



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA – UFPB
CAMPUS II – AREIA-PB
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS – CCA
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

RAPHAEL FERREIRA ORDONHO

**IDENTIFICAÇÃO DO PERFIL DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE CEPAS
DO GÊNERO *STAPHYLOCOCCUS SPP.* ORIUNDAS DE CASOS DE MASTITE EM
REBANHOS LEITEIROS DO AGRESTE PARAIBANO**

AREIA-PB
2021

RAPHAEL FERREIRA ORDONHO

**IDENTIFICAÇÃO DO PERFIL DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE CEPAS
DO GÊNERO *STAPHYLOCOCCUS SPP.* ORIUNDAS DE CASOS DE MASTITE EM
REBANHOS LEITEIROS DO AGRESTE PARAIBANO**

Trabalho de Conclusão de
Curso apresentado ao curso de
Graduação em Medicina Veterinária
de Areia do Centro de Ciências
Agrárias da Universidade Federal da
Paraíba como requisito parcial da
obtenção do grau de Bacharel em
Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Drº Artur
Cezar de Carvalho Fernandes

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

O65i Ordonho, Raphael Ferreira.

Identificação do perfil de resistência antimicrobiana de cepas do gênero *Staphylococcus* SPP. oriundas de casos de mastite em rebanhos leiteiros do agreste paraibano / Raphael Ferreira Ordonho. - Areia:UFPB/CCA, 2021.

32 f. : il.

Orientação: Artur Cezar de Carvalho Fernandes.
TCC (Graduação) - UFPB/CCA.

1. Medicina Veterinária. 2. Resistência bacteriana. 3. MRSA. 4. Oxacilina. 5. Vaca. I. Fernandes, Artur Cezar de Carvalho. II. Título.

UFPB/CCA-AREIA

CDU 636.09(02)

RAPHAEL FERREIRA ORDONHO

IDENTIFICAÇÃO DO PERFIL DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE CEPAS DO
GÊNERO *STAPHYLOCOCCUS SPP.* ORIUNDAS DE CASOS DE MASTITE EM
REBANHOS LEITEIROS DO AGRESTE PARAIBANO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como requisito parcial à obtenção do título de
Bacharel em Medicina Veterinária pela
Universidade Federal da Paraíba.

Aprovado em: 16/07/2021.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Drº Artur Cezar de Carvalho Fernandes (Orientador)
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)



M.V. Me. Camila Pereira da Silva
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)



M.V. Esp. Luís Henrique da Silva Lima
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer ao professor Dr. Artur Fernandes, alguém que, para mim, ultrapassou o conceito de Orientador, pois tem sido desde muito cedo uma grande fonte de inspiração que me garantiu diversas oportunidades, sempre confiando responsabilidades e me dando apoio e suporte para atingir as minhas conquistas. Nele também pude ter um grande e incessante exemplo de profissional, seja como veterinário ou professor, assim como também sempre foi um exemplo de pessoa íntegra, que preza pela saúde e bem-estar dos animais, dos estudantes e da população como um todo.

Devido a tantos fatores e tanto suporte que recebi do Professor Artur se tornou impossível expressar com poucas palavras a enorme gratidão que tenho por ele, entretanto, mesmo assim, tento por meio destes parágrafos mostrar que tudo que ele me ensinou, bem como tudo que me propôs servirá para sempre em minha vida profissional e pessoal. Terei constante necessidade de agradecer ao senhor, professor Artur.

Quero agradecer a banca por aceitar o convite e me auxiliar neste momento tão importante. Ela que, além do professor Artur, também é composta por Camila, uma profissional incrível que me ensinou tanto do mundo do diagnóstico, que me apoiou e estava sempre tão disposta a me dar a oportunidade de praticar e entender o funcionamento de cada exame. Mas não foi apenas isso, como Mestranda, ela também prestou um intenso suporte em um dos meus projetos de iniciação científica, me auxiliando em praticamente todas as etapas. Por esses motivos eu tenho muito a agradecer a ela, além de também tê-la como um grande exemplo de profissional altamente eficaz e sempre tão preparada e capaz de transmitir seus conhecimentos para quem quer aprender.

E, concluindo a banca, quero agradecer também a Henrique. Não tenho palavras para descrever o quanto ele foi e ainda é importante na minha graduação e profissionalização, não só pelos inúmeros ensinamentos de alguém que, assim como eu, ama a microbiologia, como também por todo apoio e confiança que sempre depositou em mim, ao ponto de me dar tanta liberdade nas atividades laboratoriais, liberdade e confiança as quais espero ter correspondido a altura. Mas acima de tudo, tenho que agradecer pela amizade que pudemos desenvolver, algo tão verdadeiro que se mantém intacto mesmo após meses sem nos falarmos e forte o suficiente para que ele pudesse me auxiliar neste momento tão importante de maneira imparcial, apenas visando a qualidade do trabalho.

Quanto a minha família, eu realmente não tenho muito o que falar, não por não merecerem, mas sim porque não existem quaisquer palavras que tenham a mínima chance de expressar o quanto eles foram e continuam sendo importantes para mim, afinal, eu não seria nada sem eles. É claro que devo dar destaque mais do que especial a minha Mãe Jailma e ao meu Pai Romero, posto que foram eles que me ensinaram a ser uma boa pessoa, a ser honesto, a batalhar pelo que quero e pelo que preciso. São meus exemplos mais antigos do que é certo, os quais sempre tentarei dar orgulho.

Quero eternizar nesses parágrafos o quanto devo aos meus pais, afinal, foram eles que concederam a capacidade e a oportunidade de poder estudar e poder seguir meus sonhos, metas e objetivos. A vocês eu devo tudo, eu devo minha vida e integridade, obrigado por serem quem são, meus verdadeiros e únicos heróis.

Esse imensurável apoio é tão vasto que acabou sendo herdado pelos meus irmãos. Primeiramente falarei da minha irmã mais velha, Rhaiara, que sempre esteve me apoiando, perguntando como estava o caminho que eu vinha construindo e percorrendo, permanecendo ao meu lado e isso foi e sempre será algo que guardarei no fundo do meu coração. Quanto ao meu irmão Renato, também mais velho, eu sei bem o quanto ele teve que aguentar e quanto apoio ele me deu para garantir que tudo que eu estou fazendo desse certo, desde as coisas mais simples até as mais desgastantes, eu devo dizer que lembro de tudo, meu irmão, e por isso agradeço a sua existência e por ser um exemplo de irmão mais velho, um exemplo que todo caçula sonha em ter.

E finalmente, a minha avó, agradeço por todo carinho, por todo amor, por tanta ajuda com tantas coisas, sejam elas simples ou não, sou grato também por cada café que foi preparado toda vez que chegava exausto de viagem nas sextas-feiras às 20 horas, enfim, por cada ajuda e suporte que foi me dado com tanto carinho e boa vontade.

Quero agradecer também aos meus colegas de curso que estiveram comigo por toda essa jornada, passando por todas as dificuldades empregadas pelo curso e pela universidade, sempre deixando tudo um pouco mais fácil devido a companhia.

Ainda sobre eles, quero dar destaque especial para algumas pessoas, sendo elas Ana Ruthe, minha mais nova irmã que ganhei nesses anos, alguém com quem cultivo muito carinho. Wiliany, uma das pessoas mais meigas que conheço e que possui o hábito de tentar suportar e resolver todas as adversidades e obstáculos da vida sozinha, mesmo sabendo que há com quem contar, algo que respeito muito e que me faz ter tanta admiração por ela. Mayara, uma das únicas pessoas no mundo na qual criei intimidade de uma hora para outra, alguém cuja presença

sempre me fez bem e imagino que seja um sentimento recíproco. E por fim, finalizando as damas, quero dar destaque também a Vanessa, uma pessoa tão especial e boa, sempre disposta a ajudar quem mais ama, uma amiga que tenho orgulho de ter intimidade e de poder auxiliar e ser auxiliado por ela.

Agora, quanto aos meninos, os destaque irão para Davi, alguém sempre disposto a ajudar e que jamais foge de desafios, Thiago uma pessoa bondosa e habilidosa em tantas áreas, possuindo diversas competências e José Lucas, uma das pessoas mais estudiosas e aplicadas que conheço. Devo agradecer por todos os momentos de estudo, mas também de amizade e descontração, obrigado por facilitarem momentos complexos da vida universitária.

Quero falar também de Helder, um grande amigo que pude acompanhar a luta que foi para que ele pudesse conciliar o trabalho com a universidade. Agradeço por sempre me procurar para estudarmos juntos, por tantas caronas e tantas conversas, mas acima de tudo, agradeço pela amizade e pelo exemplo de pessoa que luta pelos objetivos.

Terminando os destaques para os colegas de curso, quero fechar atribuindo uma ênfase maior aos meninos que moravam comigo, Breno e Humberto, pessoas as quais compartilho tantas histórias, sejam elas vividas juntas ou histórias passadas individuais, mas que são semelhantes entre nós.

Primeiro tenho que agradecer por serem pessoas respeitadas e muito boas de se conviver, deixando sempre o ambiente tranquilo e bom de se estar. Segundo, quero agradecer também por entenderem e conseguirem conviver mesmo com meus erros, por mais que não fossem obrigados a isso. E agora, individualmente, quero agradecer a Humberto por ser sempre alguém com quem posso confiar, alguém divertido, talvez o mais engraçado que conheço, e que enfrenta os problemas com a cabeça erguida sem nem se quer reclamar, além de sempre estar disposto a compartilhar uma boa garrafa de café, enfim, agradeço por sua amizade. Já quanto a Breno, tenho ele como mais um exemplo de luta o qual tenho orgulho de acompanhar, alguém que não importa as dificuldades sempre se mantém firme e disposto a esquecer os próprios problemas para ajudar os outros, enfim, também agradeço por sua amizade. E aos dois, agradeço por serem pessoas tão confiáveis.

Quero deixar um agradecimento também a todos os professores do curso de Veterinária da UFPB que contribuíram para minha formação, me auxiliando na caminhada para me tornar um profissional. Eles que em sua grande maioria são pessoas extremamente competentes e que tentam ajudar seus alunos.

Em especial quero agradecer ao professor Dr. Fernando, posto que ele vem acompanhando de perto meu caminho em busca pela profissionalização, sempre extremamente solícito e disposto a ajudar, afinal é um profissional de notável inteligência e conhecimento acerca de tantos assuntos e acima de tudo é alguém que tem gana por passar as informações que domina, melhorando cada vez mais as cadeias produtivas leiteiras enquanto auxilia produtores e veterinários formados ou em formação. Com isso, devo dizer que a maestria excepcional com a qual ele lida com o seu trabalho é uma fonte riquíssima de inspiração, logo, agradeço não só pela ajuda, mas também por todo exemplo de pessoa e profissional que ele é para mim.

Agradeço também aos residentes do setor de diagnóstico do Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva e do Laboratório de Patologia Clínica, ambos do Hospital Veterinário da UFPB Campus Areia, em especial a Iolanda, ela que foi a primeira pessoa a me ensinar sobre patologia clínica e que me mostrou como esse mundo do setor de diagnóstico é maravilhoso. Além disso, ela também é um exemplo de profissional a ser seguido, bem como é um exemplo de perseverança e de bondade. Agradeço por todos os ensinamentos e auxílio.

Também quero destacar Vinícius, alguém com quem tive poucos momentos de conversa, mas mesmo assim pude nutrir uma amizade que zelo muito. Além disso, quero agradecer por toda ajuda que ele já me prestou, afinal eu lembro de cada uma delas, assim como quero agradecê-lo pela amizade.

Sou grato também a toda equipe do NAPROSA, ela que tenho certeza que será muito grande no futuro, uma vez que já conta com excelentes profissionais e alunos dedicados e inteligentes. Quanto a esta nossa equipe, quero destacar os agradecimentos a Ewerton, alguém que agiu fortemente na fundação deste grupo, mesmo ainda sendo estudante na época. Ademais, ele também foi meu veterano em basicamente todas as áreas que segui na universidade, estando sempre disposto a ajudar e me prestando apoio em diversos momentos dessa minha jornada.

Aos técnicos atuais e passados do LMVP que viabilizam o funcionamento do mesmo, pois sem eles não teríamos como manter toda a logística que é necessária para que haja harmonia e eficiência no laboratório, de modo que todos aqueles que tive o prazer de trabalhar se mostraram pessoas solícitas e extremamente responsáveis.

Aos animais, afinal sem eles eu não estaria aqui, eles que são fonte de tanto amor, carinho, companhia, alimentos, vestimentos e tantas outras coisas que facilitam e até permitem a nossa vida e bem-estar. Nós, humanos, em especial os veterinários, devemos sempre lembrar disso, que nós dependemos dos animais para diversas normalidades das nossas vidas, assim como são criaturas magníficas e puras, que merecem todo o respeito, bem como toda a atenção

e cuidados que garantam a saúde e bem-estar deles, o que consequentemente refletirá em nossa saúde.

Em especial nesse grupo também quero destacar o meu cachorro Yoshi (*in memoriam*) que esteve comigo durante tantos anos, sempre dando força da maneira que apenas os animais conseguem fazer. Eu devo muito por todo carinho e felicidade que ele me propôs. Por ele, sempre sentirei saudade e afeto.

Por fim, agradeço a Nathália, a mulher que está comigo há 8 anos, que compartilhou cada momento da minha vida desde muito antes do meu curso, sendo eles dos mais simples aos mais complexos, e dos mais fáceis aos mais difíceis. O apoio e suporte que ela me deu em cada momento deste percurso foi vital, bem como todos os ensinamentos que podemos conquistar juntos. Para ela, não há tempo ruim para me ajudar, estando sempre disposta a me conceder conselhos, assistência e tantas outras coisas.

Fico sem palavras para descrever a importância que Nathália desempenha em minha vida e em como minha chegada a este ponto foi tão alavancada por seus feitos. Agradeço por ser a pessoa que você é, meu maior exemplo de perseverança, alguém para quem nunca menti, que amo, respeito acima de tudo e que pude desenvolver absoluta confiança. A você eu agradeço por sempre estar ao meu lado, por compartilhar tanto comigo, por tanto respeito, tanto amor, tanto suporte, tanto carinho, conselhos, por tantas verdades ditas, enfim, por tudo.

RESUMO

A bovinocultura leiteira possui enorme relevância para a economia do Brasil, uma vez que o país é o terceiro maior produtor de leite do mundo, sendo esta atividade a principal fonte de renda de inúmeras famílias brasileiras. Ainda assim a inexistência de políticas públicas nacionais e regionais que visem auxiliar os produtores geram diversas adversidades à pecuária leiteira, principalmente para os pequenos produtores, dentre as quais se destacam a mastite e a consequente propagação de patógenos com altas chances de apresentarem multirresistência aos antimicrobianos, sendo o gênero *Staphylococcus spp.* o principal representante deste grupo. Devido a isto, objetivou-se no presente estudo identificar a frequência e caracterizar o perfil de resistência de bactérias do gênero *Staphylococcus spp.* envolvidas em casos de mastite bovina na perspectiva de conscientizar os produtores leiteiros da região quanto às consequências do uso indiscriminado de antimicrobianos na bovinocultura de leite. Para tanto, foram selecionadas vacas com mastite clínica ou subclínica oriundas de propriedades leiteiras do agreste paraibano a fim de colher amostras de leite dos tetos infectados. Após isso, elas foram submetidas aos testes de identificação do gênero por métodos fenotípicos, mediante a cultura microbiológica e análise morfotintorial pela técnica de Gram e visualização em microscópio óptico, distinguindo assim as amostras referentes ao gênero *Staphylococcus spp.* das demais, para que posteriormente fossem submetidas ao teste de identificação genotípica da espécie pelo método MALDI-TOF MS. Por fim, as amostras comprovadas como espécies pertencentes ao gênero *Staphylococcus spp.* foram submetidas ao teste de sensibilidade antimicrobiana pelo método de disco difusão em placa para posterior análise do perfil de resistência. Após criteriosa investigação, foi constatado que a espécie bacteriana predominante foi o *S. aureus*, com uma frequência de 83,33%, sendo encontrado em todas as propriedades avaliadas, demonstrando assim como este insidioso patógeno está disseminado pelos rebanhos do agreste paraibano. Em seguida, foi observado que o *S. chromogenes* foi o segundo mais frequente (8,33%), seguido do *S. epidermidis* (5%) e, por fim, o *S. sciuri* (3,33%). Contudo, por mais que estas espécies sejam conhecidamente capazes de serem multirresistentes, nenhuma das cepas encontradas apresentou resistência contra mais de 3 grupos de antimicrobianos. Não obstante, quatro cepas de MRSA foram identificadas, além de duas SCNRO, ambas *S. epidermidis*, sugerindo fenotipicamente a presença de genes associados a multirresistência bacteriana em propriedades leiteiras do agreste paraibano. Além disso, os antimicrobianos mais eficientes foram medicamentos indicados para o tratamento em humanos com casos graves de infecção, de modo que a utilização em animais de produção deve ser evitada. Logo, é evidente que a presença da mastite causada por estes patógenos afeta toda a cadeia produtiva, uma vez que está associada desde a perdas ao produtor até a disseminação de bactérias com genes associados a multirresistência antimicrobiana. Portanto, maior importância deve ser atribuída ao controle da mastite subclínica, de origem contagiosa e a adesão de práticas simples de higiene e manejo.

Palavras-chave: resistência bacteriana; MRSA; oxacilina; bovinocultura leiteira; vaca.

IDENTIFICATION OF THE ANTIMICROBIAL RESISTANCE PROFILE OF STRAINS OF *STAPHYLOCOCCUS SPP.* ARISING FROM MASTITIS CASES IN DAIRY HERDS IN AGRESTE PARAIBANO

ABSTRACT

The dairy cattle farming has great relevance to Brazilian economy, as the country is the third largest milk producer in the world and considering that this activity is the main source of income to many Brazilian families. There is still the absence of public policy both national and regional to assist the producers, which generates adversities to the dairy farming, mainly to the small producers. The adversities that stand out the most are mastitis and the consequent spread of pathogens with high chances of showing multi resistance to antimicrobials, being the genus of *Staphylococcus spp.* the main representative of this group. Due to this, the aim of this study is to identify the frequency and characterize the resistance profile of the bacteria of the *Staphylococcus spp.* genus involved in cases of bovine mastitis with the perspective of make the dairy producers of the region aware of the consequences of the indiscriminate use of antimicrobials into the dairy cattle farming. Therefore, Cows with clinical and subclinical mastitis from farms in the agreste region of Paraíba, were selected to collect infected teat samples. After that, they were submitted to identification tests of the genus by phenotypic methods through microbiological culture and morphotintorial analysis using the Gram technique and visualization under an optical microscope thus distinguishing the samples referring to the genus *Staphylococcus spp.* After careful investigation it was found that the most present bacteria species was the *S. aureus* with a frequency of 83.33% being found in all properties evaluated, thus demonstrating how this insidious pathogen is disseminated by herds in the region agreste of Paraíba. Following up on the study, it was observed that *S. chromogenes* was the second most frequent (8.33%), followed by *S. epidermidis* (5%) and, finally, *S. sciuri* (3.33%). However, even though these species are known to be capable of being multiresistant, none of the strains found showed resistance against more than 3 groups of antimicrobials. Nevertheless, four MRSA strains were identified, in addition to two SCNRO, both *S. epidermidis*, phenotypically suggesting the presence of genes associated with bacterial multi-resistance in dairy properties in the agreste region of Paraíba. In addition, the most efficient antimicrobials were drugs indicated for the treatment of humans with severe cases of infection, so their use in production animals should be avoided. Furthermore, it is evident that the presence of mastitis caused by these pathogens affects the entire production chain, once that it can be associated since the losses that the producer suffers until the dissemination of bacteria with genes associated with antimicrobial multiresistance. Therefore, more importance should be attributed to the control of subclinical mastitis, of contagious origin, and the adherence to simple hygiene and management practices.

Keywords: bacterial resistance; MRSA; oxacillin; dairy cattle farming; cattle.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Frequência de cepas do gênero <i>Staphylococcus spp.</i> em casos de mastite clínica e subclínica.....	19
Gráfico 2 – Percentual de mastite subclínica por espécies de <i>Staphylococcus spp.</i>	20
Gráfico 3 – Percentual de mastite clínica por espécies de <i>Staphylococcus spp.</i>	20
Gráfico 4 – Sensibilidade de cepas de <i>S. aureus</i> a antimicrobianos preditivos para detecção de MRSA.....	22

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Percentual de sensibilidade e resistência de cepas de <i>Staphylococcus spp.</i> frente a diversos antimicrobianos.....	21
Tabela 2 – Frequência dos casos de mastite por espécie de <i>Staphylococcus spp.</i> e a respectiva frequência de cepas resistentes a Oxacilina.....	22
Tabela 3 – Perfis de sensibilidade apresentados por bactérias do gênero <i>Staphylococcus spp.</i> resistentes a Oxacilina.....	23

LISTA DE SIGLAS

FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
CEPEA	Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
RIISPOA	Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
IN	Instrução normativa
MRSA	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
SCP	<i>Staphylococcus</i> Coagulase Positiva
SCN	<i>Staphylococcus</i> Coagulase Negativa
MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight
LMVP	Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
FMVZ-USP	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo
CEUA	Comissão de Ética na Utilização de Animais
CMT	<i>California Mastitis Test</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
TSA	Teste de Sensibilidade Antimicrobiana
CLSI	Clinical & Laboratory Standards Institute
SCNRO	<i>Staphylococcus</i> Coagulase-Negativa Resistente a Oxacilina
OMS	Organização Mundial da Saúde
CCS	Contagem de Células Somáticas do leite
céls/mL	Células por mililitro
CCST	Contagem de Células Somáticas do leite do Tanque de expansão
SNA	<i>Staphylococcus</i> Não-aureus

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 METODOLOGIA	15
2.1 Animais	15
2.2 Primeira etapa: Identificação fenotípica	15
2.2.1 Amostras:	15
2.2.2 Processamento:	16
2.3 Segunda etapa: Identificação genotípica	16
2.3.1 Amostras:	16
2.3.2 Processamento:	17
2.3.3 Análise:	17
2.4 Terceira etapa: Identificação do perfil de resistência antimicrobiana	17
2.4.1 Amostras:	17
2.4.2 Processamento:	17
2.4.3 Análise:	18
3 RESULTADOS	19
4 DISCUSSÃO	24
5 CONCLUSÕES	28
6 REFERÊNCIAS	29

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o terceiro maior produtor de leite do mundo (FAO, 2019), sendo este um dos setores mais importantes para a economia brasileira. Segundo dados da CEPEA (2020), a pecuária em 2020 contribuiu com 8,1% do PIB nacional. Além disso, esta é uma atividade que compreende como a principal fonte de renda de inúmeras famílias brasileiras, especialmente nos estados nordestinos, uma vez que no Brasil a maioria dos estabelecimentos agropecuários são de agricultura familiar, totalizando mais de 80% do setor (CONAB, 2017).

Em contrapartida, a falta de políticas públicas nacionais e regionais eficientes que visem auxiliar os produtores geram diversas perdas à pecuária leiteira, resultando em um cenário amplamente conhecido pelos profissionais e pecuaristas da área, que se baseia no enfrentamento diário de inúmeras adversidades, dentre as quais se destacam a falta de gestão de dados, educação continuada, medidas sanitárias e controles básicos de higiene. Além disso, os altos parâmetros de qualidade do leite impostos pelos laticínios resultaram na impossibilidade de adesão de muitos pequenos produtores a tais requisitos. Logo, devido a esta pressão imposta pelo mercado e a falta de políticas públicas, diversos produtores migraram para o mercado informal (LAVOR et al., 2019).

As constatações supracitadas indicam riscos à saúde pública e à saúde do rebanho, uma vez que o controle de enfermidades dentro das propriedades se torna ineficaz, ocasionando diversos problemas na produção dos rebanhos brasileiros. Isto pode ser comprovado por características da nossa pecuária como, por exemplo, a alta prevalência de *S. agalactiae* que pode atingir de 60-70% dos rebanhos brasileiros (Dos SANTOS & FONSECA, 2019), por mais que a erradicação deste patógeno possa ser concluída rapidamente por meio de um programa de cultura e tratamento com abate mínimo (KEEFE, 2012).

Consequente a tais obstáculos temos a mastite como um dos maiores impasses a pecuária leiteira mundial, sendo esta enfermidade definida como a inflamação da glândula mamária de etiologia complexa, caracterizada por alterações físico-químicas, organolépticas, na celularidade do leite e patológicas no parênquima mamário de animais domésticos (RIBEIRO et al., 2016), cujas principais causas são infecções por microorganismos, dentre as quais as bactérias são as mais frequentes (Dos SANTOS & FONSECA, 2019).

Posto isto, a mastite pode ser classificada como clínica, quando há a presença de sinais clínicos no animal ou alterações no leite, e em subclínica, sendo esta a forma mais frequente, a qual se caracteriza por não apresentar sinais ou sintomas perceptíveis na glândula mamária, tampouco no leite, embora provoque grandes prejuízos econômicos em razão da diminuição da produção e qualidade do leite (RIBEIRO et al., 2016). Desse modo, podemos destacar também

o gênero *Staphylococcus spp.* como o mais frequentemente isolado nos casos de mastite, como foi constatado nos estudos conduzidos por Piepers et al. (2007), onde este gênero foi presente em cerca de 60% das infecções intramamárias e por Lavor et al. (2019), cuja frequência foi de 31,1%, sendo a maior entre os patógenos avaliados. Além disso, este gênero é principalmente associado a casos de mastite subclínica (RIBEIRO et al., 2016).

Dentro dos *Staphylococcus spp.*, o *S. aureus* se destaca por possuir uma frequência de 30 a 85% em rebanhos de todo mundo (Dos SANTOS & FONSECA, 2019), sendo o patógeno contagioso mais comum (CHANDRASEKARAN et al., 2014), embora também possa causar mastite de origem ambiental (Dos SANTOS & FONSECA, 2019). Esta bactéria também é capaz de causar infecções crônicas com sérios danos ao parênquima mamário e baixas taxas de cura, sendo este perfil muito associado aos fatores de virulência intrínsecos ao agente, o que dificulta o seu tratamento e controle no rebanho (RIBEIRO et al., 2016). Além disto, o *S. aureus* apresenta grande capacidade de mutação, podendo desenvolver diversos mecanismos de resistência, sendo o *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina (MRSA) um dos mais preocupantes microorganismos no âmbito da saúde pública, visto que esta cepa é capaz de se tornar resistente a todas as classes de antibióticos disponíveis clinicamente (VESTERGAARD, FREES & INGMER, 2019), sendo responsável por uma ampla variedade de infecções em todo o mundo (AIRES DE SOUZA, 2017).

Ainda dentro deste gênero, também devemos nos atentar para as cepas de *Staphylococcus* Coagulase-Negativa (SCN), uma vez que as mesmas têm sido relatadas como os principais causadores de mastite em bovinos, como foi constatado nos estudos conduzidos por Piepers et al. (2007), Thorberg et al. (2009), Supré et al. (2011), Tomazi et al. (2014) e Acosta et al. (2016), dessa forma, resultando em grandes prejuízos econômicos para o produtor. Além disto, também devemos ter em mente que as cepas de SCN Resistentes a Oxacilina (SCNRO) são importantes microorganismos associados a casos de infecções hospitalares multirresistentes em humanos (RIGATTI et al., 2010; PEREZ & D'AZEVEDO, 2008).

O conjunto de tais fatores demonstram a importância do estudo e conscientização acerca destes patógenos, uma vez que causam tanto prejuízos econômicos, cujas maiores perdas são creditadas à redução na produção de leite, que oscila entre 30 a 50% nos animais acometidos (RIBEIRO et al., 2016), quanto prejuízos a saúde pública, principalmente devido a disseminação de cepas multirresistentes.

Com isto, objetivou-se no presente estudo identificar a frequência e caracterizar o perfil de resistência de bactérias do gênero *Staphylococcus spp.* envolvidas em casos de mastite bovina no agreste paraibano na perspectiva de conscientizar os produtores leiteiros da região quanto às consequências do uso indiscriminado de antimicrobianos na bovinocultura de leite.

2 METODOLOGIA

Este trabalho foi realizado considerando três etapas, sendo a primeira referente a coleta de amostras de leite mastítico, bem como a identificação fenotípica dos agentes causadores e a seleção das cepas pertencentes ao gênero *Staphylococcus spp.* Na segunda etapa, por sua vez, foi realizada a identificação das espécies de *Staphylococcus spp.* por meio da técnica de MALDI-TOF e finalmente, na terceira etapa, foi efetuada a identificação do perfil de resistência antimicrobiana das cepas encontradas, para então ser feita a análise dos dados obtidos e discussão acerca dos seus impactos na produção leiteira e na saúde pública.

A coleta e o processamento das amostras foram realizadas no período de Agosto 2019 até Julho de 2020, em propriedades leiteiras do Agreste paraibano e as análises microbiológicas no Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva (LMVP) do Hospital Veterinário da UFPB, Campus II, Areia – Paraíba e no Laboratório Qualileite-FMVZ-USP da Universidade de São Paulo, Campus Pirassununga, São Paulo.

As análises dos dados, por sua vez, foram realizadas durante o período de Fevereiro de 2020 até Abril de 2021.

2.1 Animais

- Os animais estudados foram vacas em diferentes fases de lactação que pertenciam a seis diferentes propriedades leiteiras localizadas no Agreste paraibano. As propriedades foram selecionadas de acordo com a disponibilidade e conveniência para o estudo.
- O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) sob o protocolo de número 3052290419.

2.2 Primeira etapa: Identificação fenotípica

2.2.1 Amostras:

- Foram colhidas amostras de leite de aproximadamente 8 mL, em tubos estéreis, dos quartos mamários com mastite clínica ou subclínica apontados pelos testes da caneca telada ou pelo *California Mastitis Test* (CMT), respectivamente, após prévia antissepsia com álcool a 70%. Após a colheita, as amostras foram mantidas refrigeradas em caixas isotérmicas com gelo reciclável e então encaminhadas para o processamento no LMVP.
- Amostras previamente colhidas e congeladas em alíquotas em vertentes anteriores deste projeto também foram utilizadas no presente estudo, contanto

que pertencessem ao gênero *Staphylococcus spp.* e os dados do tipo de mastite, data da ocorrência e a identificação do animal e da propriedade estivessem disponíveis.

2.2.2 Processamento:

- As amostras foram homogeneizadas e então semeadas com o auxílio de alças bacteriológicas na superfície de placas de Petri contendo Ágar sangue base enriquecido com sangue de carneiro desfibrinado a 5% e em placas de Petri contendo Ágar MacConkey, sendo posteriormente incubadas em estufas a 37° C por 24 a 48 horas.
- Após o crescimento, as amostras foram identificadas quanto às características de crescimento colonial e submetidas aos testes da catalase, oxidase e identificação morfo-tintorial pela técnica de coloração de Gram e visualização em microscópio óptico.
- As bactérias identificadas como pertencentes ao gênero *Staphylococcus spp.* foram repicadas em frascos estéreis contendo caldo *brain heart infusion* (BHI) e repicadas com movimentos circulares na superfície de placas de Petri contendo Ágar DNase e novamente incubadas em estufas a 37° C.
- Após o crescimento em 24 horas no Ágar DNase, foi adicionado a solução reveladora de ácido clorídrico 1 N e então verificada a presença de um halo que confirma a amostra como positiva para este teste.
- Quanto às amostras repicadas no caldo BHI, após o crescimento em 24 horas as mesmas foram repicadas em duplicatas em tubos cônicos de 2 mL com caldo BHI suplementado com Glicerina (10%) esterilizada e incubadas novamente por 24 horas em estufas a 37° C e posteriormente congeladas no freezer do LMVP.

2.3 Segunda etapa: Identificação genotípica

2.3.1 Amostras:

- Amostras congeladas em tubos de 2 mL contendo caldo BHI mais Glicerina (10%) identificadas como pertencentes ao gênero *Staphylococcus spp.* na etapa anterior e armazenadas no freezer do LMVP.

2.3.2 Processamento:

- Uma alíquota de cada amostra selecionada foi encaminhada ao Laboratório Qualileite-FMVZ-USP em caixas isotérmicas refrigeradas com gelo reciclável, para a realização da identificação da espécie por meio da técnica de MALDI-TOF MS (*Matrix Associated Laser Desorption-Ionization – Time of Flight*).

2.3.3 Análise:

- A análise dos dados foi feita de maneira descritiva, com a exposição das médias e porcentagens apresentadas na forma de gráficos, utilizando a plataforma Microsoft Excel (2019).

2.4 Terceira etapa: Identificação do perfil de resistência antimicrobiana

2.4.1 Amostras:

- Alíquotas congeladas em BHI mais Glicerina (10%) armazenadas no freezer do LMVP que foram confirmadas como espécies pertencentes ao gênero *Staphylococcus spp.* pela técnica do MALDI-TOF MS na etapa anterior.

2.4.2 Processamento:

- O processamento foi realizado no LMVP, onde as amostras foram repicadas em Ágar Sangue base enriquecido com sangue bovino desfibrinado a 5% e incubadas em estufas a 37°C por 24 horas.
- Após o crescimento, as amostras foram submetidas ao teste de sensibilidade antimicrobiana (TSA) pelo método de disco difusão em placas contendo o Ágar Muller Hinton, testando diferentes grupos de antibióticos, escolhendo preferencialmente aqueles mais utilizados na pecuária leiteira e indicados pelo CLSI (2018), sendo eles o Sulfazotrim (25 µg), como representante das Sulfas, a Enrofloxacina (10 µg) e a Norfloxacina (10 µg) como representantes das Fluorquinolonas, a Gentamicina (10 µg) como representante dos Aminoglicosídeos, a Penicilina (10 Un) como representante dos β-Lactâmicos, a Tetraciclina (30 µg) como representante das Tetraciclinas, o Cefepime (30 µg) como representante das Cefalosporinas de 4ª geração, o Florfenicol (30 µg) que não possui grupo, a Eritromicina (15 µg) como representante dos Macrolídeos, a Cefoxitina (30 µg) como representante das Cefalosporinas de 2ª geração e preditiva para Meticilina e a Oxacilina (1 µg)

como representante dos β -Lactâmicos semi-sintéticos resistentes a penicilinas e preditiva para a Meticilina.

- Para a detecção de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à Meticilina (MRSA) foram utilizados os antibióticos Oxacilina (SKOV et al., 2013; UDDIN & AHN, 2017; ELSAYED et al., 2019) e Cefoxitina (CLSI, 2018) como preditivos. Já para os *Staphylococcus Coagulase Negativa* resistente a Oxacilina (SCNRO) foi utilizado o disco de Cefoxitina, seguindo as indicações do CLSI (2018).

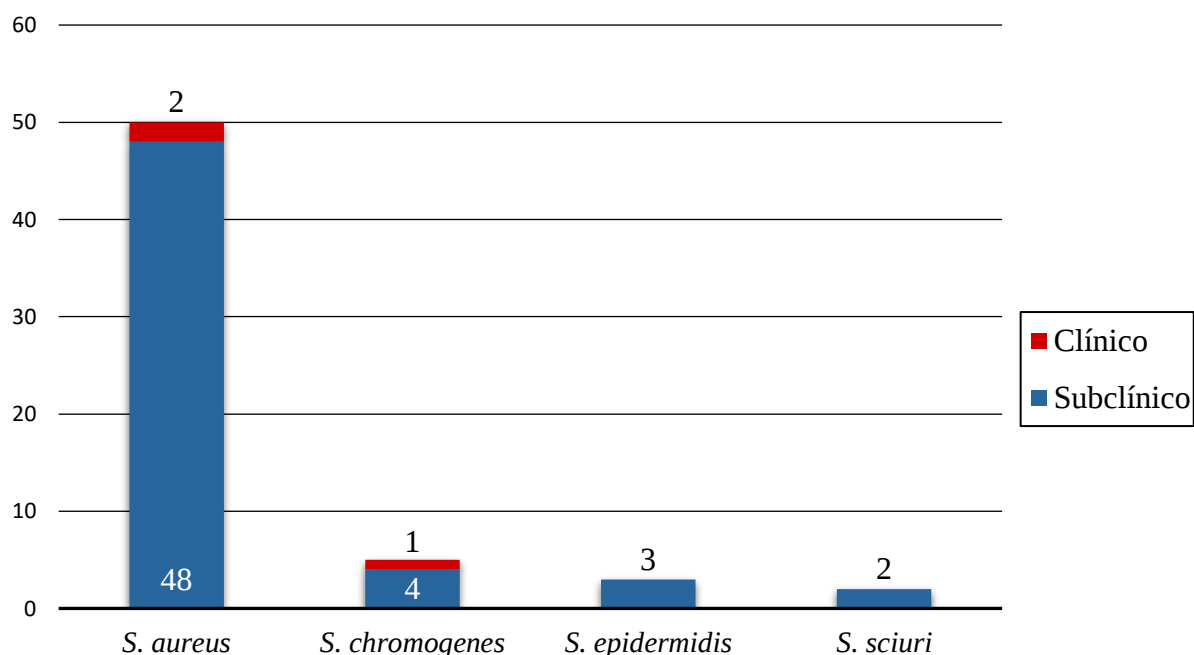
2.4.3 Análise:

- A interpretação dos halos de inibição seguiu os padrões preconizados pelo CLSI (2018), com a análise dos dados realizada de maneira descritiva e a exposição das médias e porcentagens apresentadas na forma de gráficos utilizando a plataforma Microsoft Excel (2019).

3 RESULTADOS

Foram analisadas um total de 315 amostras de leite, das quais 60 (19,05%) espécimes de bactérias do gênero *Staphylococcus spp.* foram identificadas e selecionadas para as avaliações do presente estudo, das quais todas foram positivas para o teste da DNase. Deste universo amostral, 83,33% (50/60) das cepas apresentaram resultados positivos para a espécie *S. aureus* no teste do MALDITOF-MS, ao ponto que 8,33% (5/60) apresentaram resultado positivo para *S. chromogenes*, 5% (3/60) para *S. epidermidis* e 3,33% (2/60) para *S. sciuri* (Gráfico 1).

Gráfico 1: Frequência de cepas do gênero *Staphylococcus spp.* em casos de mastite clínica e subclínica.



Frequência dos casos de mastite em isolados de leite no Agreste Paraibano

Com relação ao tipo de mastite que este gênero causou, podemos observar que 95% (57/60) dos casos se tratavam de mastite subclínica, dentre os quais 84% (48/57) foram positivos para *S. aureus*, 7% (4/57) foram positivos para *S. chromogenes*, 5% (3/57) foram positivos para *S. epidermidis* e 4% (2/57) foram positivos para *S. sciuri*. Já com relação a mastite clínica, foi observado que 5% (3/60) de todos os casos associados a este gênero foram positivos para testes que confirmam este tipo de mastite, de modo que 67% (2/3) foi positivo para *S. aureus* e 33% (1/3) para *S. chromogenes*. A distribuição dos percentis de acordo com a espécie

e o tipo de mastite estão expostos no Gráfico 2, para mastite subclínica, e no Gráfico 3, para os casos de mastite clínica.

Posto isto, avaliando o perfil de susceptibilidade antimicrobiana (TSA) *in vitro* destas cepas, observamos que as fluorquinolonas Enrofloxacina e Norfloxacina, bem como o Florfenicol e a cefalosporina de 4ª geração Cefepime, foram os antimicrobianos que demonstraram maior eficiência, onde 100% das amostras demonstraram susceptibilidade aos mesmos. Em contrapartida, a Penicilina, antibiótico amplamente utilizado no tratamento da mastite e outras enfermidades de animais e até mesmo humanos, apresentou eficiência de apenas 12%.

A respeito dos demais antimicrobianos, a maioria das cepas avaliadas demonstrou sensibilidade superior aos 90%. Neste sentido foi observado que 98% delas foi sensível a Gentamicina, 97% ao Sulfazotrim e Cefoxitina, e 93% a Tetraciclina e a Eritromicina. Por fim, também foi avaliado o antimicrobiano Oxacilina, ao qual 88% das bactérias apresentaram-se como sensíveis. Os resultados do TSA estão expostos na Tabela 1.

Gráfico 2: Percentual de mastite subclínica por espécie de *Staphylococcus spp.*

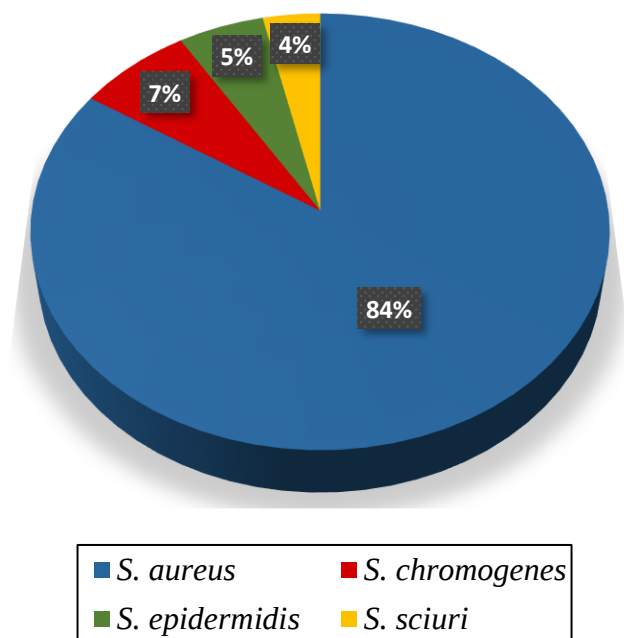
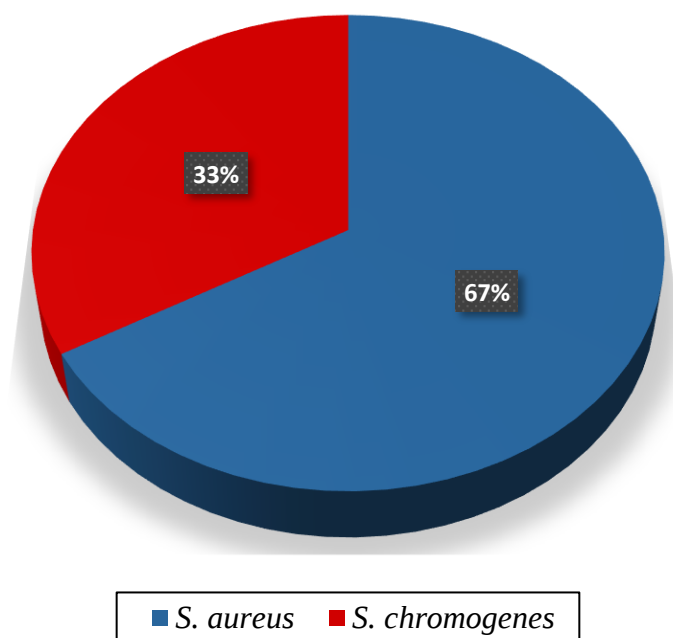


Gráfico 3: Percentual de mastite clínica por espécie de *Staphylococcus spp.*



Com relação a detecção de resistência a Oxacilina, foi constatado que todas as cepas de *Staphylococcus aureus* avaliadas demonstraram sensibilidade ao disco de Cefoxitina (Gráfico 4), contudo quatro destas amostras (8%) provenientes de mastite subclínica demonstraram resistência ao disco de Oxacilina (Tabela 2), logo, são consideradas fenotipicamente resistentes a todos os β -Lactâmicos semi-sintéticos resistentes a penicilinas, ou seja, cepas MRSA

(SKOV et al., 2013; UDDIN & AHN, 2017; ELSAYED et al., 2019), sendo necessário a utilização de técnicas de identificação moleculares dos genes associados a este perfil de resistência para afirmações mais assertivas.

Já com relação aos SCN, observamos que duas das amostras dos *S. epidermidis*, ambas provenientes de mastite subclínica, resultaram em expressões fenotípicas condizentes com cepas SCNRO (Tabela 2), contudo, os únicos grupos que estes patógenos apresentaram resistência além dos betalactâmicos foram as Sulfas, onde ambas as amostras demonstraram resistência, e os Aminoglicosídeos, onde apenas uma destas amostras apresentou resistência (Tabela 3).

Tabela 1: Percentual de sensibilidade e resistência de cepas de *Staphylococcus spp.* frente a diversos antimicrobianos

Antimicrobiano	<i>S. aureus</i>		<i>S. chromogenes</i>		<i>S. epidermidis</i>		<i>S. sciuri</i>		Médias	
	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R
Sulfazotrim	100%	0%	100%	0%	33%	67%	100%	0%	97%	3%
Enrofloxacina	100%	0%	100%	0%	100%	0%	100%	0%	100%	0%
Gentamicina	100%	0%	100%	0%	67%	33%	100%	0%	98%	2%
Penicilina	6%	94%	40%	60%	67%	33%	0%	100%	12%	88%
Tetraciclina	96%	4%	60%	40%	100%	0%	100%	0%	93%	7%
Cefepime	100%	0%	100%	0%	100%	0%	100%	0%	100%	0%
Florfenicol	100%	0%	100%	0%	100%	0%	100%	0%	100%	0%
Eritromicina	94%	6%	100%	0%	67%	33%	100%	0%	93%	7%
Cefoxitina	100%	0%	100%	0%	33%	67%	100%	0%	97%	3%
Oxacilina*⁺	92%	8%	-	-	-	-	-	-	92%	8%
Norfloxacina*	100%	0%	100%	0%	100%	0%	100%	0%	100%	0%
TOTAL	90%	10%	87%	13%	76%	24%	91%	9%	89%	11%

S: Sensibilidade; R: Resistência; * Devido ao não crescimento de quatro amostras no ágar Muller Hinton, o número amostral testado para estes antimicrobianos foi de 56 cepas de *Staphylococcus spp.*; - O antimicrobiano Oxacilina não foi avaliado para *S. chromogenes* e *S. epidermidis*, uma vez que segundo o CLSI (2018) a sua sensibilidade para o teste do disco difusão é baixa e devido a isto o disco de Cefoxitina é utilizada como preditivo para a identificação das cepas de SCNRO; + Antimicrobiano testado, pois a expressão de resistência a ele pode indicar a expressão de genes *MecC-MRSA* associados a bombas de efluxo (SKOV et al., 2013).

Gráfico 4: Sensibilidade de cepas de *S. aureus* a antimicrobianos preditivos para detecção de MRSA

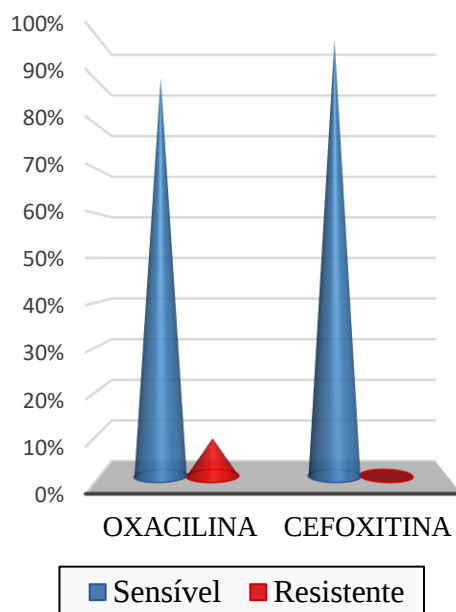


Tabela 2: Frequência dos casos de mastite por espécie de *Staphylococcus spp.* e a respectiva frequência de cepas resistentes a Oxacilina

Bactéria	Frequência		Resistentes a Oxacilina	Mastite	
	n	%		Clínica	Subclínica
<i>S. aureus</i>	50	83,3	4	2	48
<i>S. chromogenes</i> *	5	8,33	0	1	4
<i>S. epidermidis</i> *	3	5	2	0	3
<i>S. sciuri</i>	2	3,33	0	0	2
TOTAL	60	100	6	3	57

n: Número de cepas isoladas; * Para estes patógenos foi utilizado o disco de Cefoxitina como preditivo para a identificação da resistência a Oxacilina

Tabela 3: Perfis de sensibilidade apresentados por bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. resistentes a Oxacilina

Antimicrobiano	<i>S. aureus</i>			<i>S. epidermidis</i>	
	Perfil I	Perfil II	Perfil III	Perfil I	Perfil II
Sulfazotrim	S	S	S	R	R
Enrofloxacina	S	S	S	S	S
Gentamicina	S	S	S	R	S
Penicilina	R	R	R	S	S
Tetraciclina	S	R	S	S	S
Cefepime	S	S	S	S	S
Florfenicol	S	S	S	S	S
Eritromicina	S	S	R	S	S
Cefoxitina*	S	S	S	R	R
Oxacilina⁺	R	R	R	-	-
Norfloxacina	S	S	S	S	S
N	1	1	2	1	1

Perfis de resistência apresentados pelas cepas de *Staphylococcus* spp. identificados como resistentes à Oxacilina no teste do antibiograma pelo método disco difusão. S: Sensível; R: Resistente; N: Número total de amostras que demonstraram o perfil em questão; * Antibiótico preditivo para Oxacilina no antibiograma pelo método de disco difusão em placa para as espécies de SCN; + Antimicrobiano testado pois a expressão de resistência a ele pode indicar a expressão de genes MecC-MRSA associados a bombas de efluxo (SKOV et al., 2013); - Antimicrobiano não avaliado.

4 DISCUSSÃO

No presente trabalho foi constatado grande frequência de *S. aureus* relacionados à mastite, principalmente do tipo subclínico, demonstrando assim o enorme impacto que este patógeno causa na pecuária leiteira. Estes dados foram encontrados em estudos semelhantes, como o que foi conduzido por Freitas et al. (2018), onde os *S. aureus* foram responsáveis por 90% dos isolados e no estudo realizado por Elsayed et al. (2019), onde esta foi a única espécie encontrada pertencente ao gênero *Staphylococcus spp.*

Tal achado deve ser avaliado com preocupação, visto que estes agentes são capazes de gerar surtos de mastite, sendo este um patógeno de difícil controle, devido a fatores como a dificuldade de diagnóstico de todas as vacas infectadas, grande diversidade de reservatórios, infecções de longa duração, com tendência a se tornarem crônicas, alta resistência e baixa taxa de cura aos antimicrobianos (Dos SANTOS & FONSECA, 2019).

Além disto, este patógeno faz parte do seleto grupo de bactérias apontadas pela OMS como as mais críticas em relação a capacidade de desenvolver multirresistência aos antimicrobianos, de modo que as cepas conhecidas como MRSA são as mais preocupantes dentre as bactérias do gênero *Staphylococcus spp.*, sendo responsável por uma ampla variedade de infecções em todo o mundo, que pode ir desde infecções leves de pele até doenças invasivas com risco de vida (AIRES DE SOUZA, 2017)

O termo MRSA por sua vez, se refere às cepas de *S. aureus* resistentes a betalactâmicos semi-sintéticos resistentes às penicilinas, como Meticilina, Oxacilina e Cloxacilina (PEXARA et al., 2017) que, segundo o mesmo autor, também costumam apresentar resistência a quase todas as outros grupos de antimicrobianos, como os aminoglicosídeos, macrolídeos, cloranfenicol, tetraciclina e fluorquinolonas. Isto pôde ser constatado em estudos como o que foi conduzido por Chandrasekaran et al. (2014), onde cerca de 91,67% das cepas de MRSA apresentaram multirresistência às drogas antimicrobianas.

A prevalência encontrada na literatura de cepas deste patógeno causando mastite varia, a exemplo do que foi constatada em uma revisão de literatura conduzida por Pexara et al. (2017), cuja prevalência variou de 0% em regiões do Estados Unidos até a 60,3% na Etiópia. No Brasil, por sua vez, foi relatada uma prevalência de 25%, o que destoa da frequência de 8% encontrada no presente estudo. Aliado a isto, apesar de cepas MRSA apresentarem maior probabilidade de serem resistentes a diversos grupos além dos betalactâmicos, este perfil não foi encontrado em nosso estudo, onde duas das cepas encontradas apresentaram resistência apenas ao grupo dos Macrolídeos, representados pela Eritromicina, uma apresentou resistência

apenas ao grupo das Tetraciclinas, representadas pelo antibiótico de mesmo nome e a última delas não apresentou resistência a nenhum outro grupo de antimicrobiano (Tabela 3).

No entanto, estes dados não devem ser considerados como satisfatórios, pois, devido a capacidade de mutação destas cepas, diversos mecanismos de resistência podem ser adquiridos com o tempo, além de que os genes *mecA* responsáveis pela expressão da resistência a Meticilina podem ser transmitidos para outras espécies de estafilococos (BENITES et al., 2016). Ademais, a presença de cepas resistentes a Oxacilina podem estar correlacionadas a expressão de genes codificadores de bombas de efluxo associadas ao gene de multirresistência *MecC-MRSA* (SKOV et al., 2013).

Do mesmo modo em que estes fatores tão alarmantes transformam o *S. aureus* um problema de saúde pública, esta bactéria também é de extrema relevância para a pecuária leiteira por se tratar de um patógeno principal da mastite, gerando casos costumeiramente subclínicos com a média da CCS dos quartos infectados de 600.000 céls/mL, podendo chegar a valores maiores que 1.000.000 de céls/mL (RIBEIRO et al., 2016), o que resulta em diversos prejuízos econômicos para o pecuarista (LOPES et al., 2011; GONÇALVES et al., 2021).

Logo, é notável a importância que deve ser dada aos casos deste tipo de mastite, que muitas vezes é negligenciada pelo produtor, uma vez que aparenta não causar elevado prejuízo e não é visível sem a utilização de testes específicos. Então, a circulação deste insidioso patógeno nessas amostras, principalmente associado a mastite subclínica, demonstram a importância que deve ser atribuída ao controle deste tipo de mastite, dos agentes contagiosos e, consequentemente, a adesão de práticas simples que podem auxiliar no controle dos mesmos, resultando em melhoria da qualidade do leite, logo, lucro para o produtor e menor exposição da população a este patógeno.

A respeito dos SCN isolados, vemos que os dados obtidos no presente estudo entram em contradição com o que vem sendo amplamente relatado na literatura, onde este grupo se mostra mais frequente do que os *S. aureus*, a exemplo do que foi relatado nos trabalhos conduzidos por Piepers et al. (2007), Thorberg et al. (2009), Supré et al. (2011), Tomazi et al. (2014) e Acosta et al. (2016), onde as espécies de SCN foram as mais frequentemente isoladas em casos de infecções intramamárias.

Posto isto, podemos verificar que a maior frequência de *S. chromogenes* dentre as espécies de SCN corrobora com os dados encontrados em diversos trabalhos (PIESSENS et al., 2011; SUPRÉ et al., 2011; TOMAZI et al., 2015 e RASPANTI et al., 2016), sendo ele um patógeno majoritariamente contagioso, que raramente pode ser encontrado no ambiente, indicando que outros reservatórios, como o próprio leite, são mais importantes na sua epidemiologia (PIESSENS et al., 2011).

Supré et al. (2011) relataram que infecções causadas por este patógeno possuem a capacidade de elevar o CCS dos quartos mamários de forma semelhante aos *S. aureus*. Esta característica também foi constatada por Tomazi et al. (2015), porém, em seu estudo, eles também verificaram que mesmo com a elevação do CCS, a mastite subclínica causada por *S. chromogenes* não interferiu na produção e composição do leite dos quartos afetados.

Por outro lado, alguns estudos recentes também sugerem que os *Staphylococcus Não-Aureus* (SNA), particularmente o *S. chromogenes*, podem conferir proteção contra os patógenos maiores causadores de mastite (FERRONATO et al. 2019) em especial as gram-positivas. Logo, é possível que as frequências de *S. aureus* e *S. chromogenes* encontradas em nosso estudo estejam correlacionadas entre si, uma vez que a ausência de um possível inibidor pode ser um fator que eleva a presença de patógenos principais no rebanho. Não obstante, para conclusões mais assertivas acerca deste assunto, se faz necessário a realização de avaliações mais profundas sobre as correlações entre as frequências destas bactérias.

Com relação aos *S. epidermidis*, podemos analisar que sua presença em nossos resultados corrobora com estudos de frequência e prevalência de SCN em casos de mastite, como o que foi encontrado por Thorberg et al. (2009), onde este patógeno foi o mais frequente, com prevalências de 30 a 32% entre as amostras de SCN, e no estudo conduzido por Lavor et al. (2019) onde o *S. epidermidis* foi o segundo mais comum deste grupo, com uma frequência de 19,4%. Contudo, mesmo com tais dados, pouca importância é atribuída a presença desta espécie em rebanhos leiteiros.

Nas propriedades leiteiras, os SCN não recebem a devida atenção, uma vez que são associados principalmente a casos de mastite subclínica, contudo, eles são conhecidos como notáveis patógenos causadores de infecções hospitalares, tal qual o *S. aureus*. Em um estudo conduzido por Riggati et al. (2010), os pesquisadores colheram e identificaram mais de 625 amostras de sangue de infecções hospitalares em humanos, das quais 124 (19,8%) foram positivas para SCN. Ainda segundo o mesmo autor, das amostras de SCN, 67% foram *S. epidermidis* e desse total 95% foi resistente ao disco de Cefoxitina e apresentaram genes de resistência *mecA* ou *mecB*.

Em outro estudo conduzido por Perez e d'Azevedo (2008), dos SCN isolados de infecções hospitalares, 68,2% eram *S. epidermidis* e 78,4% deles apresentaram o gene *mecA*. Logo, a capacidade que os *S. aureus* possuem de transmitir tais genes para outras espécies de *Staphylococcus* (BENITES et al. 2016) pode ser uma das possíveis justificativas para a alta frequência de *S. epidermidis* resistentes a Oxacilina encontradas inclusive no presente estudo.

Desta forma, torna-se nítido os impactos que a deficiência no controle de mastites contagiosas podem levar para a saúde do rebanho, mas que também oferece grandes riscos aos

produtores, ordenhadores, familiares e consumidores finais, visto que foi constatado nas propriedades avaliadas a presença de cepas com a expressão fenotípica de genes associados a multirresistência bacteriana, como é o caso dos *S. epidermidis* Resistentes a Oxacilina relatados no presente estudo. Desse modo, a circulação destes agentes nos rebanhos leiteiros podem resultar na veiculação dos mesmos para os humanos, gerando assim diversos tipos de infecções.

Por fim, a respeito do perfil de resistência encontrado em nosso estudo, devemos ter em mente que os dados necessitam ser analisados com cautela, pois, por mais que as amostras tenham apresentado um alto padrão de sensibilidade aos antimicrobianos, a presença de cepas de *S. aureus* e *S. epidermidis* resistentes a Oxacilina demonstram como há a probabilidade destas bactérias evoluírem até se tornarem multirresistentes.

Além disso, os maiores índices de sensibilidade (100%) foram para o Cefepime, Enrofloxacin e Norfloxacin, antimicrobianos que devem ser utilizados apenas como última escolha em tratamento de infecções graves em humanos. Já a Penicilina, demonstrou resultados preocupantes, onde 88% das cepas estudadas foram resistentes a ela, sendo tal perfil muito creditado ao uso indiscriminado deste antibiótico relatado pelos próprios produtores (Lavor et al., 2019).

5 CONCLUSÕES

Com isto, podemos perceber grande circulação do *S. aureus* nas amostras analisadas, de modo que este patógeno foi o mais frequente no agreste paraibano, principalmente associado a casos de mastite subclínica. Além dele, também observamos uma importante circulação de cepas de SCN resistentes fenotipicamente a oxacilina, demonstrando assim como maior importância deve ser atribuída ao controle da mastite subclínica, aos agentes contagiosos e, conseqüentemente, a adesão a práticas simples que podem auxiliar no controle dos mesmos, resultando em melhoria na qualidade do leite, conferindo maior lucro ao produtor, e menor exposição da população a este patógeno.

Também devemos destacar a ineficiência da Penicilina sobre as amostras analisadas, uma vez que a mesma demonstrou eficácia de apenas 12%, sendo este quadro muito associado ao uso indiscriminado de antimicrobianos. Desta forma, não se pode perder de vista a importância de processos contínuos de educação em saúde, abordando o controle e os impactos desta enfermidade sobre as complexas cadeias de produção e consumo de leite.

6 REFERÊNCIAS

- ACOSTA, A. C.; SILVA, L. B. G.; MEDEIROS, E. S.; PINHEIRO-JÚNIOR, J. W.; MOTA, R. A.. **Mastites em ruminantes no Brasil**. Pesq. Vet. Bras., Rio de Janeiro , v. 36, n. 7, p. 565-573, July 2016 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2016000700565&lng=en&nrm=iso>. access on 01 May 2021. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2016000700001>.
- AIRES DE SOUSA, M.. **Methicillin-resistant Staphylococcus aureus among animals: current overview**. Clinical Microbiology and Infection 23: 373-380, 2017.
- BENITES N. R.; MELVILLE P. A.; RIBEIRO M. G.. Estafilococcias. In: MEGID. Doenças infecciosas em animais de produção e companhia 1 ed. Rio de Janeiro: Roca, 2016. p 300- 315.
- CEPEA – Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada. PIB do agronegócio brasileiro. Disponível em: <https://www.cepea.esalq.usp.br/br/pib-do-agronegocio-brasileiro.aspx>. Acesso em: 29 de Abril 2021.
- CHANDRASEKARAN D.; VENKATESAN P.; TIRUMURUGAAN K. G.; NAMBI A. P.; THIRUNAVUKKARASU P. S.; KUMANAN K.; VAIRAMUTHU S.; RAMESH S.. **A study on methicillin resistant Staphylococcus aureus mastitis in dairy cattle**. J. Appl. Nat. Sci. 6(2):356-361, 2014.
- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 18th Supplement (M100-S18). Clinical and Laboratory Standards Institute , Wayne, PA, 2018.
- CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Agricultura familiar. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/agricultura-familiar>. Acesso em: 29 de Abril 2021.
- ELSAYED, M. S. A. E.; ROSHDEY, T.; SALAH, A.; TARABEES, R.; YOUNIS, G.; ELDEEP, D. **Phenotypic and genotypic methods for identification of slime layer production, efflux pump activity, and antimicrobial resistance genes as potential causes of the antimicrobial resistance of some mastitis pathogens from farms in Menoufia, Egypt**. Mol Biol Rep. 2019 Dec;46(6):6533-6546. doi: 10.1007/s11033-019-05099-6. Epub 2019 Oct 3. PMID: 31583568.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO STAT - Livestock Primary. Roma, Italy, 2019. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QL>>. Acesso em: 29 abr. 2021.
- FERRONATTO, J.A.; SOUZA, F.N.; DELLA LIBERA, A.M.M.P.; DE VLIEGHER, S.; DE VISSCHER, A.; PIEPERS, S.; BLAGITZ, M.G.; HEINEMANN, M.B.. **Inhibition of the growth of major mastitis-causing pathogens by non-aureus Staphylococcus isolates using the cross-streaking method**. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.7, p.1745-1749, 2019.
- FREITAS, C. H.; MENDES J. F.; VILLARREAL P. V.; SANTOS P. R.; GONÇALVES C. L.; GONZALES H. L. & NASCENTE P. S.. **Identification and antimicrobial suceptibility profile of bacteria causing bovine mastitis from dairy farms in**

Pelotas, Rio Grande do Sul. Braz. J. Biol., São Carlos , v. 78, n. 4, p. 661-666, Nov. 2018 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-69842018000400661&lng=en&nrm=iso>. access on 25 Mar. 2021. Epub Jan 08, 2018. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.170727>.

GONÇALVES, J. L.; ROGER I, C. U. E.; LIMA NETTO, E. P.; GAMEIRO A. H.; Dos Santos, M. V.. **Herd-level associations between somatic cell counts and economic performance indicators in Brazilian dairy herds.** Journal of Dairy Science, v.104, n.2, p.1855-1863, 2021.

KEEFE G.. **Update on control of Staphylococcus aureus and Streptococcus agalactiae for management of mastitis.** Vet Clin North Am Food Anim Pract. 2012 Jul;28(2):203-16. doi: 10.1016/j.cvfa.2012.03.010. Epub 2012 Apr 17. PMID: 22664203.

LAVOR, U. L.; GUIMARÃES F. F.; SALINA A.; MIONI M. S. R. & LANGONI H.. **Bacterial identification, somatic cell count, antimicrobial profile and toxigenic Staphylococcus strains search from mastitic cow milk samples on small farms properties.** Pesq. Vet. Bras., Rio de Janeiro , v. 39, n. 9, p. 715-722, Sept. 2019 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2019000900715&lng=en&nrm=iso>. access on 25 Mar. 2021. Epub Nov 04, 2019. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-5523>.

LOPES, M. A.; DEMEU, F. A.; COSTA, G. M.; ROCHA, C. M. B. M.; ABREU, L. R.; SANTOS, G.; FRANCO NETO, A.. **Influência da contagem de células somáticas sobre o impacto econômico da mastite em rebanhos bovinos leiteiros.** Arquivos do Instituto Biológico, 78(4), 493499, 2011.

PEREZ, L. R. R.; D'AZEVEDO, P. A.. **Evaluation of the accuracy of various phenotypic tests to detect oxacillin resistance in coagulase-negative staphylococci.** Braz J Infect Dis, Salvador , v. 12, n. 3, p. 210-212, June 2008 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-86702008000300009&lng=en&nrm=iso>. access on 01 May 2021. <https://doi.org/10.1590/S1413-86702008000300009>.

PEXARA (A. ΠΕΞΑΡΑ), A.; SOLOMAKOS (N. ΣΟΛΩΜΑΚΟΣ), N.; GOVARIS (A. ΓΚΟΒΑΡΗΣ), A.. **Prevalence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in milk and dairy products.** Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society, [S.l.], v. 64, n. 1, p. 17-34, dec. 2017. ISSN 2585-3724. Date accessed: 05 july 2020. doi:<https://doi.org/10.12681/jhvms.15449>.

PIEPERS, S.; De MEULEMEESTER, L.; De KRUIF, A.; OPSOMER, G.; BARKEMA, H., & De VLIEGHER, S. (2007). **Prevalence and distribution of mastitis pathogens in subclinically infected dairy cows in Flanders, Belgium.** Journal of Dairy Research, 74 (4), 478-483. doi: 10.1017 / S0022029907002841

PIESSENS, V.; VAN COILLIE, E.; VERBIST, B.; SUPRÉ, K.; BRAEM, G.; VAN NUFFEL, A.; DE VUYST, L.; HEYNDRIX, M.; DE VLIEGHER, S. (2011). **Distribution of coagulase-negative Staphylococcus species from milk and environment of dairy cows differs between herds.** Journal of Dairy Science, 94 (6), 2933-2944, doi: 10.3168/jds.2010-3956

RASPANTI C. G.; BONETTO C. C.; VISSIO C.; PELLEGRINO M. S.; REINOSO E. B.; DIESER S. A.; BOGNI C. I.; LARRIESTRA A. J.; ODIERNO L. M.. **Prevalence and antibiotic susceptibility of coagulase-negative Staphylococcus species from bovine subclinical mastitis in dairy herds in the central region of Argentina.** Rev Argent Microbiol. 2016 Jan-Mar;48(1):50-6. doi: 10.1016/j.ram.2015.12.001. Epub 2016 Feb 28. PMID: 26935912.

RIBEIRO, M. G.; LANGONI H.; DOMINGUES P. F.; PANTOJA J. C. F.. Mastite em Animais Domésticos. In: MEGID. Doenças infecciosas em animais de produção e companhia 1 ed. Rio de Janeiro: Roca, 2016. p 1154-1205.

RIGATTI, F.; TIZOTTI, M. K.; HÖRNER, R.; DOMINGUES, V. O.; MARTINI, R.; MAYER, L. E.; KHUN, F. T.; FRANÇA, C. A.; COSTA, M. M.. **Bacteremias por Staphylococcus coagulase negativos oxacilina resistentes em um hospital escola na cidade de Santa Maria, Estado do Rio Grande do Sul.** Rev. Soc. Bras. Med. Trop., Uberaba , v. 43, n. 6, p. 686-690, Dec. 2010 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822010000600017&lng=en&nrm=iso>. access on 01 May 2021. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822010000600017>.

Dos SANTOS, M. V. & da FONSECA, L. F. L.. Controle da mastite e qualidade do leite: desafios e soluções. [S.l: s.n.], 2019.

SKOV, R.; LARSEN, A. R.; KEARNS. A.; HOLMES M.; TEALE C.; EDWARDS, G.; HILL, R. **Phenotypic detection of mecC-MRSA: cefoxitin is more reliable than oxacillin.** J Antimicrob Chemother. 2014 Jan;69(1):133-5. doi: 10.1093/jac/dkt341. Epub 2013 Sep 12. PMID: 24038776.

SUPRÉ K.; HAESBROUCK F.; ZADOKS R.N.; VANECHOUTTE M.; PIEPERS S., De Vlieghe S.. **Some coagulase-negative Staphylococcus species affect udder health more than others.** J Dairy Sci. 2011 May;94(5):2329-40. doi: 10.3168/jds.2010-3741. PMID: 21524522.

TOMAZI T.; GONÇALVES J. L.; BARREIRO J. R.; CAMPOS BRAGA P. A.; PRADA e SILVA L. F.; EBERLIN M. N.; Dos SANTOS M. V.. **Identification of coagulase-negative staphylococci from bovine intramammary infection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry.** J Clin Microbiol. 2014 May;52(5):1658-63. doi: 10.1128/JCM.03032-13. Epub 2014 Mar 12. PMID: 24622096; PMCID: PMC3993701.

TOMAZI T.; GONÇALVES J. L.; BARREIRO J. R.; ARCARI M. A.; Dos SANTOS M. V.. **Bovine subclinical intramammary infection caused by coagulase-negative staphylococci increases somatic cell count but has no effect on milk yield or composition.** J Dairy Sci. 2015 May;98(5):3071-8. doi: 10.3168/jds.2014-8466. Epub 2015 Feb 26. PMID: 25726098.

THORBEG B. M.; DANIELSSON-THAM M. L.; EMANUELSON U.; PERSSON WALLER K.. **Bovine subclinical mastitis caused by different types of coagulase-negative staphylococci.** Journal of Dairy Science, Volume 92, Issue 10, 2009, Pages 4962-4970, ISSN 0022-0302, <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2184>.

UDDIN, M. J. and AHN, J. **Associations between resistance phenotype and gene expression in response to serial exposure to oxacillin and ciprofloxacin in *Staphylococcus aureus***. Lett Appl Microbiol. 2017 Dec;65(6):462-468. doi: 10.1111/lam.12808. Epub 2017 Oct 29. PMID: 28977678.

VESTERGAARD, M.; FREES, D.; INGMER, H. **Antibiotic Resistance and the MRSA Problem**. Microbiology Spectrum, v. 7, n. 2, 2019.