se a Multiplex PCR (mPCR), através da qual é possível a identificação de dois ou mais genes concomitantemente (TANG et al., 1997).

2.4 Sensibilidade antimicrobiana *in vitro*

O surgimento de novos mecanismos de resistência bacteriana, nem sempre detectados pelos métodos rotineiramente utilizados, tem levado os laboratórios de microbiologia a reavaliar esses métodos. Muitas vezes, é necessária a adoção de testes complementares, o que acarreta maior custo e lentidão (DIJKSHOORN; TOWNER, 2001).

Técnicas de fenotipagem e genotipagem são necessárias para a detecção. As primeiras consistem na avaliação das características expressas pelos microrganismos, ou seja, que resultam da expressão de genes e que podem sofrer variações, decorrentes de mudanças nas condições de crescimento, fase de crescimento e mutação espontânea. As demais envolvem a detecção de genes carregados pelos microrganismos (DIJKSHOORN; TOWNER, 2001).

Os métodos fenotípicos podem não ser suficientes para confirmar a presença de um mecanismo de resistência bacteriana. No entanto, hoje estão disponíveis os métodos moleculares de diagnóstico, que caracterizam os genes responsáveis pela codificação dos mecanismos de resistência. Estes métodos têm se tornado o padrão-ouro para a detecção de amostras resistentes, porém requerem equipamentos e reagentes especiais, além de técnicos especializados, o que dificulta a sua implantação nos laboratórios de rotina (DIJKSHOORN; TOWNER, 2001).

Uma alternativa aos testes moleculares genotípicos é a utilização de testes de triagem fenotípicos, que são capazes de detectar, com boa acurácia, bactérias resistentes. Estes testes podem utilizar-se de três métodos básicos: diluição em caldo, diluição em ágar e difusão com discos. Na diluição em caldo são utilizadas diluições seriadas do antimicrobiano, com uma suspensão padronizada da bactéria, determinando a concentração inibitória mínima (CIM) a partir do tubo contendo a mais baixa concentração do agente capaz de inibir o crescimento do germe, sendo esse fato detectado pela ausência de turvação indicativa de crescimento bacteriano.

Na diluição em ágar, placas com diferentes concentrações são testadas a fim de inibir o crescimento bacteriano seguindo o mesmo princípio da diluição em caldo. No disco difusão que é ainda o método mais empregado na rotina de microbiologia baseia-se na inibição do crescimento de um microrganismo na superfície de ágar frente a discos de papel empregnados com antimicrobianos de concentração padronizada exemplo desse método é o famoso método de Kirby- Bauer (SANTOS FILHO, 2006).

Uma técnica mais recentemente desenvolvida que passa ser uma modificação dos métodos de difusão com discos e diluição em ágar que supera as principais desvantagens

desses métodos mantendo as principais características de ambos e o E- teste que consiste em uma estreita fita de plástico (50x5mm) contendo concentrações pré- definidas do antimicrobiano, tecnicamente simples, não necessitando de equipamentos especiais, e a metodologia é semelhante ao método da difusão com disco (SANTOS FILHO, 2006).

Os métodos para determinação da sensibilidade antimicrobiana sofreram significantes mudanças nos últimos anos. Mais recentemente tem surgido novos testes de determinação da resistência bacteriana aos antimicrobianos, destacando-se os sistemas automatizados E semi-automatizado que apresenta a vantagem de possuir um detalhamento técnico bem definido e fornecimento de dados quantitativos com a determinação da concentração inibitória mínima e identificação bacteriana mudando de múltiplos passos para procedimentos de uma única etapa com ênfase na velocidade, padronização, reprodutibilidade e, acima de tudo, automação (NCCLS, 1997; SANTOS FILHO, 2006; OLIVEIRA, et al., 2012).

A indicação terapêutica deve levar em consideração os valores obtidos pelas CIM, pois o tratamento deve proporcionar níveis de antimicrobianos maiores do que a CIM no local da infecção. Com essa informação, o veterinário clínico poderá realizar a terapia de maneira correta, de modo a alcançar os benefícios esperados, tanto para a saúde do animal como para o controle das infecções (BRITO et al., 2001).

Os resultados de concentração inibitória mínima dos antibióticos fornecem dados importantes e podendo dar suporte na escolha do antimicrobiano adequado para tratamento da infecção intramamária bem como auxiliar no controle dessa enfermidade em determinada região (GARINO JÚNIOR et al., 2011).

Desta maneira os métodos fenotípicos apresentam a desvantagem de analisar somente as características expressas pelo genótipo do organismo em um determinado momento podendo ou não refletir a relação filogenética atual entre um grupo de isolados (DIJKSHOORN; TOWNER, 2001). Portanto, o desenvolvimento de métodos genotípicos permitem a análise da genética microbiana minimizando assim as desvantagens advindas dos métodos fenotípicos, principalmente em relação a reprodutibilidade e tipacidade das técnicas, e em alguns casos, também proporcionam o desenvolvimento de bases de dados com a caracterização de vários microrganismos (OLIVE; BEAN, 1999).

2.5 Resistência antimicrobiana

No início de 1940, os agentes antimicrobianos foram introduzidos pela primeira vez em uso clínico para controlar infecções bacterianas em seres humanos. O sucesso em humanos levou a sua introdução na medicina veterinária na década de 1950, ao ser utilizado em animais de companhia e atualmente, os agentes antimicrobianos são também utilizados de forma generalizada inclusive em animais de produção, e alguns são usados para controlar doenças em plantas (WIELINGA et al., 2014).

Os antimicrobianos inicialmente eram usados como medida terapêutica, mas com o avanço do conhecimento e desenvolvimento de novos compostos, eles passaram a ser utilizados como medida preventiva e como promotores do crescimento. Seu uso garantiu os altos índices de produtividade obtidos nas últimas décadas, e também a redução da mortalidade e morbidade, e a manutenção do bem-estar animal. A utilização de antibióticos é considerada indispensável nos sistemas atuais de produção. Eles são amplamente utilizados em todas as fases de produção, ou ciclo de vida dos animais (PRESCOTT, 2008).

Desde 1950, os promotores de crescimento têm sido intensamente aplicados na ração para animais, independentemente do estado de saúde ou do risco de infecção bacteriana. Para utilização dos promotores de crescimento os agentes antimicrobianos são adicionados à ração animal, em concentrações sub terapêuticas (WIELINGA et al., 2014).

Na década de 1990, o uso destes como promotores de crescimento, levou a níveis alarmantes de resistência bacteriana em animais, que como qualquer outro microrganismo zoonótico, pode se espalhar para os seres humanos e se tornar um risco para a saúde humana. Esta situação ocorreu em muitos países; no entanto, particularmente na Dinamarca, atraiu muita atenção e tem sido bem documentada (AARESTRUP et al., 2010; HAMMERUM et al., 2007).

A antibioticoterapia é usualmente utilizada como primeira opção no tratamento de diversas enfermidades na medicina veterinária e humana. Atualmente, uma variedade de drogas com princípios ativos diferentes são encontrados no mercado, tornando-se muito importante a avaliação da eficácia desses medicamentos frente aos microrganismos causadores destas enfermidades (SCHWARZ, 2001).

O seu uso maciço, e frequentemente inadequado, promove a emergência e seleção de bactérias resistentes e multirresistentes, existindo evidência de associação, consistente e estatisticamente relevante, entre o nível de consumo de classes específicas de antibióticos e a resistência bacteriana a essas mesmas classes. É crescente, a nível mundial, a resistência aos

antimicrobianos, existindo bactérias apenas suscetíveis a poucos antibióticos e, como tal, causadoras de infecções de tratamento extremamente difícil (PAIVA et al., 2014).

O aparecimento da resistência antimicrobiana foi, e provavelmente continuará a ser um dos grandes problemas da medicina, pois é causada pela mutação espontânea e recombinação de genes, que criam variabilidade genética sobre a qual atua a seleção natural dando vantagens aos mais aptos. As drogas atuam como agentes seletivos. O termo resistente se refere àqueles microrganismos que não se inibem pelas concentrações habitualmente alcançadas no sangue ou tecidos do correspondente antimicrobiano, ou aqueles que apresentam mecanismos de resistência específicos para o agente estudado ao qual não havia uma adequada resposta clínica quando usado como tratamento (WEN CHEN et al., 2014).

O uso destes antimicrobianos na clínica veterinária de forma indiscriminado contribui com o aumento progressivo da resistência bacteriana o que torna um sério problema do ponto de vista clínico e de saúde pública, devido ao tratamento dos animais tornarem seus produtos e derivados fonte de resistência bacteriana na espécie humana (WIELINGA et al., 2014).

Dados recentes mostram que a resistência antimicrobiana em bactérias e animais em formas de alimentos tem se tornado um problema crescente para a saúde humana (DANMAP, 2010; ECDC, 2010; AARESTRUP, 2012). Em particular, o surgimento de cepas bacterianas multirresistentes e estirpes resistentes a alguns antimicrobianos considerados criticamente importantes na medicina humana é motivo de preocupação (KUMARASAMY et al., 2010; POTRON et al., 2011; WHO, 2011). Esta situação aplica-se a antimicrobianos tanto de uso em animais como em seres humanos (BOGAARD & STOBBERINGH, 2000).

Através dos produtos de origem animal, contato direto, e de fatores ambientais, bactérias e outros microrganismos de animais podem infectar seres humanos, e vice-versa (PRICE et al., 2012). Como muitas bactérias são comensais não patogênicas (parte da microbiota normal), ou hospedeiro específico, e não sobreviverem em hospedeiros diferentes, grande parte desse intercâmbio passa despercebido. No entanto, a troca de microrganismos zoonóticos capazes de viver, tanto em seres humanos e animais podem causar problemas, quer diretamente, devido à natureza do microrganismo patogênico, ou porque uma infecção oportunista prejudicial desenvolve durante o tratamento antimicrobiano (WIELINGA et al., 2014).

A inexistência ou a não utilização de protocolos terapêuticos têm resultado em grande diferença nos padrões de prescrição, ocasionando insucesso terapêutico e recidivas de infecções, situações frequentemente encontradas no meio animal (DEL FIOLE et al., 2010).

Desta forma a seleção de um agente antimicrobiano adequado é um importante passo em qualquer regime terapêutico. Estes podem ser classificados em substâncias de amplo espectro, que pode inibir o crescimento ou mesmo matar uma vasta gama de bactérias e substâncias de pequeno espectro, que são mais específica para o tratamento de agentes patogênicos de determinados gêneros ou espécies. É de fundamental importância a escolha do agente antimicrobiano, a partir da confirmação laboratorial do agente patogênico, assim como uma exata avaliação da sua sensibilidade *in vitro* aos antimicrobianos (SCHWARZ, 2001).

2.5.1 Resistência aos beta-lactâmicos

A resistência microbiana constitui atualmente o maior desafio no tratamento das doenças infecciosas. Continua a ser uma grande ameaça para a saúde pública, e o gênero *Staphylococcus* é uma das chaves para este problema. Frequentemente encontrado como microbiota natural da pele, nariz e boca dos seres humanos e dos animais, estas bactérias oportunistas podem causar uma série de doenças, desde uma infecção simples até doenças que ameaça a vida com elevado potencial de patogenicidade (WALSH & FANNING, 2008). A sua identificação em nível de espécie é importante para orientar a terapia, distinguindo contaminações e identificando potenciais fontes de infecção (AHLSTRAND et al., 2011; MIRRETT et al., 2001). Algumas das quais estão associadas com o aumento da resistência aos antibióticos ou aumento da virulência (KIM et al., 2000; FRANK et al., 2008).

Bactérias pertencentes ao gênero *Staphylococcus* são hospedeiras naturais tanto no homem como em animais. Dentro deste gênero estão os *Staphylococcus aureus* espécie com maior potencial patogênico por apresentar inúmeros fatores de virulência, principalmente a capacidade de expressar vários genes de resistência a antimicrobianos da classe dos beta-lactâmicos (KONEMAN et al., 2010).

Devido à capacidade da bactéria para adquirir genes de resistência, isolados de *S. aureus* de seres humanos e animais ganharam um número considerável de genes de resistência ao longo dos últimos 60 anos (WENDLANDT et al., 2013a). Os *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA), que exercem também numerosos genes de resistência, são de particular interesse (MONECKE et al., 2011).

Inicialmente, em 1940, todas as infecções por *Staphylococcus aureus* eram efetivamente curadas através da penicilina. No entanto, em meados de 1942, já haviam surgidas cepas resistentes (CASSETTARI et al., 2005). Diante disso, introduziu-se em 1959 a meticilina, a qual foi à primeira das penicilinas modificadas e projetadas para resistir à ação

da beta-lactamase. Após dois anos, relatou-se o primeiro caso de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina, mais comumente chamado de MRSA (JEVONS, 1961; FITZGERALD et al., 2001).

A resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos pode ocorrer devido a dois mecanismos distintos: a produção da enzima beta-lactamase, codificada pelo gene *blaZ*, e a produção da proteína ligante de penicilina de baixa afinidade por beta lactâmicos (PBP2a), a qual é codificada pelo gene *mecA* (KATAYAMA; ITO; HIRAMATSU, 2000; GARCÍA-ÁLVAREZ et al., 2011). No primeiro mecanismo, a enzima em questão atua na ruptura do anel beta-lactâmico do antimicrobiano. Já a PBP2a não permite que o anel beta lactâmico se fixe na parede celular e que autolisinas sejam ativadas e degradem a mesma, conduzindo à morte da célula bacteriana (LYON; SKURRAY, 1987).

Como MRSA, os *S. aureus* suscetíveis a meticilina também podem ser transferidos entre humanos e animais em ambos os sentidos através de contato direto e indireto, com alimentos (WENDLANDT et al., 2013b; LASSOK; TENHAGEN, 2013). A este respeito, deve-se notar que os alimentos de origem animal, tais como leite e queijo, constituem um bom meio para a multiplicação destes microrganismos. Para identificar a resistência em alimentos de origem animal, é importante conduzir apropriadamente testes de susceptibilidade antimicrobiana e avaliar os resultados obtidos (SCHWARZ et al., 2010). Além disso, a identificação e caracterização detalhada é necessária para rastrear de maneira confiável a disseminação destes isolados encontrados em animais produtores de alimentos e os alimentos de origem animal para identificar fontes de contaminação ao longo da cadeia alimentar (WENDLANDT et al., 2013b).

A princípio, MRSA eram considerados exclusivos de hospitais (HA-MRSA), representando a principal causa de infecção nosocomial em pacientes imunodeprimidos (DUIJKEREN, et al., 2004; JIMÉNEZ et al., 2012). Entretanto, um fenômeno mais preocupante começou a ser observado a partir da década de 1990: a identificação de MRSA em pessoas sem histórico de exposição ao ambiente hospitalar (MATTEO BASSETTI, 2009). Dessa forma, foram reconhecidos na comunidade os chamados *Staphylococcus aureus* a meticilina resistente comunidade-adquirida ou CA-MRSA (CUNY et al., 2010).

A grande preocupação sobre MRSA decorre do fato dessas bactérias apresentarem resistência a diversos outros antimicrobianos beta-lactâmicos e não beta-lactâmicos, conferindo grande dificuldade de tratamento em caso de infecção (COHN; MIDDLETON, 2010).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostragem

Trata-se de um estudo documental onde se utilizou uma bacterioteca com 549 isolados de *Staphylococcus* associados à mastite subclínica em cabras e vacas em diversas propriedades de base familiar localizadas em três estados do Nordeste (Paraíba, Ceará e Rio Grande do Norte). Os isolados foram previamente obtidos a partir do processamento laboratorial de amostras de leite (Paraíba) e queijo (Ceará e Rio Grande do Norte) das diferentes espécies, realizado no período de junho de 2011 a outubro de 2013, Tabela 1.

As amostras bacterianas estavam armazenadas em glicerol a -80°C , no Laboratório de Avaliação de Produtos de Origem Animal (LAPOA) do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba (CCA/UFPB), localizado no Município de Areia-PB.

Tabela 1. Distribuição dos isolados de *Staphylococcus* spp. utilizados na realização do estudo e seus respectivos percentuais entre os grupos SCP e SCN.

Isolados	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativos (SCN)		<i>Staphylococcus</i> coagulase positivos (SCP)	
	Total	(%)	Total	(%)
<i>S. aureus</i>	-	-	122	22,06
<i>S. intermedius</i>	-	-	23	4,16
<i>S. hycus</i>	-	-	50	9,04
<i>S. epidermidis</i>	80	14,47	-	-
<i>S. simulans</i>	46	8,32	-	-
<i>S. haemolyticus</i>	34	6,15	-	-
<i>S. hominis-hominis</i>	30	5,43	-	-
<i>S. saprophyticus</i>	28	5,06	-	-
<i>S. lugdunensis</i>	27	4,9	-	-
<i>S. sciuri</i>	26	4,7	-	-
<i>S. cohnii cohnii</i>	18	3,25	-	-
<i>S. xylosus</i>	14	2,53	-	-
<i>S. auricularis</i>	12	2,2	-	-
<i>S. wameri</i>	12	2,2	-	-
<i>S. schleiferi</i>	23	4,16	-	-
<i>S. cohnii urea</i>	03	0,54	-	-
<i>S. capitis</i>	01	0,18	-	-
Total	354	64,74%	195	35,26%

SCP: 122 *S. aureus*; 50 *S. hycus*; 23 *S. intermedius*. **SCN:** 80 *S. epidermidis*; 46 *S. simulans*; 34 *S. haemolyticus*; 30 *S. hominis-hominis*; 28 *S. saprophyticus*; 27 *S. lugdunensis*; 26 *S. sciuri*; 18 *S. cohnii cohnii*; 14 *S. xylosus*; 12 *S. auricularis*; 12 *S. wameri*; 23 *S. schleiferi*; 03 *S. cohnii urea*; 01 *S. capitis*;

Fonte: LAPOA/CCA/UFPB.

3.2 Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos

3.2.1 Método de Microdiluição em Caldo

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM), foi realizada pelo método de microdiluição em caldo, com auxílio de equipamento semi-automatizado (Autoscan4®, Siemens), o qual baseia-se na utilização de painéis colorimétricos, fundamentando-se em critérios definidos pela CLSI (2013).

Os isolados congelados no glicerol a 40% a -80°C, foram descongelados repicados em um meio de cultura neutro, o TSA (ágar triptose de soja), colônias foram capturadas com a ajuda de alça bacteriológica específica do Kit Autoscan4 (Prompt), as quais obtinham características morfológicas iguais e, em seguida, misturadas em água plurônica alcançando diluição igual a 0,5 da escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Após diluição, foi feita a distribuição do inóculo em painéis convencionais, os quais foram incubados à 35° C durante 24h. Posteriormente, foi realizada a leitura no Autoscan4, auxiliada pelo sistema operacional LabPro (Siemens). Os antibióticos que compõem o painel (PC33) são: Amoxicilina/clavulanato (4/2 µg/mL), Gentamicina (4-8 µg/mL), Clindamicina (0.5-4 µg/mL), Ciprofloxacina (1-2 µg/mL), Eritromicina (0.5-4 µg/mL), Gentamicina (4-8 µg/mL), Oxacilina (0.25-2 µg/mL), Penicilina (0.03-8 µg/mL), linezolid (1-4 µg/mL) Trimetoprim/Sulfametoxazol (0.5/9.5-2/38 µg/mL), Tetraciclina (4-8 µg/mL), Vancomicina (0.25-16 µg/mL). Como controle, foi utilizado *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

As categorias de resistência foram definidas com base em recomendações de SCHWARZ et al., (2010) que retrata que a sensibilidade *in vitro* para todos os antimicrobianos testados foram classificados como pan- susceptíveis; isolados apresentando resistência a um ou duas classes de antimicrobianos foram classificados como resistentes e isolados exibindo resistência para três ou mais classes de antimicrobianos foram classificados como multiresistentes.

3.3 Análise dos dados

Os resultados encontrados foram tabulados e submetidos à distribuição de frequência em uma análise estatística descritiva, com o uso de planilha eletrônica (Microsoft Excel®). Para avaliar possíveis associações entre a presença da enzima coagulase e o perfil de resistência, e a relação entre as diferentes origens, utilizou-se um teste de Qui-Quadrado ($P < 0.05$) pelo programa computacional SAS® (2007).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisados 549 isolados de *Staphylococcus* spp. recuperados de leite e queijo das diferentes espécies. Destes, 354 (64,48%) foram classificados como SCN, 195 (35,52%) como SCP. Os microrganismos mais prevalentes foram os SCN. Contudo estudos apontam que SCN foi o microrganismo mais isolado de leite de vacas com infecção intramamária (FREITAS et al., 2005; PIESENS et al., 2011). Assim como diversos autores relatam como os principais causadores de infecção intramamária em rebanho caprino leiteiro (SILVA et al., 2004; LANGONI et al., 2006; NEVES et al., 2010).

Na tabela 2 estão distribuídos os isolados de acordo com sua origem em leite caprino 428/549 (77,96%), leite bovino 42/549 (7,65%) e queijo tipo coalho caprino 79/549 (14,39%). Os isolados com maior prevalência em ordem decrescente foram *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. hyicus*. Em estudo recente com *S. aureus* em leite e derivados lácteos, semelhante ao presente estudo mostrou percentuais de resistência 12,8%, 11,1% respectivamente, mostrando o alto nível de contaminação por esses microrganismos em produtos lácteos (JAMALI, et al., 2015).

O *S. epidermidis* o segundo microrganismo mais isolado pertencente ao grupo dos SCN apresentaram uma alta prevalência de resistência para as amostras de leite caprino 61/428 (14,01%) e queijo caprino 14/79 (17,72%) e baixa prevalência em leite bovino 5/42 (11,90%), sendo o microrganismo mais isolado no queijo caprino (Tabela 2). Numa consistente revisão de literatura realizada por CONTRERAS et al., (2007), os autores verificaram que o *S. epidermidis* foi o patógeno mais isolado em animais da espécie caprina a partir de amostras de leite seguido do *S. caprae*. De forma semelhante, MAROGNA et al. (2012) verificaram maior prevalência de *S. epidermidis* nas suas amostras isoladas.

Tabela 2. Distribuição dos isolados de *Staphylococcus* spp. de acordo com a sua origem e identificação a partir de métodos bioquímicos nas espécies caprina e bovina.

Isolados	Leite caprino	Leite bovino	Queijo caprino	Total
<i>S. aureus</i>	96	17	09	122
<i>S. epidermidis</i>	61	05	14	80
<i>S. hyicus</i>	44	04	02	50
<i>S. simulans</i>	45	00	01	46
<i>S. haemolyticus</i>	29	02	03	34
<i>S. hominis hominis</i>	21	05	04	30
<i>S. saprophyticus</i>	17	01	10	28
<i>S. lugdunensis</i>	15	00	12	27
<i>S. sciuri</i>	22	01	03	26
<i>S. intermedius</i>	20	00	03	23
<i>S. schleiferi</i>	16	01	06	23
<i>S. cohnii cohnii</i>	11	02	05	18
<i>S. xylosus</i>	10	01	03	14
<i>S. auricularis</i>	08	03	01	12
<i>S. wameryi</i>	11	00	01	12
<i>S. cohnii urea</i>	02	00	01	03
<i>S. capitis</i>	00	00	01	01
Total	428	42	79	549

Na Tabela 3 estão expressos os resultados da resistência antimicrobiana dos *Staphylococcus* spp. (n=549) isolados de amostras de leite e queijo das diferentes espécies. Os resultados mostram o perfil de resistência geral e, separadamente, para *Staphylococcus* coagulase negativos (SCN) e *Staphylococcus* coagulase positivos (SCP). Esses grupos foram subdivididos, baseando-se na maior porcentagem de isolamento de *S. epidermidis* e *S. aureus* para espécies coagulase negativas e coagulase positivas, respectivamente, além do fato dessas espécies serem as principais causadoras de infecção intramamária nessas espécies.

Tabela 3. Resistência antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus* spp. isolados de amostras de leite e queijo de cabra e leite bovino.

Antimicrobianos	<i>Staphylococcus</i> coagulase Negativos			<i>Staphylococcus</i> coagulase Positivos			P
	<i>S. epidermidis</i>	Outros	Total	<i>S. aureus</i>	Outros	Total	
Amoxicilina/ Clavulanato K	4	21	25(7,06%)	6	0	6(3,08%)	0,0529
Clindamicina	13	61	74(20,9%)	15	4	19(9,74%)	0,0008*
Ciprofloxacina	2	10	12(3,39%)	2	0	2(1,02%)	0,0926
Eritromicina	19	76	95(26,84%)	19	10	29(14,87%)	0,0013*
Gentamicina	2	12	14(3,95%)	7	1	8(4,1%)	0,6947
Linezolid	5	30	35(9,89%)	3	3	6(3,08%)	0,0037*
Oxacilina	10	79	89(25,14%)	1	0	1(0,51%)	<0001*
Penicilina G	60	91	151(42,65%)	53	10	63(32,30%)	0,0174*
Trimetoprim/ Sulfametoxazol	0	0	0(0%)	0	0	0(0%)	
Tetraciclina	44	34	78(22,03%)	20	4	24(12,31%)	0,005*
Vancomicina	6	33	39(11,02%)	7	3	10(5,13%)	0,0206*

De maneira complementar, trimetoprim/sulfametoxazol, ciprofloxacina, gentamicina, amoxicilina/clavulanato de k, linezolid e vancomicina apresentaram elevada susceptibilidade, com índices a partir de 91,26%, podendo esses serem antimicrobianos de eleição para o tratamento de infecções intramamárias na região de estudo. O estudo também mostrou que a provável associação de drogas, potencializa a ação frente aos patógenos já que o trimetoprim/sulfametoxazol obteve percentual de suscetibilidade de 100% dos microrganismos susceptíveis e assim como a amoxicilina/clavulanato de k que obteve percentuais de 94,35%.

Os maiores índices de resistência observados foram à penicilina G, eritromicina e tetraciclina com 38,62 % e 22,22 %, 18,58 % respectivamente. A resistência para os antimicrobianos supracitados pode estar relacionada ao seu uso elevado e indiscriminado na região desse estudo, que possivelmente devido à baixa onerosidade e fácil acesso no mercado pode ter induzindo, portanto, uma resistência bacteriana nos *Staphylococcus* sob investigação. Em um estudo com *Staphylococcus* spp em amostra de leite bovino demonstrou que 90% das cepas eram resistentes à penicilina G sendo o antimicrobiano com o maior índice de resistência (SANTOS et al., 2006). Em Estudo também realizados com a espécie caprina na região Nordeste a partir de rebanhos leiteiros verificaram que a penicilina foi o antimicrobiano associado aos maiores índices de resistência entre *Staphylococcus* spp, com 66,67% (GARINO JÚNIOR et al., 2011).

Em um estudo feito por JAMALI et al., (2015) em uma província do Irã com diferentes origens semelhante ao presente estudo, isolados de *S. aureus*, obtiveram índices de resistência a tetraciclina e a eritromicina de 56,1% e 7,9 % respectivamente, corroborando com o presente estudo onde os mesmos antimicrobianos apresentaram percentuais de resistência a partir de 18,58%.

Ainda de acordo com a (Tabela 3), SCN apresentaram maior resistência estatisticamente ($p < 0,05$) quando comparados aos SCP em relação a 7 dos 11 antimicrobianos testados: clindamicina, eritromicina, linezolid, oxacilina, penicilina G, tetraciclina e vancomicina. Portanto, os SCN mostraram-se como os principais causadores desta elevada resistência, implicando dizer que, além de serem potencialmente causadores de infecções intramamária em cabras e vacas, apresentam um potencial elevado de resistência antimicrobiana. Esta passa a ser uma situação preocupante, pois estes antimicrobianos são frequentemente utilizados para fins terapêuticos, seja em animais como humanos.

Desta forma o uso indiscriminado e irresponsável de antibióticos, na terapêutica ou profilaticamente, em humanos ou animais, tem exercido pressão seletiva, sugerindo-se como resultando a seleção de cepas bacterianas cada vez mais resistentes (Del FIOLE et al., 2010). Por outro lado, a resistência bacteriana também pode ser devido a vários fatores, sendo os principais aqueles relacionados a mutações cromossômicas ou espontâneas que resultam em alteração no sítio-alvo da droga, produção excessiva de enzimas cuja ação é bloqueada pela droga, efluxo da droga, presença de uma segunda enzima que executa a reação metabólica inibida (como no caso dos microrganismos que possuem o gene *mecA*) e produção de enzimas que modificam as drogas (como as β -lactamases).

Na Tabela 4, estão presentes as resistências antimicrobianas de *Staphylococcus* spp. de acordo com a origem em leite caprino, leite bovino e queijo, havendo diferença significativa ($p < 0,05$) para os antibióticos penicilina G, tetraciclina, oxacilina e linezolid quando comparado as três origens (leite caprino, leite bovino e queijo) com maior prevalência de resistência antimicrobiana para amostras de leite caprino.

Tabela 4. Resistência antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus* spp. a diferentes antimicrobianos nas amostras de leite e queijo.

Antimicrobianos	Origem						P
	Leite caprino	%	Leite bovino	%	Queijo	%	
Penicilina G	182	42,52	10	23,81	22	27,85	0,0347*
Eritromicina	105	24,53	6	14,28	13	16,46	0,0533
Tetraciclina	93	21,73	4	9,52	5	6,33	0,0253*
Clindamicina	77	17,99	3	7,14	13	16,46	0,1676
Oxacilina	64	14,95	5	11,9	21	26,58	0,0277*
Vancomicina	42	9,81	2	4,76	5	11,90	0,3361
Linezolid	39	9,11	0	0	2	2,53	0,0492*
Amoxilina/clavulanato K	29	6,78	0	0	2	2,53	0,3487
Gentamicina	21	4,91	1	2,38	0	0	0,5347
Ciprofloxacina	9	2,1	2	4,76	3	3,71	0,0977
Trimetropim/ sulfametoxazol	0	0	0	0	0	0	

Nas amostras de leite os *S. aureus* apresentaram uma maior prevalência 113/470 (24,04%). Existem relatos sobre a ocorrência de cepas de *S. aureus* isoladas de leite bovino associadas a casos de infecção humana e resistentes a vários antibióticos. Devido à capacidade da bactéria para adquirir genes de resistência, isolados de *S. aureus* de seres humanos e animais ganharam um número considerável de genes de resistência ao longo dos últimos 60 anos (WENDLANDT et al., 2013a). O acompanhamento dos perfis de resistência

aos antimicrobianos de *S. aureus* é amplamente utilizado como ferramenta em estudos epidemiológicos de casos de infecção hospitalar em humanos (KADLEC et al., 2015).

Quanto às amostras de queijo os *S. epidermidis* se apresenta em uma maior prevalência 14/79 (17,72%) em relação aos demais isolados. Estudos mostram que o leite caprino tem uma maior predominância de SCN em especial *S. epidermidis* (CONTRERAS et al., 2007; MAROGNA et al., 2012). Com isso o queijo em estudo tem origem de leite caprino podendo ter uma provável relação com essa prevalência de *S. epidermidis*.

Nas amostras de queijo 22/79 (27,85%) dos isolados obtiveram resistência à penicilina G. Em um estudo feito com *Staphylococcus* de queijo tipo coalho por RAPINI et al. (2004) verificou-se uma alta prevalência de resistência a penicilina. O aparecimento dessa resistência antimicrobiana em animais e seus produtos constitui um risco para a saúde, já que através desses alimentos, contato direto e através do ambiente, bactérias e outros microrganismos de animais acaba nos seres humanos (PRICE et al., 2012; WIELINGA et al., 2014).

Bactérias oxacilina resistentes foram encontradas nas diferentes origens 69/470 (20,04%) em amostras de leite e 21/79 (27,85%) em queijo. Dos isolados oxacilina resistentes (n=90) 46 desses apresentaram multiresistência, as diferentes classes de antimicrobianos estudadas. Dentre estes havia um isolado de *S. aureus* que apresentou também multiresistência. Diante disso a grande preocupação sobre *S. aureus* resistentes a oxacilina decorre do fato dessas bactérias apresentarem resistência a diversos outros antimicrobianos beta-lactâmicos e não beta-lactâmicos, conferindo grande dificuldade de tratamento em caso de infecção o que os torna microrganismos de importância epidemiológica (ITO et al., 2001; COHN; MIDDLETON, 2010).

S. aureus resistentes a meticilina (MRSA) tem sido cada vez mais reconhecida em populações de exploração animal ao longo dos últimos anos (VICCA, et al., 2008). Em estudo feito por JAMALI et al. (2015) 53 das amostras coletadas (2%) apresentaram contaminação por MRSA, indicando baixa prevalência de MRSA em leite cru, queijo tradicional e Kashk. No presente estudo 1/122 (0,82%) dos isolados de *S. aureus*, apresentaram resistência a oxacilina, indicando assim uma baixa prevalência corroborando também com estudos anteriores (FEBLER et al., 2012; KREAUSUKON et al., 2012; MAŠLANKOVÁ et al., 2009).

Na tabela 5 estão expressos os perfis genéticos de resistência para os 549 isolados de *Staphylococcus* spp., onde dentre estes 291 apresentaram perfil enquanto 258 foram pan-susceptíveis aos determinados antimicrobianos estudados. O estudo gerou um total de 51

perfis de resistências com uma maior prevalências para os perfis: Pen (12,75%), Pen/Tet (7,83%), Pen/Mac (5,65%) e Pen/Lin/Mac/Oxa/Gli (2,37%).

Tabela 5. Relação entre o perfil genético e a resistência aos antimicrobianos de isolados de *Staphylococcus* spp. obtidos de amostras de leite caprino e bovino e queijo caprino de diferentes estados do Nordeste.

Perfil de resistência	Número de isolados	%	Perfil de resistência	Número de isolados	%
¹ Ami	3	0,55	Pen/Lin/Mac	9	1,64
Flu/Ami/Tet	1	0,18	Pen/Lin/Mac/Ami/Gli	1	0,18
Flu/Mac	1	0,18	Pen/Lin/Mac/Ami/Oxa/Gli	2	0,36
Lin	7	1,28	Pen/Lin/Mac/Ami/Tet	1	0,18
Lin/Ami	1	0,18	Pen/Lin/Mac/Gli	4	0,73
Lin/Mac	2	0,36	Pen/Lin/Mac/Oxa/Gli	13	2,37
Lin/Mac/Tet	1	0,18	Pen/Lin/Mac/Oxa/Tet	2	0,36
Mac	11	2,00	Pen/Lin/Mac/Oxa/Tet	1	0,18
Mac/Ami	1	0,18	Pen/Lin/Mac/Oxa/Tet/Gli	6	1,09
Mac/Tet	3	0,55	Pen/Lin/Mac/Tet	4	0,73
Oxa	3	0,55	Pen/Lin/Mac/Tet/Gli	4	0,73
Pen	70	12,75	Pen/Lin/Mec/Oxa/Gli	3	0,55
Pen/Ami	1	0,18	Pen/Lin/Mec/Oxa/Tet/Gli	1	0,18
Pen/Flu	1	0,18	Pen/Lin/Oxa	1	0,18
Pen/Flu/Ami/Oxa/Tet/Gli	1	0,18	Pen/Lin/Oxa/Gli	1	0,18
Pen/Flu/Oxa	1	0,18	Pen/Lin/Tet	3	0,55
Pen/Gli	3	0,55	Pen/Mac	31	5,65
Pen/Lin	7	1,28	Pen/Mac/Gli	3	0,55
Pen/Lin/Ami	5	0,91	Pen/Mac/Oxa	1	0,18
Pen/Lin/Ami/Oxa/Tet	2	0,36	Pen/Mac/Oxa/Tet	1	0,18
Pen/Lin/Flu/Ami/Tet	1	0,18	Pen/Mac/Tet	10	1,82
Pen/Lin/Flu/Mac	1	0,18	Pen/Mac/Tet	2	0,36
Pen/Lin/Flu/Mac/Oxa/Gli	2	0,36	Pen/Mac/Tet/Gli	1	0,18
Pen/Lin/Flu/Mac/Tet/Gli	2	0,36	Pen/Tet	43	7,83
Pen/Lin/Flu/Tet	1	0,18	Tet	10	1,82
Pen/Lin/Gli	1	0,18	Pan- susceptível	258	46,99

¹ Penicilinas (Pen), Glicopetídios (Gli), Lincosaminas (Lin), Fluoroquinolonas (Flu), Macrolídios (Mac), Oxazolidinonas (Oxa), Tetraciclina (Tet), Aminoglicosídeos (Ami).

O uso de agentes antimicrobianos em animais de produção e a emergência de patógenos humanos com susceptibilidade decrescente ou completamente resistente aos antibióticos tem favorecido a resistência múltipla apresentando alto risco potencial para a saúde pública e pode dificultar o tratamento de doenças animais e humanos, agravando quadros clínicos curáveis se tratando desse aspecto o fenômeno da multirresistência foi observado em 92 (16,76%) dos isolados, os quais apresentaram resistência a três ou mais classes de antimicrobianos. A multirresistência foi detectada, principalmente no grupo dos SCN.

Em um estudo feito por GARINO JÚNIOR, et al. (2011), realizou-se uma análise semelhante em *Staphylococcus* spp. isolados de mastite caprina no estado da Paraíba e verificou, assim como no nosso trabalho, diversos isolados de *Staphylococcus* apresentando multiresistência com predominância de resistência a 3 antimicrobianos. No presente estudo a multirresistência foi detectada em particular com maior ocorrência nos *S. aureus*. Desta maneira, além de ter apresentado os maiores valores de resistência aos antimicrobianos de forma individual, os *S. aureus* apresentaram também elevado potencial de multiresistência, indicando uma situação ainda mais preocupante, pois o tratamento de animais com mastite na região torna-se mais difícil devido a ineficiência dos principais antimicrobianos disponíveis no mercado (penicilinas e tetraciclinas), trazendo assim maiores gastos e prejuízos para os proprietários.

No presente estudo, os *S. aureus* (n=122), obteve um total de 18 (14,75%) isolados multirresistentes, os quais se originaram todos de leite caprino. A alta frequência de *S. aureus* multirresistentes neste estudo corrobora achados anteriores (HARAN et al., 2012.; SHITANDI STERNESJÖ, 2004) e, em particular, um estudo semelhante (JAMALI et al., 2015) sobre resistência de *S. aureus* obtidos a partir de diferentes origens. Há cada vez mais relatos indicando elevada percentagem de multirresistente em *S. aureus* isolados de animais (ALBUQUERQUE et al., 2007.; WATERS et al., 2011.; JAMALI et al., 2015). Esta situação tem se agravado devido ao uso indiscriminado de antibióticos no tratamento e prevenção de doenças se tornando um sério problema de saúde animal e pública uma vez que elevadas taxas de resistência aos antimicrobianos são registradas em estudos realizados nas diferentes espécies animais e no homem.

Na Tabela 6, estão expressos os valores da concentração inibitória mínima (CIM) dos antimicrobianos frente à *Staphylococcus* spp. Para facilitar a visualização, os microrganismos foram divididos em três grupos: *Staphylococcus* totais, *Staphylococcus* coagulase negativos

(SCN) e *Staphylococcus* coagulase positivos (SCP), sendo estes dois últimos grupos subdivididos em função dos microrganismos com maior prevalência em cada um deles (*S. epidermidis* para os SCN e *S. aureus* para os SCP). Nas colunas CIM50 e CIM90 são apresentadas as menores concentrações ($\mu\text{g/mL}$) que foram eficazes na inibição de 50% e 90% dos isolados de *Staphylococcus*, respectivamente.

Quanto às concentrações encontradas foi observado que em especial o *S. aureus*, apresentou concentrações para inibição maiores que 8 $\mu\text{g/mL}$ (para CIM50 e CIM90) já que é um microrganismo de importância epidemiológica é bom ressaltar pelo fato desses apresentarem resistência a diversos outros antimicrobianos beta-lactâmicos e não beta-lactâmicos, conferindo grande dificuldade de tratamento em caso de infecção o que os torna um sério problema de saúde pública. Desta forma é de extrema importância a identificação destes microrganismos em alimentos de origem animal, para que se conduza apropriadamente testes de susceptibilidade antimicrobiana e avaliação os resultados obtidos, no intuito de melhor controle da qualidade e inocuidade desses alimentos e uso de uma terapêutica adequada (SCHWARZ et al., 2010).

Tabela 6. Concentração inibitória mínima de *Staphylococcus* isolados de amostras de leite e queijo de cabras e leite bovino.

Antimicrobiano		AUG ²	CLI	ERI	GEN	CIP	OXA	PEN	LIN	T/S	TET	VAN	
PC ¹ (µg/mL)		≥1/0,5	≥4	≥8	≥8	2	>0,5	≥0.25	4	≥4/76	≥16	≥32	
<i>Staphylococcus</i> spp.	CIM ₅₀	≤4/2	≤0,5	≤0,5	≤4	≤1	≤0,25	≤0,03	2	≤0.5/9.5	≤4	1	
	Total	CIM ₉₀	≤4/2	>4	>4	≤4	≤1	>2	>8	4	1/19	>8	16
	R ³	31	92	122	20	16	91	212	40	0	102	48	
<i>S. epidermidis</i>	CIM ₅₀	≤4/2	≤0,5	≤0,5	4	≤0,5	≤0,25	>8	≤1	≤0.5/9.5	>8	2	
	CIM ₉₀	≤4/2	4	>4	4	2	1	>8	≤1	>2/38	>8	4	
	R	4	13	19	2	2	10	59	5	0	44	6	
SCN ⁴	CIM ₅₀	≤4/2	≤0.5	>4	≤4	≤0,5	≤0,25	≤0,03	≤1	≤0.5/9.5	≤4	1	
	CIM ₉₀	≤4/2	>4	≤0,5	≤4	≤0,5	>2	>8	2	1/19	>8	>16	
	R	25	73	93	12	14	90	149	34	0	78	38	
<i>S. aureus</i>	CIM ₅₀	≤4/2	≤0.5	≤0,5	≤4	≤0,5	≤0,25	≤0,03	≤1	≤0.5/9.5	≤4	1	
	CIM ₉₀	≤4/2	4	4	8	≤0,5	>2	>8	≤1	≤0,5/9,5	>8	4	
	R	6	15	19	7	2	1	53	3	0	20	7	
SCP ⁵	CIM ₅₀	≤4/2	≤0.5	≤0,5	≤4	≤0.5	≤0,25	≤0,03	≤1	≤0.5/9.5	≤4	1	
	CIM ₉₀	≤4/2	1	>4	≤4	1	0,5	8	≤1	1/19	≤4	2	
	R	0	4	10	1	0	0	10	1	0	4	3	

¹ Ponto de corte (PC) da do em µg/mL para cada antimicrobiano; ²Amoxicilina/Clavulanato de K (AUG); Clindamicina (CLI); Ciprofloxacina (CIP); Eritromicina (ERI); Gentamicina (GEN); Oxacilina (OXA); Penicilina G (PEN); Trimetoprim/Sulfametoxazol (T/S); Tetraciclina (TET); Vancomicina (VAN); ³Resistência dada em porcentagem (R); ⁴ *Staphylococcus* coagulase negativos exceto *S. epidermidis*; ⁵ *Staphylococcus* coagulase positivos exceto *S. aureus*.

A identificação e caracterização detalhada é necessária para rastrear de maneira confiável a disseminação de *S. aureus* encontrado em animais produtores de alimentos e os alimentos de origem animal para identificar fontes de contaminação ao longo da cadeia alimentar (WENDLANDT et al., 2013a). Portanto a CIM é um método confiável de determinação da resistência (OLIVEIRA et al., 2012).

Apesar da dificuldade logística e elevados custos para realização da lactocultura e avaliação da sensibilidade, estes deveriam ser os passos iniciais nos casos de infecção intramamária, com indicação terapêutica baseada nos valores obtidos pelas CIM, evitando assim uma provável resistência por parte desses microrganismos. De acordo com BRITO et al. (2001) a terapia deve atingir concentrações do antimicrobiano no local da infecção, mais elevadas que as determinadas pela CIM.

5. CONCLUSÃO

O presente estudo oferece subsídios quanto ao perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, a partir das concentrações inibitórias mínimas, contribuindo dessa forma para o tratamento e controle das infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus* nos rebanhos estudados.

Dentre as espécies estudadas, o *S. aureus* foi o microrganismo mais isolado, apresentando resistências a diferentes classes de antimicrobianos. Dentre estes, um apresentou resistência a oxacilina (prevalência < 1%), em amostra de leite caprino. Isso é motivo de preocupação em saúde pública, principalmente do ponto de vista ocupacional, uma vez que as cepas apresentam elevada taxa de resistência aos antimicrobianos.

Por outro lado, trimetoprim/sulfametoxazol, ciprofloxacina, gentamicina, amoxicilina/clavulanato de k, linezolid e vancomicina foram os antimicrobianos de melhor ação frente aos *Staphylococcus*.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A inclusão do teste de produção de β -lactamases e testes quanto à presença de genes específicos que garantem resistência para aos *Staphylococcus* estudados faz-se necessário, para melhor averiguação do potencial de resistência dos *Staphylococcus* estudados.

Tornado-se importante à conscientização dos produtores sobre o uso adequado de antimicrobianos e avaliação sobre a possibilidade de monitoramento da ocorrência de resistência antimicrobiana.

Por fim, os resultados aqui apresentados ressaltam a necessidade de implementação de programas de melhoria da qualidade do leite e seus derivados na região de estudo, condição fundamental para a atividade diminuir a dependência dos programas de fomento governamentais e alcançar inserção no exigente mercado privado.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARESTRUP, F. M., JENSEN, V. F., EMBORG, H. D., JACOBSEN, E., & WEGENER, H. C. Changes in the use of antimicrobials and the effects on productivity of swine farms in Denmark. **American Journal of Veterinary Research**, v.71, n. 7, p. 726 - 733, 2010.

AARESTRUP, F. Sustainable farming: get pigs off antibiotics. **Nature**, v. 486, n. 7404, p. 465 - 466, 2012.

AHLSTRAND, K., SVENSSON, L., PERSSON, U., TIDEFELT, B. S. Glycopeptide resistance in coagulase-negative *Staphylococci* isolated in blood cultures from patients with hematological malignancies during three decades. **European Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 11, p. 1349–1354, 2011.

ALBUQUERQUE, W.; MACRAE, A.; SOUSA, O.; VIEIRA, G.; VIEIRA, R. Multiple drug resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from a fish market and from fish handlers. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 131-134, 2007.

BAIRD-PARKER, A. C. A. Classification of Micrococci and *Staphylococci* Based on Physiological and Biochemical Tests. PMID: 13969076. **Journal of General Microbiology**, v. 30, n. 3, p. 409 - 427, 1963.

BEZERRA, A. C. A.; FEIJÓ, F. M. C.; SILVA, J. S.; AVELINO, D. B. Relação entre o “California Mastitis Test” e os agentes microbianos de mastites em caprinos no estado do Rio Grande do Norte. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 28, n. 4, p.160-165, 2006.

BOGAARD A. E.; STOBBERINGH E. E. Epidemiology of resistance to antibiotics Links between animals and humans. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 14, n. 4, p. 327 - 335, 2000.

BRITO, J. R. F.; SALES, R. O. Saúde do Úbere. Uma Revisão. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 01. n. 01, p. 67 – 90, 2007.

BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; SILVA, M. A. S.; CARMO, R. A. Concentração inibitória mínima de dez antimicrobianos para amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de infecção

intramamária bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 5, p. 531-537, 2001.

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

BUENO, V. F. F; NICOLAU, E. S.; MESQUITA, A. J.; RIBEIRO A. R.; SILVA, J. A. B.; COSTA, E. O.; COELHO, K. O.; NEVES, R. B. S. Mastite bovina clínica e subclínica na região de Pirassununga, SP: frequências e redução na produção. **Ciência Animal Brasileira**, v. 3, n. 2, p. 47-52, 2002.

CASSETTARI, V. C.; STRABELLI, T.; MEDEIROS, E. A. S. *Staphylococcus aureus* bacteremia: what is the impact of oxacillin resistance on mortality? **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 9, n. 1, p. 70–76, 2005.

CATÃO, R. M. R.; CEBALLOS, B. S. O. *Listeria* spp., Coliformes totais e fecais e *E.coli* no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios, no Estado da Paraíba (Brasil). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 3, p. 282-287, 2001.

CHAMBERS, J. V. The microbiology of raw milk. In: **Robinson, R.K. (ed.). Dairy Boca Raton, Florida, USA: CRC Press**. p. 824, 2002.

MALORNY, B.; TASSIOSB, P. T.; RÅDSTRÖMC, P.; COOKD, N.; WAGNERE, M.; HOORFARF, J. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v. 83, n. 1, p. 39–48, 2003.

CHAPAVAL, L. **Programa de Controle da Mastite Caprina – PCMC**. Sobral: Embrapa Caprinos, 2007, 5p. (Embrapa Caprinos. Comunicado Técnico, 80)

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals; Approved Standards - Fourth Edition. CLSI document VET01-A4 (ISBN 1-56238-878-9). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA 2013.

COHN, L. A.; MIDDLETON, J. R. A. veterinary perspective on methicillin-resistant *staphylococci*. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 20, n. 1, p. 31–45, 2010.

CONTRERAS, A.; LUENGO, C.; SANCHEZ, A.; CORRALES, J. C. The role of intramammary pathogens in dairy goats. **Livestock Production Science**, n. 2-3 v. 79, p. 273•283, 2003.

CONTRERAS, A.; SIERRA, D.; SÁNCHEZ, A.; CORRALESA, A.; MARCOC, J.C.; PAAPED, M.J.; GONZALO, C. Mastitis in small ruminants. **Small Ruminant Research**, v.68, n.1-2, p.145-153, 2007.

CULLOR, J. S., TYLER, J. W., SMITH, B. P. Distúrbios da glândula mamária. In: SMITH, B. P. **Tratado de Medicina Interna dos Grandes Animais**. São Paulo, v.2, p.1041-1060, 1994.

CUNY, C.; FRIEDRICH, A.; KOZYTSKA, S.; LAYER, F.; NÜBEL, U.; OHLSEN, K.; STROMMINGER, B.; WALTHER, B.; WIELER, L.; WITTE, W. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in different animal species. **International journal of medical microbiology: IJMM**, v. 300, n. 2-3, p. 109–117, 2010.

DANMAP. **The Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme**. Disponível em: <http://danmap.org>. Acesso em 22 de dezembro 2015.

DEL FIOLE, F. S.; LOPES, L. C.; TOLEDO, M. I. ; BARBERATO FILHO, S. Perfil de prescrições e uso de antibióticos em infecções comunitárias. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 1, p. 68-72, 2010.

DIJKSHOORN, L.; TOWNER, K. An Introduction to the Generation and Analysis of Microbial. **New approaches for the generation and analysis of microbial typing data**, v. 1, p. 1-30, 2001.

DUIJKEREN, E. V.; WOLFHAGEN, M. J.; BOX, A. T.; HECK, M. E.; WANNET, W. J.; FLUIT, A. C. Human-to-dog transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 12, p. 2235–2237, 2004.

ECDC. (2010). Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2009. European Centre for Disease Prevention and Control. Available at [http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/1011SUR annual EARS Net 2009.pdf](http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/1011SUR%20annual%20EARS%20Net%202009.pdf).

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

FEBLER, A. T., OLDE RIEKERINK, R. G., ROTHKAMP, A., KADLEC, K., SAMPIMON, O. C., LAM, T. J., & SCHWARZ, S. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, CC398 obtained from humans and animals on dairy farms. **Veterinary Microbiology**, v.160, n. 266, p. 77-84, 2012.

FITZGERALD, J. R.; STURDEVANT, D. E.; MACKIE, S. M.; GILL, S. R.; MUSSER, J.M.; Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus*: Insights into the origin of methicillin-resistant strains and the toxic shock syndrome epidemic. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 15, p. 8821–8826, 2001.

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

FRANK, J. F. & HASSAN, A. N. Microorganisms associated with milk. In: Roginski, H., Fuquay, J.W. & Fox, P.F. (eds.). **Encyclopedia of dairy sciences**. London, UK. Academic Press, Elsevier Science. p. 1786-1796, 2003.

FRANK, K. L.; DEL POZO, J. L.; PATEL, R. From clinical microbiology to infection pathogenesis: how daring to be different works for *Staphylococcus lugdunensis*. **Clinical Microbiology**, v. 21, n. 1, p. 111–133, 2008.

SASAKI, T.; TSUBAKISHITA, S.; TANAKA, Y.; SAKUSABE, A.; OHTSUKA, M.; HIROTAKI, S.; KAWAKAMI, T.; FUKATA, T.; HIRAMATSU, K. Multiplex-PCR Method for Species Identification of Coagulase-Positive Staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 765–769, 2010.

FREITAS, M. F. L.; PINHEIRO JUNIOR, J. W.; STAMFORD, T. L. M.; RABELO, S. S. A.; SILVA, D. R.; SILVEIRA FILHO, V. M. S.; 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. **Arquivo Instituto Biológico**, v. 72, n. 2, p. 171-177, 2005.

FREITAS, M. F. L.; LEAL BALBINO, T. C.; MOTA, R. A.; STAMFORD, T. L. M. Exotoxinas Estafilocócicas. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v.7, n. 2 - 3, p.63-74, 2004.

GARCÍA-ÁLVAREZ, L. HOLDEN, M. T. G.; LINDSAY, H.; WEBB, C. R. [...] 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. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 11, n. 8, p. 595–603, 2011.

GARINO JÚNIOR, F.; CAMBOIM, E.K.A.; DAS NEVES, P.B., DE SÁ, A.V.V., ALMEIDA, A.P. Suscetibilidade a antimicrobianos e produção de betalactamase em amostras de *Staphylococcus* isolados de mastite caprina no Semiárido Paraibano. **Arquivo Instituto Biologia**, v. 78, n. 1, p. 103-107, 2011.

BAIRD-PARKER, A. C. A classification of micrococci and staphylococci based on physiological and biochemical tests. **Journal of general microbiology**, v. 30, p. 409, 1963.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. 2ª ed, São Paulo: Livraria Varela, p. 655, 2003.

GUCUKOGLU, A. C.; ADIRCI, O.; TERZI, G. O. K.; ALIS, A. Determination of enterotoxigenic and Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* in ice cream. **Journal of Food Science**, v. 78, n. 5, 2013.

HAMMERUM, A. M.; HEUER, O. E.; EMBORG, H. D.; BAGGER-SKJØT, L.; JENSEN, V. F.; ROGUES, A. M.; SKOV, R. L.; AGERSØ, Y.; BRANDT, C. T.; S MULLER, A.; HOVGGAARD, K.; AJUFO, J. [...]; MONNET, D. L. Danish integrated antimicrobial resistance monitoring and research program. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 11, p. 1632-1639, 2007.

HARAN, K.; GODDEN, S.; BOXRUD, D.; JAWAHIR, S.; BENDER, J.; SREEVATSAN, S. Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus*, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, isolated from bulk tank milk from Minnesota dairy farms. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 3, p. 688-695, 2012.

ITO, T.; KATAYAMA, Y.; ASADA, K.; MORI, N.; TSUTSUMIMOTO, K.; TIENSASITORN, C.; HIRAMATSU, K. Structural Comparison of Three Types of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Integrated in the Chromosome in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 5, p. 1323–1336, 2001.

JAMALI, H.; PAYDAR, M.; RADMEHR, B.; ISMAIL, S. Prevalence and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk and dairy products. **Food Control**, v. 54, n. 50, p. 383-388, 2015.

JEVONS, M. P. Celbenin - resistant *Staphylococci*. **British Medical Journal**, v. 1, n. 5219, p. 124–125, 1961.

JIMENÉZ, J. N. OCAMPO, A. M.; VANEGAS, J. M.; RODRIGUEZ, E. A.; MEDIAVILLA, J. R.; CHEN, L.[...], CORREA, M. M. CC8 MRSA Strains Harboring SCCmec Type IVc are Predominant in Colombian Hospitals. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, 2012.

KADLEC, K.; WENDLANDT, S.; FEBLER, A. T.; SCHWARZ, S. Methods for the Detection of Antimicrobial Resistance and the Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolates from Food-Producing Animals and Food of Animal Origin. In: CHIN, C.; YAN, X.; JACKSON, R. C. Antimicrobial Resistance and Food Safety. Chennai, India: Elsevier, 2015. Cap.11, p. 207-232, 2015.

KATAYAMA, Y.; ITO, T.; HIRAMATSU, K. A New Class of Genetic Element, *Staphylococcus* Cassette Chromosome mec, Encodes Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 6, p. 1549–1555, 2000.

KIM, S. D.; MCDONALD, L. C.; JARVIS, W. R.; MCALLISTER, S. K.; JERRIS, R.; CARSON, L. A.; MILLER, J. A. Determining the significance of coagulase-negative *staphylococci* isolated from blood cultures at a community hospital: a role for species and strain identification. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 21, n. 3, p. 213–217, 2000.

KONEMAN, C.; WINN JR, W.; ALLEN, S.; JANDA, W.; KONEMAN, E.; PROCOP, G.; SCHRECKENPERGER, P.; WOODS, G. Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido. 6. ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, v. 6, p. 1565, 2010.

KREAUSUKON, K., FETSCH, A., KRAUSHAAR, B., ALT, K., MÜLLER, K., KRÖMKER, V., ZESSIN, K.-H. KÄSBOHRER, A., & TENHAGEN, B. A. Prevalence, antimicrobial resistance, and molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from bulk tank milk of dairy herds. **Journal of Dairy Science**, v.95, n. 8, p. 4382-4388, 2012.

KUMARASAMY, K. K.; TOLEMAN, M. A.; WALSH, T. R.; BAGARIA, J.; BUTT, F.; BALAKRISHNAN, R.; CHAUDHARY, U.; DOUMITH, M GISKE, C. G.; ... WOODFORD, N. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. **Lancet Infect Diseases**, v. 10, n. 9, p. 597e 602, 2010.

LADEIRA, S. R. L. Mastite caprina. **In: Doenças de ruminantes e equídeos.**/Riet-Correa, F.; SCHILD, A. L.; MENDEZ, M. D. C.; LEMOS, R. A. A. Pallotti, v. 1, p.373-381, 2007.

LANGE, C. C.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R.F.; ARCURI, E. F.; SOUZA, G. N.; MACHADO, M. A.; DOMINGUES, R.; SALIMENA, A. P. S. Identification of *Staphylococcus* strains isolated from bovine mastitis by PCR and 16S rDNA sequencing. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 1, p. 36–40, 2011.

LANGONI H.; DOMINGUES P.F.; BALDINI S. Mastite caprina: seus agentes e sensibilidade frente a antimicrobianos. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.13, n.1, p.51-54, 2006.

LASSOK, B., TENHAGEN, B.A. From pig to pork: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the pork production chain. **Journal of Food Protection**, v. 76, n.6, p. 1095–1108, 2013.

LPSN, *List of Prokaryotic Names With Standing in Nomenclature*– Genus *Staphylococcus*. Disponível em: <http://www.bacterio.net/staphylococcus.html>. Acesso em 25 de dezembro 2014.

LYON, B. R.; SKURRAY, R. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: genetic basis. **Microbiological Reviews**, v. 51, n. 1, p. 88–134, 1987.

MACIEL, F. C. Manejo sanitário de caprinos e ovinos. **Circuito de tecnologias adaptadas para a agricultura familiar**. EMPARN, Natal, v. 3. 2006. 32p.

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 Ruminant Research**, v.102, n. 1, p.74-83, 2012.

MAŠLANKOVÁ, J., PILIPČINCOVÁ, I., & TKÁČIKOVÁ, Ľ. Pheno-and genotyping of *Staphylococcus aureus* isolates of sheep origin. **Acta Veterinaria Brno**, v. 78, n.2, p. 345-352, 2009.

MATTEO BASSETTI, E. N. Why is community-associated MRSA spreading across the world and how will it change clinical practice? **International journal of antimicrobial agents**, v. 34 n. 1, p. S15–9, 2009.

MIRRETT, S., WEINSTEIN, M.P., REIMER, L.G., WILSON, M.L., RELLER, L.B. Relevance of the number of positive bottles in determining clinical significance of coagulase negative

staphylococci in blood cultures. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 9, p. 3279–3281, 2001.

MONECKE, S.; COOMBS, G.; SHORE, A.C.; COLEMAN, D.C.; AKPAKA, P.; BORG, M.;[...]; EHRICH, R. A Field Guide to Pandemic, Epidemic and Sporadic Clones of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Plos one**, v. 6, n. 4, p. e17936, 2011.

MOTA, R. A. Aspectos Epidemiológicos, diagnóstico e controle das mastites em caprinos e ovinos. **Tecnologia e Ciência Agropecuária**, v. 2, n. 3, p.57-61, 2008.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARD. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically: approved standard**. Vollanova, PA, 1997. (NCCLS document. M7-A4).

NATIONAL MASTITIS COUNCIL - NMC. Current concepts of bovine mastitis. USA: **Nacional Mastitis Council**, 1999. 64p.

NEVES, P.B.; MEDEIROS, E.S.; SÁ, V.V.; 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. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, n.5, p. 379-384, 2010.

OLIVE, D. M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA based typing of microbial organisms. **Journal of Clinical Microbiology, Whashington**, v. 37, p. 1661–1669, 1999.

OLIVEIRA, L.; LANGONI H.; HULLAND C.; RUEGG L. minimum inhibitory concentrations of *Staphylococcus aureus* recovered from clinical and subclinical cases of bovine mastitis. **Journal of Dairy Science** v. 95, n. 4, p. 1913–1920, 2012.

PADILHA, M. R. F.; FERNANDES, Z. F.; LEAL, T. C. A.; LEAL, N. C.; ALMEIDA, A. M. P. Pesquisa de bactérias patogênicas em leite pasteurizado tipo C comercializado na cidade de Recife, Pernambuco, Brasil. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 02, 2001.

PAIVA, J. A.; PINA, E.; SILVA, M. G. **Prevenção e Controlo de Infecções e de Resistência aos Antimicrobianos em números**. Direção-geral da saúde, Lisboa, novembro de 2014.

PIESSENS, V.; VAN COILLIE, E.; VERBIST, B.; SUPRE, K.; BRAEM, G.; VAN NUFFEL, A.; DE VUYST, L.; HEYNDRICKX, M.; DE VliegHER, S. Distribution of coagulase-negative *Staphylococcus* species from milk and environment of dairy cows differs between herds. **Journal of Dairy Science**. v. 94, n.6, p. 2933–2944, 2011.

PINCHUK, I. V.; BESWICK, E. J.; REYES, V. E. Staphylococcal Enterotoxins. **Toxins**, v. 18, n. 8, p. 2177–2197, 2010.

POTRON, A.; KALPOE, J.; POIREL, L.; NORDMANN, P. European dissemination of a single OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* clone. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 12, p. e24- e26, 2011.

PRESCOTT, J. F. Antimicrobial use in food and companion animals. **Animal Health Research Reviews**, v. 9, n. 2, p. 127 - 133, 2008.

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

PRICE, L. B.; STEGGER, M.; HASMAN, H.; AZIZ, M.; LARSEN, J.; ANDERSEN, P. S.; [...] AARESTRUP, F. M. *Staphylococcus aureus* CC398: host adaptation and emergence of methicillin resistance in livestock. **MBio**, v. 3, n. 1, p. 1-7, 2012.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F.C. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Artmed: Porto Alegre, 512p, 2005.

RAPINI, L.S.; TEIXEIRA, J.P.; MARTINS, N. E.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; SOUZA, M.R.; PENNA C.F.A.M. Perfil de resistência antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas de queijo tipo coalho. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, n.1, p.130-133, 2004.

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

RIZEK, C. F.; MATTÉ, M. H.; DROPA, M.; MAMIZUKA, E. M.; ALMEIDA, L. M.; LINCOPAN, N.; MATTÉ, G. R.; GERMANO, P. M. L. Identification of *Staphylococcus aureus*

carrying the *mecA* gene in ready-to-eat food products sold in Brazil. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 8, n. 4, p. 561–63, 2011.

SALVADOR, F. C.; BURIN, A. S.; FRIAS, A. A. T.; OLIVEIRA, F. S.; FAILA, N. Avaliação da qualidade microbiológica do leite pasteurizado comercializado em Apucarana-PR e região. **Revista F@pciência, Apucarana-PR**, v.9, n. 5, p. 30 – 41, 2012.

SANTOS FILHO, L. Antibiograma: Prova de sensibilidade a Antimicrobiana. In: SANTOS FILHO, L. 4º edição. Manual de Microbiologia Clínica. João Pessoa: Editora Universitária/UFPB, 2006. p. 107-120.

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

SANTOS, L. F. L.; CASTRO, R. S.; COSTA, E. O. “California Mastitis Test” e “Whiteside Modificado” como critério de triagem para a mastite caprina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 30, n.2, p. 295-298, 1995.

SCHUSTER, C.; GONZALEZ, H. L.; BÜCHLE, J.; TIMM, C. D. Avaliação de equipamento alternativo para pasteurização lenta de leite previamente envasado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 4, p. 828-831, 2006.

SCHWARZ, S., SILLEY, P., SIMJEE, S., WOODFORD, N., VAN DUIJKEREN, E. JOHNSON, A.P. Editorial: assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 65, n.4, p. 601–604, 2010.

SCHWARZ, S.; KEHRENBURG, C.; WALSH, T. R. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 17, n.6, p. 431–437, 2001.

SHITANDI, A.; STERNESJÖ, Å. Prevalence of multidrug resistant *Staphylococcus aureus* in milk from large-and small-scale producers in Kenya. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 12, p. 4145-4149, 2004.

SILVA, E. R.; ARAÚJO, A. M.; ALVES, F. S. F. A.; PINHEIRO, R. R.; SAUKAS, T. N. Associação entre o California Mastitis Test e a Contagem de Células Somáticas na avaliação da

saúde da glândula mamária caprina. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, n. 1, p. 46-48, 2001.

SILVA, E. R.; SIQUEIRA, A. P.; MARTINS, J. C. D.; FERREIRA, W. P. B.; SILVA N. Identification and *in vitro* antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* species isolated from goat mastitis in the Northeast of Brazil. **Small Ruminant Research**. v.55, n. 1-3, p.45-49, 2004.

SILVA, Z. N.; CUNHA, A. S.; LINS, M. C.; CARNEIRO, L. A. M.; ALMEIDA, A. C. F.; QUEIROZ, M. L. P. Isolation and serological identification of enteropathogenic *Escherichia coli* in pasteurized milk in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 35, n. 4, 2001.

SPANU V.; SPANU, C.; VIRDIS, S.; COSSU, F.; SCARANO, C.; SANTIS, E.P.L. Virulence factors and genetic variability of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw sheep's milk cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v.153, n. 1, p. 53–57, 2012.

TANG, Y. W.; PROCOP, G. W.; PERSING, D. H. Molecular diagnostics of infectious diseases. PMID: 9365385: **Clinical Chemistry**, v. 43, n. 11, p. 2021–2038, 1997.

VICCA, J. VANDERHAEGHEN, W.; CERPENTIER, T.; BUTAYE, P. Prevalence at Herd-Level of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* in Milk Samples of Dairy Herds. **Mastitis Control-From Science to Practice**, p. 71- 75, 2008.

WALSH, C.; FANNING, S. Antimicrobial resistance in foodborne pathogens – a cause for concern? **Curr. Drug Targets**, v. 9, n. 9, p. 808–815, 2008.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T.; GEURTS, T. J. Título. **Dairy Science and Technology**, v. 2, p. 175- 176, 2006.

WATERS, A. E.; CONTENTE-CUOMO, T.; BUCHHAGEN, J.; LIU, C. M.; WATSON, L.; PEARCE, K.; FOSTER, J.T.; BOWERS, J.; DRIEBE, E. M.; ENGELTHALER, D. M. Multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* in US meat and poultry. **Clinical Infectious Diseases**, v. 52, n. 10, p. 1227- 1230, 2011.

WEN CHEN, C.; YEN HSUA C.; MING LAI S.; JHE SYU W.; YIWANGA T.; SHAN LAI P. Metal nanobullets for multidrug resistant bacteria and biofilms. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 78, p. 88-104, 2014.

WENDLANDT, S., FEBLER, A.T., MONECKE, S., EHRLICH, R., SCHWARZ, S., KADLEC, K. The diversity of antimicrobial resistance genes among *staphylococci* of animal origin. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 303, n.6, p. 338-349, 2013a.

WENDLANDT, S., SCHWARZ, S., SILLEY, P. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a food-borne pathogen? **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 4, p. 117–139, 2013b.

WHO. Critically important antimicrobials for human medicine, third revision. **World Health Organization**. Available at http://www.who.int/foodborne_disease/resistance/cia/en/, 2011.

WIELINGA, P. R.; JENSEN, V. F.; AARESTRUP, F. M.; SCHLUNDT J. Evidence-based policy for controlling antimicrobial resistance in the food chain in Denmark. **Food Control**, v. 40, p. 185e192, 2014.