

**Lívia Lima dos Santos**

***Staphylococcus* COAGULASE NEGATIVO COMO AGENTE DE  
MAMITE EM REBANHOS BOVINOS LEITEIROS DA REGIÃO SUL DO  
ESTADO DE MINAS GERAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária.

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva.

Orientador: Nivaldo da Silva.

Belo Horizonte  
Escola de Veterinária da UFMG  
2008

S237s Santos, Livia Lima dos, 1980-

*Staphylococcus* coagulase negativo como agente de mamite em rebanhos bovinos leiteiros da região sul do Estado de Minas Gerais / Livia Lima dos Santos. – 2008.

40 p. : il.

Orientador: Nivaldo da Silva

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.

Inclui bibliografia

1. Bovino de leite – Doenças – Teses. 2. Mastite – Diagnóstico - Teses. 3. Leite – Análise – Teses. I. Silva, Nivaldo da . II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.214 089 69





## DEDICATÓRIA

A Deus pelo dom da vida.

Aos meus pais, fonte de alegria, que não mediram esforços para que eu chegasse até aqui, pelo apoio e incentivo para continuar a caminhar e crescer sempre.

---

---

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Nivaldo da Silva pela orientação, paciência e ensinamentos sempre presentes, sem os quais esse trabalho não poderia ser concluído.

Ao Professor Geraldo Márcio da Costa da Universidade Federal de Lavras pela grandiosa ajuda e presteza neste trabalho.

Às amigas de mestrado Marisa, Melissa e Elaine pela amizade, contribuição e pelos bons momentos que convivemos juntas.

Ulisses de Pádua Pereira pela colaboração e amizade.

Nelson Eder Martins pela disposição em ajudar.

À técnica de laboratório de Aqüicultura da Universidade Federal de Lavras, Dircéia Aparecida da Costa Custódio, pela ajuda.

À Universidade Federal de Minas Gerais pelo incentivo às pesquisas voltadas para a pecuária brasileira, por acolher e formar mais um de seus alunos.

À Universidade Federal de Lavras.

Ao CAPES, pela bolsa de mestrado.

Enfim, a todos e a tudo, que de alguma forma colaboraram com este trabalho, o meu muito obrigado.

---

---

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

Santo Agostinho  
Pensador cristão  
(354-430)

---

## SUMÁRIO

---

	Pág.
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	7
<b>RESUMO</b> .....	9
<b>ABSTRACT</b> .....	9
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	10
2.1 Importância das mamites bovinas .....	10
2.2 Etiologia da Mamite.....	12
2.3 Mamite por <i>Staphylococcus</i> coagulase negativo (SCN).....	14
2.4 Identificação dos SCN.....	16
2.5 Contagem de Células Somáticas (CCS).....	18
2.6 Tratamento x Resistência a Antimicrobianos.....	19
2.7 Instrução Normativa 51 (IN51) .....	20
2.8 Programa de Qualidade do Leite no Brasil (PNQL) .....	21
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	21
3.1 Local de realização do experimento .....	21
3.2 Rebanhos.....	21
3.3 Amostras de leite destinadas à bacteriologia .....	21
3.4 Determinação dos índices de mamite.....	22
3.5 Coleta e análise de amostras de leite.....	22
3.6 Isolamento e Identificação de Microrganismos.....	22
3.7 Determinação do perfil de resistência a antimicrobianos .....	23
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	23
4.1 Índices de mamite nos rebanhos trabalhados.....	23
4.2 Distribuição dos microrganismos isolados em casos de mamite subclínica e clínica entre os rebanhos .....	25
4.3. Teste de susceptibilidade a antimicrobianos .....	29
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	31
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	31

---

### LISTA DE TABELAS

---

Tabela 1 - Índices de mamite subclínica e clínica e contagens de células somáticas no leite de tanque de 35 rebanhos leiteiros da região sul do Estado de Minas Gerais, 2004-2006 .....	24
Tabela 2 - Tabela 2: Distribuição de microrganismos isolados em casos de mamite subclínica e clínica em 35 rebanhos bovinos leiteiros da região sul de Minas Gerais, 2004-2006 .....	26
Tabela 3 - Distribuição dos <i>Staphylococcus</i> coagulase negativo isolados em casos de mamite subclínica e clínica nos rebanhos bovinos da região da bacia leiteira do sul de MG, 2006.....	27
Tabela 4 - Avaliação da resistência de 120 amostras de <i>Staphylococcus</i> coagulase negativa isoladas de casos subclínicos e clínicos de mamite em 30 rebanhos bovinos da região sul de Minas Gerais, 2004-2006 .....	30

---

### LISTA DE FIGURA

---

Figura 1 - Isolados de <i>Staphylococcus</i> coagulase negativo entre casos subclínicos e clínicos de mamite em 30 rebanhos bovinos leiteiros da região sul de MG, 2004-2006 .....	27
--	----

---

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- BHI: Infuso de cérebro e coração
- CBT: Contagem bacteriana total
- CCS: Contagem de células somáticas
- CCST: Contagem de células somáticas em tanques
- CMT: California Mastitis Test
- DNA: Ácido desoxirribonucléico
- IDF: Federação Internacional de Gado de Leite
- IIM: Infecções intramamárias
- IMC: Índice de mamite clínica
- IMSC: Índice de mamite subclínica
- IN51: Instrução Normativa número 51
- KOH: Hidróxido de potássio
- MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
- NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Performance Standards
- PNQL: Programa de Qualidade do Leite no Brasil
- RBQL: Rede Brasileira de Laboratórios de Análise da Qualidade do Leite
- SCN: *Staphylococcus* coagulase negativo
- SCP: *Staphylococcus* coagulase positivo
- SE: Enterotoxina estafilocócica
- UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais
- UFLA: Universidade Federal de Lavras
- WMT: Wisconsin Mastitis Test





## RESUMO

Com o objetivo de identificar a diversidade de *Staphylococcus* coagulase negativo (SCN) envolvidos nos processos inflamatórios clínicos e subclínicos da glândula mamária bovina e traçar o perfil de susceptibilidade dos agentes isolados, foram avaliadas 120 amostras bacterianas isoladas de 35 rebanhos bovinos leiteiros pertencentes à região sul de Minas Gerais. Foi realizado o diagnóstico de mamite clínica e subclínica a campo pelo teste da caneca de fundo escuro e pelo California Mastitis Test. Amostras de leite foram coletadas assepticamente para análises bacteriológicas e contagem de células somáticas em tanque por meio da citometria de fluxo. Verificaram-se baixos índices de mamite clínica (3,3%) causadas por SCN. Realizaram-se diversas provas bioquímicas para identificar as espécies de SCN, além dos testes de sensibilidade a diferentes antimicrobianos de uso em medicina veterinária. Observou-se uma diversidade de espécies isoladas, destacando-se o *Staphylococcus hyicus* como o mais freqüente (15%). Os testes de susceptibilidade aos antimicrobianos pela técnica de difusão com discos para 19 antibióticos revelaram 100% de sensibilidade à danofloxacina, enrofloxacina e florfenicol. Das amostras avaliadas, 33 delas (27,5%) foram resistentes à penicilina, 25 (20,8%) à estreptomicina, 22 (18,3%) à ampicilina e 17 (14,2%) à tetraciclina. O percentual de multiresistência revelado pelos isolados de SCN nas amostras estudadas não é preocupante, posto que a maioria foi sensível aos antibióticos disponíveis no mercado.

Palavras chave: mamite, *Staphylococcus* coagulase negativo, bovinos leiteiros

## ABSTRACT

This research was aimed to identifying the coagulase negative *Staphylococcus* (SCN) diversity involved in the clinical and subclinical inflammatory processes of the bovine mammary gland and to draw the profile of the isolated agent susceptibility. 120 SCN were isolated from 35 dairy flocks belonging to the south area of Minas Gerais State - Brazil. The clinical and subclinical mastitis diagnosis were available by strip cup and California Mastitis Test. Milk samples were collected aseptically for bacteriological analyses and somatic cells counting in tank through flow cytometric. Index bass of clinical mastitis were verified in the flocks (3,3%) caused by SCN. The species of SCN were identified by biochemistries methods and the susceptibility tests by diffusion disks with 19 antibiotics. *Staphylococcus hyicus* was the most frequent (15%). The susceptibility tests revealed 100% of sensibility to the danofloxacin, enrofloxacin and florfenicol. Of the appraised samples, 33 of them (27,5%) were resistant to the penicillin, 25 (20,8%) to the streptomycin, 22 (18,3%) to the ampicilin and 17 (14,2%) to the tetraciclín. The percentile of multiresistent revealed by the isolated of SCN in the studied samples is not preoccupying, position that most of the samples is sensitive to the available antibiotics in the market.

Key-words: mastitis, *Staphylococcus* coagulase negative, dairy herds

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o sexto maior produtor mundial de leite, com mais de 25 bilhões de litros de leite por ano, com produtividade média de 1.181 litros/vaca/ano, atendendo a um consumo *per capita* médio de 137 litros/habitante/ano. A produção de leite no Brasil constitui uma das principais atividades agropecuárias em função de sua importância social e econômica, sendo um dos maiores setores de geração de renda nacional e arrecadação tributária. O estado de Minas Gerais se destaca como o maior produtor nacional, respondendo por 28,1% do total do leite produzido, destacando-se a região sul como uma das mais importantes bacias leiteiras do estado. Apesar do volume de leite produzido, a qualidade da matéria-prima é um dos maiores entraves ao desenvolvimento tecnológico e à consolidação da indústria de laticínios no Brasil; a mamite aparece como um dos problemas mais sérios da pecuária leiteira.

A mamite ou mastite é uma enfermidade da glândula mamária que se caracteriza por processo inflamatório, quase sempre decorrente da presença de microorganismos infecciosos, interferindo diretamente na função do órgão, uma vez que uma vaca com mamite tem a sua produtividade de leite diminuída, com perdas estimadas entre 10 e 26% da produção láctea normal, de acordo com o grau de intensidade do processo inflamatório e do estágio de lactação em que ocorre a infecção.

As mamites também interferem na qualidade do leite, observando-se teores menores de açúcares, proteínas e minerais, como a lactose, caseína, gordura, cálcio, fósforo e um aumento significativo de imunoglobulinas, cloretos e lipases, ficando o leite impossibilitado de ser consumido e utilizado para fabricação de seus derivados, sem considerar os prejuízos causados pela condenação do leite na plataforma da usina. Os prejuízos econômicos causados pela mamite, aliados às questões de saúde pública, tornam a doença uma das maiores preocupações da Medicina Veterinária por

várias razões: epidemiologia abrangente, ser de causa pluri-etiológica e apresentar controle complexo na dependência dos agentes envolvidos e do meio ambiente no qual são criados os animais.

Os *Staphylococcus* coagulase negativos (SCN) nem sempre foram reconhecidos como importantes agentes causadores de mamite por estarem relacionados às baixas contagens de células somáticas em rebanhos onde estavam presentes. No entanto, este grupo tem crescido de importância entre os agentes causadores de infecções intramamárias (IIM) em rebanhos leiteiros, especialmente em novilhas, em todo o mundo e por sua capacidade de produzir enterotoxinas. Considerando-se a importância dos SCN, objetivou-se com o presente trabalho caracterizar as espécies causadoras de mamite em vacas leiteiras, determinar a severidade das infecções, bem como avaliar a susceptibilidade antimicrobiana *in vitro* dessas amostras, a fim de contribuir com os estudos de tratamento e controle da doença em diferentes rebanhos da bacia leiteira da região sul do Estado de Minas Gerais.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Importância das mamites bovinas

De acordo com a Federação Internacional de Gado de Leite (IDF), a mamite é a denominação do processo inflamatório da glândula mamária que provoca mudanças físico-químicas e microbiológicas no leite, aumento do número de células somáticas, além de mudanças no tecido mamário. Uma vez instalado na glândula mamária, o microorganismo se nutre dos componentes do leite e se multiplica, atingindo números muito elevados. Neste processo, são produzidas toxinas ou outras substâncias (fatores de virulência do agente) que causam danos ao tecido mamário. Estas substâncias estimulam o sistema imune do animal, atraindo leucócitos (células somáticas) do sangue para o leite, a fim de destruir os microrganismos invasores. Como resultado da inflamação, as paredes dos

vasos sanguíneos da glândula mamária afetada se tornam dilatadas e permeáveis a íons de cloro e sódio - que deixam o leite com sabor salgado - e a enzimas, que causam alterações na proteína e na gordura do leite. Devido às lesões, as células secretoras passam a apresentar uma capacidade reduzida de produção e secreção de leite, ocorrendo também morte das células e liberação de enzimas no interior da glândula, agravando o processo inflamatório (Brito et al., 2008).

A mamite bovina apresenta duas formas de manifestação: clínica e subclínica. Estas variações se devem a diferenças na intensidade do processo inflamatório. A mamite clínica é de fácil diagnóstico por apresentar alterações visíveis na glândula mamária, como edema e vermelhidão. Há dor local e o leite fica ralo ou apresenta grumos, pus e sangue. Na forma subclínica, as alterações não são visíveis, sendo diagnosticadas somente por métodos que permitam a detecção de alterações na composição do leite, tornando-se um sério problema para a criação e produção leiteira (IDF, 1987). No Brasil, a maioria dos casos de mamite que afetam quartos mamários dos bovinos leiteiros é da forma subclínica. Nas regiões de São Paulo e Minas Gerais, Costa et al. (1995) detectaram a ocorrência de mamite clínica e subclínica de 17,5% e 72%, respectivamente, dos animais estudados. As altas frequências de mamites indicam a ocorrência de falhas na execução de medidas de controle da enfermidade (Bueno et al., 2002).

Vários são os fatores que podem predispor um animal à mamite e, dentre os principais, pode-se citar causas traumáticas externas, tais como cortes, ferimentos, camas duras e ordenha manual ou mecânica, bem como a presença de leite residual, que ocorre em ordenhas mal realizadas ou vagarosas, propiciando a entrada de bactérias através do esfíncter do úbere. Fatores anatômicos, como o tamanho e o diâmetro do canal do teto, a conformação do úbere, fatores estes determinados por herança genética também podem colaborar para o aparecimento da mamite. Adicionalmente, a idade do animal, visto que os animais mais idosos têm maior

predisposição a desenvolver mamite e outras doenças infecciosas, tais como varíola bovina, febre aftosa, brucelose, tuberculose, leucose linfóide bovina, dentre outras, provocando queda na resistência orgânica dos animais e, por conseguinte, favorecendo o aparecimento das mamites (Schalm et al., 1971).

Dessa forma, é a doença mais importante dos rebanhos leiteiros em todo o mundo, responsável por grande perda na produção de leite, acarretando prejuízos sócio-econômicos que afetam diretamente a atividade leiteira. As perdas econômicas são provocadas tanto em nível de fazenda, pela diminuição da produção de leite, custos com mão-de-obra, honorários profissionais, atendimento laboratorial, medicamentos, descarte precoce ou morte de animais, como em laticínios, pela queda da qualidade do produto final e diminuição no rendimento industrial para a fabricação dos seus derivados e pelas alterações na composição do leite mamítico, responsáveis pela depreciação da sua qualidade nutritiva (Dobbins, 1977; Langoni, 1999; Ribeiro et al., 1999; Fonseca e Santos, 2000; Cunha et al., 2006).

As perdas econômicas repercutem negativamente na pecuária e os prejuízos em propriedades brasileiras decorrentes desta afecção foram de aproximadamente US\$332 dólares/vaca/ano (Costa, 1998). A mamite é encontrada em todos os continentes, atingindo, inclusive, os países desenvolvidos. Nos Estados Unidos, o prejuízo econômico estimado por ocasião da doença é de cerca de US\$ 2 bilhões de dólares/ano (Costa et al., 1986) ou 200 dólares/vaca/ano (Costa, 1998). Os reflexos dos prejuízos que a mamite causada por *Staphylococcus aureus* e espécies coagulases negativas acarretam para a indústria, quando comparados com quartos sadios, foram relatados por Nicolau et al. (1996), sendo causados pelo aumento dos valores médios de pH, do teor de cloretos e da contagem de células somática (CCS), principalmente do número de leucócitos polimorfonucleares, e a diminuição nos valores médios de acidez, densidade, teor

de gordura, extrato seco total e desengordurado, crioscopia e caseína.

O controle dessa doença se faz prioritário devido aos novos parâmetros de qualidade para a produção de leite, estabelecidas pela Instrução Normativa 51 (IN 51) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) cujo objetivo é padronizar a produção leiteira brasileira, estabelecendo um padrão de excelência e baixos níveis de contaminação (Brasil, 2002).

## 2.2. Etiologia da Mamite

Diversos microrganismos podem ser considerados agentes etiológicos de mamite, tais como as bactérias, os protozoários, os vírus e os fungos filamentosos, as leveduras e as algas. Causas de origem não infecciosa também podem estar relacionadas à etiopatogenia da doença. Em medicina veterinária, os microrganismos do gênero *Staphylococcus* são os principais agentes responsáveis pela mamite no gado leiteiro (Honkanen-Buzalski et al., 1994; Lopes et al., 1999; Bergonier et al., 2003). Essas bactérias são importantes devido à sua elevada prevalência e por apresentarem, comumente, resistência aos antibióticos utilizados no tratamento da mamite, elevando os custos com a criação (Amaral et al., 2003) e pela capacidade de produção de enterotoxinas (Brabes et al., 1999). Nos últimos anos, a prevalência de SCN em amostras de leite de rebanhos bovino leiteiros na Holanda aumentou em 26% (Sampimon et al., 2007).

Devido à disseminação de *Staphylococcus* em diferentes nichos, tem aumentado a importância de identificar com acurácia as diferentes espécies. A especificação também é crucial em medicina humana e veterinária para a determinação das fontes de infecção, caracterização da patologia e para a condução dos estudos epidemiológicos. A evolução da doença e suas conseqüências para a produção ou para o animal dependem exclusivamente do agente infeccioso envolvido no processo. Inúmeros são os agentes causadores do processo infeccioso, já tendo sido descritos 137 espécies de microrganismos

responsáveis por processos de mamite (Watts, 1988), entretanto, investigações sobre a sua etiologia demonstraram que 90% ou mais dos casos tem como agentes etiológicos os estafilococos e os estreptococos (Fernandes et al., 1973; Ferreiro, 1980 e 1984; Ferreiro et al., 1981).

Dentre os agentes etiológicos, as bactérias têm maior incidência, constituindo cerca de 80 a 90% dos casos. São observados com maior freqüência os *S. aureus*, *Staphylococcus* coagulase negativo, *Streptococcus agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. uberis*, *Corynebacterium spp.*, *Escherichia coli*, *Nocardia ssp*, *Prototheca zopfi* (Brabes et al., 1999; Costa, 1999).

Entre os estafilococos, *S. aureus* é provavelmente o agente etiológico mais freqüentemente isolado das mamites bovinas (Devriese, 1979; Watts, 1988; Tuteja et al., 1993), e esta predominância ocorreu após o advento dos antibióticos e seu uso indiscriminado, favorecendo ao aparecimento de microrganismos resistentes (Ferreiro, 1980; Blood e Radostits, 1991). Atualmente, 40 espécies são descritas dentro do gênero *Staphylococcus*, a maioria coagulase-negativo, porém essa classificação ainda está em desenvolvimento (Euzéby, 2008).

Esse complexo de caráter multifatorial e etiológico dificulta o controle da doença, principalmente quando se leva em consideração a patogenia das IIM e a resistência desenvolvida pelos microrganismos aos antimicrobianos. O uso indiscriminado de antibióticos com dosagens inadequadas, principalmente em casos de mamite, favoreceu o desenvolvimento de cepas patogênicas multiresistentes, cuja ocorrência na glândula mamária é observada freqüentemente (Jhala, 1976; Rahman e Baxi, 1983). Entretanto, rebanhos submetidos a poucas intervenções terapêuticas com antimicrobianos, apresentam grande sensibilidade, tanto assim que o teste de sensibilidade ao cloranfenicol pelo método da difusão em discos, em 217 amostras de *Staphylococcus aureus* isolados de casos de mamite subclínica em rebanhos bovinos

praticamente isentos de tratamento terapêutico, mostrou resistência somente em 5,07% das amostras (Cardoso e Schwarz, 1992).

Os patógenos causadores de mamite são classificados em dois grupos diferentes: contagiosos e ambientais. Os chamados contagiosos necessitam do animal para a sobrevivência, se multiplicam na glândula mamária, canal do teto ou sobre a pele, sendo transmitidos de uma vaca infectada ou quarto mamário infectado para uma vaca sadia ou quarto sadio, principalmente durante a ordenha. Os patógenos ambientais são oportunistas, estando presentes no ambiente em que o animal vive, dessa forma, a infecção pode ocorrer no período entre ou durante a ordenha (Costa, 1998; Mendonça et al., 1999).

Os *Staphylococcus spp.* são microrganismos contagiosos distribuídos na natureza de forma ubiqüitária, com algumas espécies habitando nichos ecológicos específicos. São encontrados naturalmente na pele e nas membranas mucosas de animais de sangue quente e em humanos, bem como em uma ampla variedade de alimentos, tais como carnes, leite, queijos. Também podem estar presentes no solo, areia e água (Kloos e Schleifer, 1986). Os SCN de origem humana podem apresentar distintas características epidemiológicas de acordo com a sua espécie (Mota et al., 2004). Estes microrganismos podem sobreviver por meses em amostras clínicas secas, sendo resistentes ao calor e tolerando uma concentração aumentada de sal. Contudo, ao contrário destes, são as bactérias esporuladas as que mais resistem no meio ambiente (Anvisa, 2004).

As espécies de *Staphylococcus* podem ser identificadas com base na morfologia da colônia, produção de coagulase, utilização de oxigênio, hemolisinas, resistência a certos antibióticos, atividade de várias enzimas e produção ácida aeróbica de certos carboidratos. Dentre os SCN, *S. epidermidis* e *S. saprophyticus* são os patógenos oportunistas mais relatados (Balows et al., 1991).

Os *Staphylococcus* têm a capacidade de penetrar e se instalar profundamente nos tecidos da glândula mamária, formar microabscessos, resistir à fagocitose e sobreviver no interior dos fagócitos, dificultando a ação dos antibióticos utilizados no tratamento da mamite (Cruz et al., 1997).

O termo *Staphylococcus* coagulase negativo se aplica às bactérias estafilocócicas que se diferenciam dos *S. aureus*. O nome “coagulase negativo” se refere à incapacidade destas bactérias em coagular o plasma sanguíneo em teste laboratorial. Isto diferencia estas espécies dos estafilococos coagulase positivos de acordo com a resposta ao teste de produção de coagulase livre. Existem 31 espécies de SCN conhecidas, das quais os mais freqüentes são: *Staphylococcus epidermidis*, *S. saprophyticus* e *S. haemolyticus*, este último de importância devido à resistência aumentada aos antimicrobianos e por ser comumente confundido com o *S. aureus*, pois apresenta o grau de hemólise nas placas de ágar sangue de carneiro (Balows et al., 1991; Anvisa, 2004).

A maioria das espécies de estafilococos são coagulase negativas. As exceções são: *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. delphini*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, *S. lutrae* e algumas cepas de *S. hyicus* (Kloos e Bannerman, 1999). Algumas espécies de SCN são reconhecidas pelo seu valor tecnológico e por estarem envolvidas em reações desejáveis durante o processo de fermentação dos alimentos, tais como a formação de sabor e de aroma, especialmente queijos e salsichas. Nesta função se destacam particularmente o *S. xylosum*, *S. carnosus* e *S. equorum* (Irlinger et al., 1997; Blaiotta et al., 2004). Em outras circunstâncias, SCN podem apresentar risco à saúde das pessoas. Neste aspecto, destaca-se o *S. saprophyticus*, responsável por infecções do trato urinário em jovens e adultos (Martineau et al., 2000).

### 2.3. Mamite por *Staphylococcus* coagulase negativo (SCN)

SCN são patógenos comuns em rebanhos leiteiros e estão principalmente associados aos casos subclínicos de mamite e à presença de células somáticas no leite, com CCS próximas a 1.000.000 cels/mL de leite. A presença desses microrganismos é maior em propriedades que reduziram o número de infecções causadas por outros patógenos, sendo mais frequentes em animais de primeira lactação (Silva, 1999; Laffranchi et al., 2001). A terapia de animais em período seco, ao final da primeira lactação, diminui o número de casos nas lactações seguintes. Apesar de serem considerados menos patogênicos que os *S. aureus*, as infecções causadas por SCN têm sido associadas com perdas consideráveis de leite por lactação e tendem a persistir durante todo o período da produção. Apesar de sensível aos tratamentos com uma variedade de antibióticos, os índices de curas espontâneas das infecções causadas são considerados baixos. Como resultado das mamicas causadas por esse microrganismo, ocorre a fibrose interalveolar do tecido mamário, perda da função secretória e alteração da quantidade e qualidade do leite produzido pelo animal (Silva, 2003).

Historicamente, enquanto as espécies de estafilococos coagulase positivas eram consideradas patógenos oportunistas, as espécies coagulase negativas eram geralmente consideradas não patogênicas. Entretanto, essa visão está mudando, particularmente devido às evidências que algumas espécies de SCN podem ser potencialmente patogênicas para os homens e animais (Balaban e Rasooly, 2001). A partir do momento que se buscou diminuir o número de células presentes no leite, verificou-se quão importantes eram as infecções intramamárias causadas pelos SCN. Além disso, os SCN contribuem muito para os fenômenos de resistência aos antimicrobianos (Silva, 1999).

Segundo Kloos e Bannerman (1999), cerca de metade das espécies de SCN coloniza naturalmente o homem e animais, incluindo-

se dentre eles o *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. cohnii*, *S. xylosus*, *S. capitis*, *S. warneri*, *S. hominis*, *S. simulans*, *S. caprae*, *S. lugdunensis*, *S. schleiferi* e o *S. gallinarum*. No entanto, as espécies isoladas com maior frequência são: *S. chromogenes*, *S. simulans*, *S. epidermidis*, *S. xylosus*, *S. sciuri* e *S. hyicus* (Müller, 1999). A infecção da glândula mamária por essas bactérias é de alta incidência e longa duração, podendo afetar a composição e a produção do leite. Estes fatores justificam a atenção dada aos SCN como agentes etiológicos da mamite bovina (Timmis e Schultz, 1987). Apesar da sua importância como patógenos da mamite, existem poucos relatos descrevendo o potencial desses microrganismos em relação aos fatores de virulência e aos mecanismos de infecção. As enterotoxinas estafilocócicas (SE) são os principais agentes de intoxicação de origem bacteriana no homem e têm sido relatadas em vários surtos de doenças transmissíveis por alimentos (Lamaita et al., 2005). Estas toxinas são resistentes à hidrólise pelas enzimas gástricas e jejunais (Freitas et al., 2004). Pesquisas conduzidas a partir de leite e sítios anatômicos de animais demonstraram haver espécies coagulase negativas, como *S. xylosus*, *S. haemolyticus*, *S. epidermidis*, *S. cohnii*, *S. chromogenes*, *S. warneri*, *S. sciuri* e *S. lentus*, que produzem enterotoxinas em meios de cultivo laboratorial (Valle et al., 1990). Desta maneira, a primazia da capacidade enterotoxigênica que pertencia quase com exclusividade ao *S. aureus* foi estendida, embora este fato já houvesse sido relatado, também, para outras espécies coagulase positivas como *S. hyicus* e *S. intermedius* (Devriese, 1977; Hirooka et al., 1988).

Apesar da crença de que, usualmente, espécies coagulase negativas não constituíssem objeto de importância na epidemiologia das intoxicações estafilocócicas, as pesquisas ora referidas conclamam a exploração no sentido da averiguação de espécies outras que as produtoras de coagulase. A produção de enterotoxinas estafilocócicas por espécies não produtoras de coagulase foi relatada

por Oliveira (1999), onde as estirpes de origem bovina, *S. warneri* e *S. chromogenes*, experimentalmente inoculadas em presunto cozido e creme de confeitaria, produziram enterotoxina estafilocócica tipo C e D (SEC e SED).

Para Brabes et al. (1999), *S. intermedium*, *S. hyicus* e *S. sciuri* são capazes de produzir enterotoxinas, sendo que as enterotoxinas A e D são as que mais aparecem envolvidas em surtos de toxinfecção, podendo estar isoladas ou em combinação. Li e Cheng (1997) já haviam descrito a produção das enterotoxinas anteriormente descritas para *S. warneri* CCRC 12929 e *S. haemolyticus* CCRC 12923. Todavia, os dados relatados nessas duas pesquisas não informam se as quantidades de enterotoxinas produzidas identificavam linhagens de baixa produção, o que, contrariamente, se assegurou no experimento ora realizado, onde todas as 14 linhagens teste se responsabilizavam por ínfima produção, situada entre 1,4 a 16,8 ng/mL de fluido sobrenadante de cultura.

Rapini et al. (2005) constataram que amostras de *Staphylococcus spp.* isoladas de manipuladores de queijo de cabra foram capazes de produzir enterotoxinas e a toxina da síndrome do choque tóxico, enfatizando a importância desse grupo bacteriano na intoxicação de origem alimentar e a necessidade da adoção de condutas higiênicas e sanitárias durante a manipulação do alimento.

Atualmente, os SCN se tornaram os patógenos causadores de mamite predominante em vários países (Waage et al., 1999; Pitkälä et al., 2004; Rajala-Schulz et al., 2004). Os SCN podem causar tanto a mamite subclínica quanto a mamite clínica, com severos sinais clínicos nos quartos afetados, assim como vários efeitos sistêmicos. Estudos realizados por Murdough et al. (1996) sobre a prevalência de patógenos em leites provenientes de bovinos com mamite subclínica detectaram as espécies *S. aureus*, *S. chromogenes* e *S. xylosus*. Segundo Sargeant et al. (1998) e Brabes et al. (1999), a maior ocorrência de coagulase negativos no leite demonstra que

estas espécies vêm crescendo como importantes agentes etiológicos da mamite.

Em estudo histopatológico e microbiológico de processos inflamatórios de glândulas mamárias de animais enviados ao abate, Benites et al. (2000) encontraram predominância de SCN, sendo que estas bactérias foram isoladas principalmente no parênquima glandular e, em menor frequência, na cisterna do teto e na cisterna da glândula, o que confirma a importância que esses microrganismos vêm assumindo na etiologia da mamite bovina. Embora os SCN normalmente causem somente mamite subclínica e moderada mamite clínica (Honkanen-Buzalski et al., 1994), eles são prejudiciais, pois aumentam a CCS no leite (Laevens et al., 1997; Chaffer et al., 1999) e podem diminuir ligeiramente a sua produção (Timms e Schultz, 1987). De acordo com Zhang e Maddox (2000), *S. chromogenes* podem causar infecções mais severas que a média causada pelas outras espécies de SCN na glândula mamária bovina. No estudo de Myllys et al. (1994) não houve diferença significativa nos parâmetros de inflamação entre as infecções causadas por *S. aureus* e *S. chromogenes*.

As espécies de SCN são isoladas frequentemente de novilhas e de vacas lactantes e não-lactantes (Oliver et al., 1997; Laffranchi et al., 2001). Edward et al. (1966) sugerem que as infecções intramamárias no gado leiteiro causadas por SCN previnem IIM subseqüentes por outros patógenos da glândula mamária. O domínio das IIM de SCN em novilhas foi observado por Nickerson et al. (2000). A mamite causada por SCN parece ser doença de vacas novas, visto que a prevalência de SCN é maior em vacas primíparas quando comparadas com vacas múltiparas (Laffranchi et al., 2001; Tenhagen et al., 2006). Geralmente, isso é atribuído à eficiência da terapia da vaca seca no controle desses microrganismos. Na maioria dos casos, as infecções com SCN ocorrem imediatamente após a parição, declinam no meio da lactação e os índices aumentam novamente no final da lactação até a vaca receber a terapia do período seco (Honkanen-Buzalski et al., 1994).

Entretanto, Harmon e Langlois (1989) afirmaram que a prevalência de estafilococos coagulase negativo durante a lactação permanece constante.

Os SCN foram isolados em 7 a 30% dos quartos pesquisados em vários rebanhos bovinos leiteiros. Eles aparecem como um dos microrganismos mais isolados em amostras de leite de rebanhos que controlaram o patógeno principal (Harmon e Langlois, 1995; Sears e MacCarthy, 2003). Pitkälä *et al.* (2004) encontraram 49,6% na Finlândia. Os agentes mais prevalentes em mamite bovina no Agreste do Estado de Pernambuco foram os *Staphylococcus* coagulase negativos - 36% (Freitas *et al.*, 2005), corroborando com os achados de Pessoa *et al.* (1999) e Mota *et al.* (1999) que encontram 35,5% e 54,3% de SCN no mesmo estado, respectivamente. No Rio Grande do Sul, Pereira *et al.* (1999) isolaram 8,52% de SCN em 258 quartos positivos com mamite subclínica na região de Uruguaiana, enquanto que Pinto *et al.* (1999) isolaram 29,35% SCN e Ribeiro *et al.* (2007) isolaram SCN em 2.275 amostras de leite no sul daquele Estado. Na região metropolitana de Belo Horizonte, foram encontradas taxas de 20% de SCN (Reis *et al.*, 2003). Em Uberlândia, Minas Gerais, Santos (2006) encontrou índices de 20,73% de SCN. No período entre 1986 e 1988, Langoni *et al.* (1991) verificaram que 23,19% de SCN foram responsáveis por IIM no estado de SP. Roberson *et al.* (1996) relataram que *Staphylococcus hyicus* representou 17,7% dos agentes isolados a partir de IIM de bovinos, enquanto Capurro *et al.* (1999) obtiveram frequências de 2% para *Staphylococcus intermedius* e 1% para *Staphylococcus hyicus*. Em cabras, Deinhofer *et al.* (1995) observaram aumento na quantidade de CCS, nos achados patológicos do úbere causados por SCN, assim como na sensibilidade à novobiocina em amostras de *S. epidermidis*, *S. simulans*, *S. chromogenes*, *S. lugdunensis* e *S. warneri*.

Brabes *et al.* (1999) observaram índices elevados de mamite causada por *S. chromogenes* (11,81%), *S. sciuri* (9,45%), *S. simulans* (7,08%), *S. hyicus* (6,30%), *S.*

*xylosus* (4,72%), *S. warneri* (2,36%), *S. epidermidis* (0,79%), *S. hominis* (0,79%), *S. caprae* (0,79%), *S. saprophyticus*. No trabalho de Lüthje e Schwarz (2006), houve prevalência de *S. chromogenes* (33,2%), *S. simulans* (23,2%), *S. epidermidis* (11,7%), *S. xylosus* e *S. haemolyticus* (9,4% cada) nos casos de mamite causados por SCN.

Os SCN foram os microrganismos isolados com maior frequência no leite de ovelhas (Pengov, 2001), na pele do úbere, dentro do canal do teto e na glândula mamária de cabras e ovelhas (Della Libera, 2007). Hernandez *et al.* (2007) encontraram 27,5% de SCN de 309 amostras isoladas de mamite ovina na região de Bauru, São Paulo. Dentre os SCN isolados de caprinos, *S. caprae* é a espécie mais prevalente, seguido de *S. epidermidis*, *S. xylosus*, *S. chromogenes*, e *S. simulans* em infecções intramamárias caprinas na Itália. Ao passo que o *S. epidermidis* é a espécie que geralmente está associada a elevadas contagens de células somáticas (Moroni *et al.*, 2005). Esses microrganismos possuem grande importância na reprodução experimental de mamite subclínica. A resistência a um amplo espectro de antibióticos comumente utilizados no tratamento de animais, tais como o cloranfenicol e a tetraciclina, assim como a resistência à combinação de trimetopin/sulfametoxazol, foi alta no grupo de ovelhas estudadas por Burriel (1997). Adicionalmente, foram isolados do leite de ovelhas *S. xylosus* e *S. epidermidis* resistentes à metilina, o que pode refletir o manuseio humano. A elevada prevalência de SCN resistentes (75,9%) encontrada pelo autor sugere que os agentes antimicrobianos devem ser usados somente quando absolutamente necessário.

#### 2.4. Identificação dos SCN

Normalmente, não se identifica SCN por espécie na rotina laboratorial. Porém, a acurada identificação bacteriológica das espécies e subespécies é necessária para desenvolver investigações epidemiológicas válidas, avaliar a significância da sua patogenicidade e aplicar práticas de manejo específicas. Knapp e Washington (1989)



relataram que o caldo trealose-manitol pode ser usado para diferenciar *S. epidermidis* de outras espécies de estafilococos, entretanto os autores não utilizaram amostra veterinária no estudo. Watts et al. (1991) afirmaram que o caldo trealose-manitol é um método aceitável para a diferenciação de SCN isolados da glândula mamária bovina.

Existem “kits” de identificação comercial baseados na diferenciação fenotípica, dessa forma, a identificação das espécies de SCN geralmente é baseada em reações bioquímicas. Eles são rápidos, mas nenhum pode identificar realmente a importância dos SCN devido à variabilidade de expressão de algumas características fenotípicas (Irlinger et al., 1997; Ligozzi et al., 2002). A eletroforese de enzima em *multilocus* ou a análise de composição de ácido graxo celular também tem sido usada, mas a identificação permanece incompleta (Stoakes et al., 1994). Os métodos genotípicos proporcionam os melhores resultados em termos de reprodutibilidade e discriminação das espécies. Os sistemas comerciais de rápida identificação de estafilococos têm sido desenvolvidos como alternativa de protocolos de identificação clássicos (Bannerman, 2003). Entretanto, estes sistemas de diagnósticos apresentam problemas, tais como custo, tempo de incubação, apresentando, geralmente, resultados irreais (Perl et al., 1994). Adicionalmente, vários desses kits são designados para a identificação de todas as espécies de SCN (humana, veterinária e isolada de alimentos) e, dessa forma, não são muito específicos (Cunha et al., 2004; Carreto et al., 2005). Os testes que são desenvolvidos para determinar amostras de origem humanas não identificam todos os SCN de origem animal (Bes et al., 2000), ocorrendo falhas na identificação (Couto et al., 2001).

O kit API Staph é ineficiente na identificação de *S. aureus* por não requerer o resultado do teste fundamental e mais amplamente aceito na identificação de *S. aureus*, o teste de coagulase (Koneman et al., 1997). A acurácia de vários kits de identificação rápida está entre 70 a >90% em amostra humana (Kloos e Bannerman, 1994),

enquanto que os resultados obtidos com esses kits de identificação rápida em amostras de bovinos não foram muito reais (Thorberg e Brändström, 2000). O nível de concordância com métodos convencionais foi menor que 42% (Langlois et al., 1983). Alguns fabricantes incluíram mais amostras de animais em seus kits de identificação, mas ainda é necessário avaliar diferentes sistemas de tipificação antes que resultados seguros no campo da veterinária sejam obtidos (Burriel e Scott, 1998). Dessa forma, novos métodos de identificação baseado na biologia molecular estão sendo continuamente testados e desenvolvidos (Couto et al., 2001; Skow et al., 2005).

Anteriormente, foi desenvolvida uma ordem de oligonucleotídeos chamada “Staph Array”, considerada a única ferramenta descrita que distingue 36 espécies de estafilococos de uma só vez e que permite uma identificação rápida e precisa de amostras de estafilococos de origem clínica e alimentar. Diferentes métodos epidemiológicos de tipificação são usados no estudo de SCN, tais como a biotipagem, a análise de susceptibilidade antimicrobiana padrão, a tipificação sorológica, a fagotipagem, a detecção da produção de biofilme, a análise do perfil de proteína, o imunoblot e a tipificação de DNA. No entanto, o teste mais utilizado é o de susceptibilidade antimicrobiana e padrões de DNA extracromossomal. Entretanto, nenhuma dessas técnicas é aplicada para a diferenciação de amostras pertencentes à mesma espécie de SCN, mas de espécies pertencentes a diferentes origens (clínica, humana, animal, ambiental). Geralmente, não é difícil isolar SCN de espécimes clínicos, pois os estafilococos crescem facilmente em meios utilizados em uma ampla variedade de condições (Maslow et al., 1993).

O desenvolvimento de métodos para a identificação das espécies e subespécies de estafilococos permite os clínicos obterem informações sobre a variedade dos SCN. É necessária uma identificação acurada para se ter uma predição do potencial de patogenicidade ou da susceptibilidade antimicrobiana e o conhecimento da

significância clínica de cada espécie. Por outro lado, a identificação das espécies é um pré-requisito para que os estudos epidemiológicos sejam entendidos (Cunha et al., 2004).

Piccolomini et al. (1994) compararam o “Staf-System 18-R” com os métodos bioquímicos tradicionais para identificar diferentes espécies de *Staphylococcus* de origem humana e afirmaram que o método identificou corretamente 93,9% das amostras. No sistema “in-house” para identificação de rotina de espécies de estafilococos desenvolvido por Monsen et al. (1998) houve concordância de 86,3% com os esquemas de identificação tradicional.

Staph-Zym é útil na rotina de identificação de amostras de SCN de importância clínica em medicina veterinária. Entretanto, o custo pode restringir o seu uso (Thorberg e Brändström, 2000).

A ribotipagem automatizada (“automated ribotyping”) é altamente confiável na identificação das espécies de SCN, a principal desvantagem é porque requer um equipamento de alto custo, no entanto, possui um protocolo muito simples que exige o mínimo de mão-de-obra (Carretto et al., 2005).

## **2.5. Contagem de Células Somáticas (CCS)**

A CCS corresponde a um dos mais eficientes métodos para interpretar a saúde da glândula mamária, principalmente quanto à presença de mastite subclínica. A contagem tem uma estreita relação com a qualidade do leite. Em termos de análise, ela traduz o total de células presentes no leite, que podem ser do tipo epitelial ou de defesa. As primeiras são oriundas da descamação normal do tecido de revestimento e secretor da glândula mamária. Já as células de defesa são os leucócitos, que migram do sangue para o úbere quando este sofre alguma agressão ou manifesta alguma infecção. Seu objetivo é englobar e digerir os microrganismos

invasores (Schukken et al., 2003; Arenales, 2005).

A CCS pode ser determinada por meio de várias técnicas de diagnóstico, que podem ser divididas em métodos indiretos (California Mastitis Test-CMT e Wisconsin Mastitis Test-WMT) e diretos (microscopia direta e analisadores eletrônicos), sendo utilizada em muitos países como um parâmetro de pagamento do leite segundo a sua qualidade. A CCS varia entre animais e entre amostras. Estas variações são justificadas por fatores como a idade da vaca, o estágio de lactação, o stress térmico, as estações do ano, as deficiências no funcionamento de ordenhadeiras que podem ocasionar lesões nos tetos desencadeando, conseqüentemente, a mamite. No entanto, o fator que mais interfere sobre a CCS é o nível de infecção da glândula mamária. O conhecimento dos fatores que influenciam as infecções do úbere é importante para uma correta interpretação da CCS. Geralmente, a CCS dos quartos infectados com SCN é de duas até três vezes mais altas que a dos quartos não infectados, mas a magnitude da resposta da CCS é menor que a magnitude estudada em outros patógenos. Vários países já possuem limites máximos legais de CCS para avaliação da qualidade do leite, como União Européia e Nova Zelândia (400.000 céls/mL), Canadá (500.000 céls/mL) e Estados Unidos (750.000 céls/mL) (Ferrão, 2002).

No Brasil, o controle de qualidade do leite tem se restringido a uma atividade de vigilância contra tentativas de fraude e adulteração do produto entregue às usinas, sendo raros os exemplos de iniciativa para analisar o produto qualitativamente e não só por sua composição físico-química. O teste mais usado no campo para a detecção de mastite subclínica é o CMT, existindo uma relação entre a intensidade das reações positivas e perdas da produção de leite das vacas em lactação (Araújo et al., 1999). Segundo Barbosa et al. (2002), a CCS e o CMT são altamente dependentes e possuem alta correlação no diagnóstico de mamite, em vacas em lactação.

*Staphylococcus* coagulase negativos foram considerados não patogênicos para a glândula mamária, até que Holmberg (1973) demonstrou que *S. epidermidis* eram patogênicos ao úbere, com o encontro de contagens de células somáticas acima de 500.000 células/mL de leite em casos de infecção subclínica. Os resultados dos estudos de Zafalon et al. (1999) e Thiers et al. (2002) demonstraram que estes microrganismos aumentam significativamente o conteúdo de células somáticas no leite.

Costa et al. (2005) verificaram que a CCS de glândulas mamárias infectadas por *Staphylococcus* coagulase positivo tanto em relação à média ( $598 \times 10^3$  céls./mL) quanto a mediana ( $484 \times 10^3$  céls./mL) apresentaram resultados superiores àquelas infectadas por SCN (média de  $399 \times 10^3$  céls./mL e mediana de  $394,5 \times 10^3$  céls./mL).

## **2.6. Tratamento x Resistência a Antimicrobianos**

A mastite bovina é a causa mais comum para o uso de antibióticos em rebanhos leiteiros. Os resíduos de antibióticos no leite representam o principal ponto crítico de controle de contaminação química no leite. A resistência às drogas está relacionada ao uso incorreto no tratamento parenteral e ou intramamário de animais em lactação, ao uso excessivo de antibióticos, às aplicações de subdoses de antimicrobianos para a prevenção de doenças, à promoção do crescimento e da eficiência alimentar em animais de produção, associado à seleção natural dos microrganismos (Meng et al., 1998; Silva et al., 1999). Os riscos à saúde do consumidor são apresentados principalmente pelo desencadeamento de fenômenos alérgicos em indivíduos sensíveis, pelos efeitos tóxicos e carcinogênicos, por alterações no equilíbrio da microbiota intestinal e pela seleção de bactérias resistentes no trato digestivo dos consumidores (Mansur et al., 2003).

Segundo Irlinger (2007), os SCN possuem habilidade de adquirir resistência aos antibióticos. O tratamento antimicrobiano

comumente utilizado para a mastite causada por SCN  $\beta$ -lactamase negativo é a penicilina G, parental ou intramamária, em combinação com aminoglicosídeo. Já nas mastites causadas por SCN  $\beta$ -lactamase positivo, tem-se utilizado a cloxacilina ou a combinação de ampicilina-cloxacilina. De acordo com o autor, o tratamento de vacas com mastite subclínica por SCN durante a lactação não é recomendado. Na Holanda, a cloxacilina só ou em combinação com a penicilina são frequentemente utilizadas na terapia do período seco (Tenhagen et al., 2006).

Os SCN, além de serem responsáveis por grandes prejuízos à pecuária leiteira, apresentam resistência a diversos antibióticos utilizados rotineiramente no tratamento desta doença (Brito et al., 2001). Já foram descritos no Brasil casos de infecções causadas por *S. aureus* parcialmente resistentes aos antibióticos mais potentes como a vancomicina e relatos da capacidade que os *Staphylococcus* coagulase negativos têm de desenvolver resistência. Diversos estudos que tratam da susceptibilidade a antimicrobianos de patógenos da mastite bovina no Brasil apontam para um aumento crescente no padrão de resistência. Desta forma, é de grande importância o isolamento e a identificação rápida e eficiente desses agentes em laboratórios e a análise *in vitro* da susceptibilidade antimicrobiana para um melhor controle através de terapêutica adequada (Silva et al., 2004).

O tratamento convencional com a utilização de antibióticos intramamários pode ser prejudicial à saúde pública, devido à presença de resíduos no leite, e este, muitas vezes, não é inspecionado. Segundo Castro et al. (1999a), alternativas eficazes e menos onerosas ao produtor, que amenizam o problema de saúde pública, devem ser avaliadas para tornar o tratamento e controle mais seguros, tais como a utilização de enzimas proteolíticas, onde os autores verificaram a eficácia de 64,3% no tratamento de mastite em cabras na região metropolitana de Recife, Pernambuco. No mesmo trabalho, os autores isolaram 78,9% de SCN.

Em um estudo realizado por Perrenten et al. (1998) com SCN em queijos, principalmente com amostras de *S. xylosum*, houve resistência ao cloranfenicol, à tetraciclina, à eritromicina e em menor proporção à gentamicina, à penicilina, à lincomicina e à kanamicina. Por outro lado, Rajala-Schultz et al. (2004) relataram diferença significativa na proporção de SCN penicilina resistente entre primíparas e multíparas. Já no estudo realizado por Taponen et al. (2006), o tipo de mastite clínica ou subclínica e a duração do tratamento antimicrobiano de 3 a 4 dias não afetaram as taxas de cura.

Pinto et al. (1999) observaram resistência dos SCN em relação à enrofloxacina de 9,09% e 45,7% à ampicilina, sendo que a resistência frente ao cloranfenicol, à penicilina e sulfazotrim foi acima de 26,31% no Rio Grande do Sul. Benites et al. (2000) avaliaram o padrão de resistência de amostras de *Staphylococcus* coagulase positivos e SCN isoladas de parênquima de glândulas mamárias de vacas em lactação enviadas ao abate e verificaram que a maior resistência foi à penicilina (84,4%) e ampicilina (86,6%) e a maior sensibilidade à cefalotina e gentamicina.

Em Pernambuco, os valores de sensibilidade antimicrobiana apresentados por Mota et al. (1999) foram: gentamicina (100%), neomicina (92,4%), lincomicina (90,6%), sulfazotrim (88,5%), cloranfenicol (86,8%), cefalotina (82,7%) para SCN isolados de leite bovino.

Devido aos consideráveis prejuízos econômicos determinados pela mamite, programas de controle têm sido adotados em vários países. Estes programas têm, em última análise, visado a redução das infecções pré-existentes e a prevenção de novas infecções. As medidas de higiene são importantes no controle das infecções intramamárias, mas em algumas situações, faz necessária a “blitz terapia”, como o tratamento dos casos subclínicos em plena lactação, além da terapia da vaca seca. O diagnóstico precoce, acompanhado do tratamento adequado, pode normalizar a produção de leite, bem como eliminar uma

fonte de infecção para os demais animais de criação (Domingues, 1993).

## 2.7. Instrução Normativa 51 (IN51)

A Instrução Normativa nº 51 do MAPA, que regulamenta a produção, identidade, qualidade, coleta e transporte do leite A, B, C, pasteurizado e o cru refrigerado, entrou em vigor no dia 1º de julho de 2005 nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste e em 1º de julho de 2007, nas regiões Norte e Nordeste.

A IN51 foi criada para melhorar a qualidade do leite produzido no Brasil, regulamentar a produção e favorecer a abertura de novos mercados para o leite brasileiro. Os laticínios ficam obrigados a exigir dos produtores condições adequadas de acesso, higiene e manejo, instalações e sanidade. O objetivo é padronizar a produção leiteira brasileira, estabelecer um padrão de qualidade e reduzir os índices de contaminação. Os produtores pagos pela qualidade do leite produzido devem manter rígido controle sobre a sanidade geral do rebanho, especialmente com relação à mamite. De acordo com IN51, as análises de contagem bacteriana total (CBT), a CCS e a composição de todo o leite cru produzido no país e processado em estabelecimentos sob fiscalização federal deverão ser realizados mensalmente em um dos laboratórios credenciados pelo MAPA (Brasil, 2002). Para atender a demanda por estas análises, o MAPA criou a Rede Brasileira de Laboratórios de Análise da Qualidade do Leite (RBQL), composta por laboratórios localizados em diferentes regiões do país.

Em levantamento da situação da qualidade do leite, Cassoli e Machado (2007) observaram que 14% das amostras de leite em São Paulo apresentavam alta CBT, considerando o limite máximo de 1.000.000 estabelecidos pela IN51; CBT maiores são citados por esses autores em Goiás (24%) e em Minas Gerais (17%), ao passo que em Santa Catarina, mais de 70% dos produtores apresentaram leite com contagens superiores a 1.000.000. Os autores evidenciaram um impacto positivo

em indústrias que iniciaram o programa de valorização da qualidade do leite.

## **2.8. Programa de Qualidade do Leite no Brasil (PNQL)**

O PNQL tem como objetivos promover a melhoria da qualidade do leite e derivados, garantir a saúde da população e aumentar a competitividade dos produtos lácteos em novos mercados. O consumidor deseja adquirir um produto seguro, com excelentes características nutricionais e maior vida útil, ao passo que a indústria almeja maior rendimento industrial, aumento da sua produtividade, aumento da vida útil de prateleira dos seus produtos, redução dos desperdícios, otimização dos custos de produção e, conseqüentemente, o aumento da competitividade dos produtos lácteos nacionais. As vantagens do PNQL para o produtor são: o reconhecimento e valorização do leite com qualidade superior, o pagamento diferenciado por qualidade e o estímulo para que ele se especialize (Alvim, 2007).

De acordo com Dürr (2005), a produção de leite com qualidade tem se tornado cada vez mais importante. No entanto, a higiene adequada das mãos dos ordenhadores, do úbere das vacas, do equipamento de ordenha e do meio ambiente associado ao correto manejo de ordenha, com utilização de medidas de anti-sepsia dos tetos pós-ordenha e a permanência do animal em pé pós-ordenha, até a completa oclusão do canal do teto, são necessárias para atingir este objetivo. Além disso, no momento da ordenha deve ser feito os testes da caneca de fundo escuro e o CMT, a pré-desinfecção das tetas do animal, a secagem com papel toalha e a desinfecção das tetas após a ordenha. Outra ação importante é a conservação do leite ordenhado em baixas temperaturas. O leite deve ser resfriado em tanques de expansão direta ou em tanques de imersão do latão em água gelada, sendo recolhido e transportado por caminhões rodoviários isotérmicos até o laticínio. Nos casos em que o produtor não tiver como resfriar o leite na fazenda, ele deverá resfriá-lo em um tanque comunitário ou no próprio laticínio, no entanto, o leite deve ser

entregue, no máximo, duas horas após a ordenha. Dessa forma, os produtores poderão melhorar a qualidade do leite e aumentar a renda familiar.

No Brasil, o sistema de comercialização do leite e o aprimoramento das relações entre indústrias e produtores passaram por uma evolução, através do pagamento diferenciado do leite, baseado em critérios de qualidade da matéria-prima implantado em algumas indústrias de laticínios (Cerqueira, 2006).

## **3. MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1. Local de realização do experimento**

O trabalho foi realizado no Laboratório de Diagnóstico e Pesquisa em Doenças Infecciosas do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e no Laboratório de Pesquisas em Bacterioses do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

### **3.2. Rebanhos**

No período de janeiro 2004 a dezembro de 2006, foram analisados 35 rebanhos bovinos leiteiros localizados em 20 municípios pertencentes à bacia leiteira da Região Sul do Estado de Minas Gerais. Estabeleceu-se que os rebanhos a serem utilizados no estudo deveriam empregar a ordenha mecânica, ter número mínimo de 30 animais em lactação e que o número mínimo de amostras a serem processadas para cada rebanho seria de 15.

### **3.3. Amostras de leite destinadas à bacteriologia**

A coleta de amostras de leite de animais que apresentaram mamite clínica ou subclínica foi realizada em todos os rebanhos após a realização do teste da caneca de fundo escuro e do CMT, segundo as orientações de Veiga (1998). Todas as vacas em lactação, exceto aquelas com até 15 dias de paridas e aquelas no último mês de lactação, foram submetidas ao teste. Os

resultados foram anotados em fichas apropriadas e posteriormente correlacionados com os resultados microbiológicos.

Foram coletados assepticamente, em frascos estéreis, cerca de 10 mL de leite de cada um dos quartos de animais com resultado positivo no teste de CMT ou que apresentaram mamite clínica. A coleta foi realizada de acordo com as normas preconizadas por Veiga (1998), sendo as amostras devidamente identificadas e remetidas ao laboratório sob refrigeração. Os animais que se encontraram sob

tratamento antibiótico na ocasião da visita ou nos últimos sete dias que a antecederam foram excluídos da amostragem. Foi feita a coleta de amostras de animais que apresentaram reação positiva ao CMT (+, ++, +++) e daqueles com reação positiva frente ao teste da caneca de fundo escuro, observando-se um número mínimo de 15 amostras por rebanho a ser estudado.

### 3.4. Determinação dos índices de mamite

Os índices de mamite subclínica foram obtidos pela análise dos resultados do CMT, empregando-se a equação:

$$\% \text{ de Mamite Subclínica} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de quartos reagentes ao CMT}}{\text{N}^\circ \text{ total de quartos examinados}} \times 100$$

A incidência de mamite clínica durante o período lactacional foi obtida de acordo com a fórmula:

$$\% \text{ de Mamite Clínica} = \frac{\text{Teste da caneca de fundo escuro positivo}}{\text{N}^\circ \text{ total de animais em lactação}} \times 100$$

### 3.5. Coleta e análise de amostras de leite em tanque

Para a realização da Contagem de Células Somáticas de Tanque (CCST), amostras oriundas do tanque de expansão ou latões foram coletadas em frascos próprios, fornecidos pelo Laboratório de Qualidade do Leite da Escola de Veterinária da UFMG, onde as amostras foram analisadas por citometria de fluxo (Somacount 500 – Bentley - USA). Estas foram acompanhadas de uma ficha contendo a identificação do rebanho, data e horário da coleta, tipo de amostra enviada (tanque ou latão) e a temperatura da amostra no momento da coleta.

### 3.6 - Isolamento e Identificação de Microrganismos

Tão logo chegaram ao laboratório, as amostras de leite oriundas de animais com mamite clínica ou subclínica foram incubadas em temperatura de 37°C por 8-12 horas para enriquecimento. Após essa

etapa, as amostras de leite foram semeadas em placas contendo Ágar Sangue, incubadas à 37°C por 24-48H. Para o cultivo das amostras e a identificação foram utilizados os seguintes meios:

- Ágar Sangue: ágar Sangue Base, contendo 5-10% de sangue de carneiro desfibrinado, preparado conforme descrito por Quinn et al. (1994).
- Caldo Brain Heart Infusion (BHI) (Oxoid): preparado conforme recomendações do fabricante. Foi utilizado para o isolamento de colônias sugestivas de *Staphylococcus spp.* obtidas nos meios sólidos.

A seguir, avaliou-se quanto ao crescimento de colônias sugestivas de *Staphylococcus spp.* A identificação e o isolamento das colônias foram realizados com base nas características macroscópicas (pigmentação, tamanho, presença de hemólise etc) das colônias obtidas em Ágar Sangue e características microscópicas, em

esfregaços corados pela técnica de Gram, de acordo com Quinn et al. (1994).

As colônias que apresentaram morfologia macroscópica e microscópica sugestiva de estafilococos e resultados positivos no teste de catalase e coagulase negativo, e que também foram negativas nos testes de oxidase e KOH a 3%, foram submetidas a testes bioquímicos para identificação final de SCN por testes bioquímicos, como arabinose, arginina, esculina, inusitol, inulina, lactose, maltose, manitol, manose, rafinose, sacarose, salicina, sorbitol e trealose, uréia, VP e nitrito, segundo Quinn et al. (1994). Os resultados foram interpretados de acordo a chave de identificação de Holt et al. (1994).

### **3.7 - Determinação do perfil de resistência a antimicrobianos**

Para a avaliação da susceptibilidade a antimicrobianos dos isolados de SCN foi utilizada a técnica de difusão em ágar, segundo Bauer et al. (1966), empregando-se o Ágar Müller Hinton (Oxoid) e os resultados interpretados segundo a tabela sugerida pelo NCCLS (2002).

Foram testados os seguintes antibióticos: ampicilina (10µg), cefalotina (30µg), cefoperazona (30µg), cefotaxima (30µg), ceftiofur (30µg), cloranfenicol (30µg), danofloxacina (10µg), enrofloxacina (10µg), estreptomina (10µg), florfenicol (30µg), gentamicina (10µg), lincomicina (15µg), neomicina (30µg), nitrofurantoína (300UI), novobiocina (30µg), penicilina G (10µg), polimixina B (300 UI), tetraciclina (30µg) e as associações de sulfametoxazol e trimetoprim (23,75µg/1,25µg).

Cinco colônias com as mesmas características morfológicas foram repicadas para tubos de ensaio contendo 4 a 5 ml de caldo BHI e incubadas a 35°C por um período suficiente (2-6h) para apresentar uma turbidez equivalente a 0,5 da escala padrão de McFarland. Em seguida, foi feita a semeadura com a ajuda de *swabs* sobre a superfície do meio de ágar Müller-Hinton. A etapa seguinte consistiu na colocação dos discos, fazendo-se leve pressão para permitir o contato entre os mesmos e a superfície do meio inoculado. A incubação ocorreu à temperatura de 37° C por um período de 24 horas, quando então foi feita a leitura de acordo com o diâmetro de sensibilidade apresentado por cada amostra frente aos diversos antimicrobianos utilizados, de acordo com o fabricante dos discos de antibióticos.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1. Índices de mamite nos rebanhos trabalhados**

Foram avaliados 35 rebanhos pelo teste da caneca de fundo escuro e CMT, visando o diagnóstico da mamite clínica e subclínica, respectivamente. Os índices de mamite subclínica (IMSC) e clínica (IMC) em cada um dos rebanhos estudados encontram-se na tabela 1. A prevalência de casos de mamites subclínicas variou entre 17,14% e 85,45%, com um índice médio (IMSC) de 52,20%, entre os rebanhos trabalhados. Em relação às mamites clínicas, o índice médio (IMC) foi de 9,87%, verificando-se variações entre rebanhos de zero até 28,57%.

Tabela 1. Índices de mamite subclínica e clínica e resultados das contagens de células somáticas no leite de tanque de 35 rebanhos leiteiros da região sul do Estado de Minas Gerais, 2004-2006.

<b>Rebanhos</b>	<b>IMSC</b>	<b>IMC</b>	<b>CCST x 10<sup>3</sup> cels/mL</b>
1	65,13	15,78	1.178
2	41,24	11,11	468
3	58,75	25,00	1.471
4	62,26	6,60	651
5	57,95	4,54	678
6	60,32	6,25	304
7	66,66	3,57	484
8	17,42	4,54	149
9	50,00	0,00	325
10	58,59	9,37	1.008
11	51,92	9,79	656
12	76,58	6,34	1.182
13	70,20	18,36	1.000
14	80,55	19,44	1.809
15	47,80	15,78	548
16	85,45	16,36	1.702
17	53,88	4,44	1.010
18	22,40	6,25	415
19	50,00	18,51	1.532
20	30,26	6,86	201
21	69,61	9,41	1.956
22	35,41	22,22	927
23	54,60	28,57	3.181
24	67,30	6,15	1.284
25	53,16	2,53	790
26	43,56	4,54	336
27	17,14	1,90	336
28	36,98	8,21	420
29	71,83	1,40	465
30	69,75	12,90	1.314
31	34,16	10,00	969
32	27,13	6,53	2.277
33	40,00	10,00	533
34	63,57	5,00	1.200
35	35,66	7,35	750
<b>Média</b>	<b>52,20%</b>	<b>9,87</b>	<b>957,4</b>



Observa-se que os índices de mamite subclínica foram muito superiores aos níveis aceitáveis (15%), valores de IMSC considerados como inaceitáveis (Fonseca e Santos, 2000). Somente dois rebanhos (5,71%) apresentaram IMSC inferiores a 20%, enquanto 20 (57,14%) apresentaram taxas superiores a 50%, sendo que destes, cinco (14,28%) apresentaram IMSC  $\geq$  que 70%. A literatura nacional cita índices de mastite clínica variáveis entre 7,46% e 17,45% e subclínica entre 34,31% e 46,54% (Costa et al., 1995; Bueno et al., 2002).

Estes rebanhos apresentaram CCST média de  $957,4 \times 10^3$  cels/mL de leite, sendo que somente 6 rebanhos (17,14%) apresentavam CCST inferiores a 400.000, 18 rebanhos (51,42%) apresentaram escores superiores a  $750.000 \text{ cel./mm}^3$ , tendo 14 deles (40%) apresentado CCST superiores a  $1.000.000 \text{ cel./mm}^3$ . As CCSTs obtidas demonstraram que uma parcela expressiva dos rebanhos analisados apresentava contagens de células somáticas acima dos parâmetros estabelecidos pela legislação vigente (Brasil, 2002), resultando em índices elevados de mastite subclínica no rebanho (Schukken et al., 2003), trazendo reflexos diretos na qualidade do leite e na produtividade do rebanho, segundo Fonseca e Santos (2000).

Verificou-se que os maiores escores de CCST e maiores IMSC ocorreram em rebanhos infectados principalmente por *S. aureus* e *S. agalactiae*. Cinco propriedades tiveram o *S. agalactiae* como agente principal e foram aquelas que apresentaram os escores mais elevados de CCST (1.702 a 3.181), o que demonstra o impacto deste microrganismo na CCST em relação aos demais patógenos contagiosos, conforme relatado por Zafalon et al. (1999) e por Costa et al. (2005).

Nos rebanhos de nºs 9 e 33 prevaleceram as infecções causadas por SNC. Estes patógenos embora não relacionados às altas CCS, têm aumentado a sua

importância na etiologia das IIM. O impacto destes patógenos sobre a CCST e os prejuízos a elas associadas são consideráveis (Holmberg, 1973; Zafalon et al., 1999; Thiers et al., 2002). Segundo Costa et al. (2005), as glândulas mamárias infectadas por *Staphylococcus coagulase* negativo apresentam em média  $399 \times 10^3$  cels./mL de leite.

#### **4.2. Distribuição dos microrganismos isolados em casos de mamite subclínica e clínica entre os rebanhos**

Na tabela 2 se encontra a distribuição dos microrganismos isolados dos 35 rebanhos trabalhados. Foram isolados 1700 patógenos relacionados aos casos de mamite, principalmente os estafilococos coagulase positivo (SCP) que estiveram presentes em 97,14% dos rebanhos da região sul de MG com 34,29% dos isolamentos. Em seguida vieram os *Streptococcus agalactiae* com 21,82%, presentes em 65,71% dos rebanhos estudados. Juntos, SCP e *Streptococcus agalactiae* representaram 56,11% dos agentes isolados, demonstrando a predominância da mastite contagiosa nos rebanhos estudados. A importância destes patógenos em casos de mamite em diferentes regiões do País foi demonstrada por diversos autores (Costa et al., 1995; Mota et al., 2004) com predominância dos agentes contagiosos *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. e *C. bovis* na etiologia da mastite bovina em rebanhos de São Paulo, Minas Gerais e Pernambuco, respectivamente.

Os SCN estiveram presentes em 30 rebanhos (85,71%), com uma taxa média de isolamentos de 7,05% (Tab. 2). A prevalência das infecções intramamárias causadas por SCN apresenta diferenças em diversas regiões brasileiras (Langoni et al., 1991; Pereira et al., 1999; Pessoa et al., 1999; Pinto et al., 1999; Mota et al., 1999; Freitas et al., 2005; Ribeiro et al., 2007), variando entre 8,52% e 54,3%.

Tabela 2. Distribuição de microrganismos isolados em casos de mamite subclínica e clínica em 35 rebanhos bovinos leiteiros da região sul de Minas Gerais, 2004-2006.

Agentes Isolados	Nº de isolados	Frequência (%)	Rebanhos positivos
SCP <sup>1</sup>	583	34,29	34 (97,14)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	371	21,82	23 (65,71)
<i>Corynebacterium bovis</i>	240	14,11	32 (91,42)
SCN <sup>2</sup>	120	7,05	30 (85,71)
<i>Streptococcus uberis</i>	111	6,52	30 (85,71)
Enterobactérias	62	3,64	20 (57,14)
Leveduras	57	3,35	18 (51,42)
<i>Pseudomonas</i> spp	39	2,29	10 (28,57)
<i>Bacillus</i> spp	44	2,58	23 (65,71)
<i>Enterococcus</i> spp	38	2,23	19 (54,28)
<i>Streptococcus</i> spp	26	1,52	11 (31,42)
<i>Prototheca zopfii</i>	5	0,29	2 (5,71)
Outros agentes	4	0,23	-
Total	1.700	100	-

1-*Staphylococcus* coagulase positivos; 2-*Staphylococcus* coagulase negativos

A frequência de isolamentos foi geralmente baixa dentro dos rebanhos, exceto nos rebanhos de números 9 e 33, nos quais se verificaram taxas de isolamento de 25,71% e 22,91%, respectivamente. Estes rebanhos utilizavam o confinamento total, com rigoroso controle da higiene de ordenha, mas apresentavam sérios problemas com o manejo de camas. Verificou-se que as taxas de isolamento de SCN nestes rebanhos foram superiores às de SCP, além disso, a participação de agentes ambientais na etiologia da mamite foi mais expressiva.

Verificou-se a maior participação dos SCN em casos subclínicos de mamite (96,67%) em detrimento à ocorrência de casos clínicos (Fig. 1). Embora considerados por muito tempo como agentes pouco patogênicos para a glândula mamária de bovinos e, designados “patógenos menores”, tem-se verificado o crescimento na importância de SCN na etiologia das IIM, sobretudo para vacas primíparas e em rebanhos nos quais as infecções por *S. aureus* e *S. agalactiae* foram controladas (Laffranchi et al., 2001; Sears e McCarthy,

2003; Tenhagen et al., 2006), fato também verificado nos rebanhos trabalhados, onde o maior percentual de vacas com mamite subclínica causada por SCN foi o grupo de vacas jovens e novilhas de primeira cria.

A mamite bovina é uma doença multifatorial de etiologia complexa e variada, encontrando-se disseminada em todas as regiões produtoras de leite. O resultado da identificação dos SCN isolados nos casos de mamite nos rebanhos bovinos da região da bacia leiteira do sul de MG está na tabela 3. Das 120 amostras de SCN isoladas, foram identificadas *S. hyicus* subsp. *hyicus* (18 isolamentos, 15,0%), *S. hyicus* subsp. *chromogenes*, *S. gallinarum* e *S. lentus* (15 isolamentos de cada, 12,5%) e *S. epidermidis* (13 isolamentos, 10,8%) como as mais prevalentes. Adicionalmente, 27 amostras de *Staphylococcus* coagulase negativo foram identificadas com menor frequência. Em 17 amostras de SCN não foram identificadas a que espécies pertencem, sendo caracterizadas com *Staphylococcus* spp (14,3%).

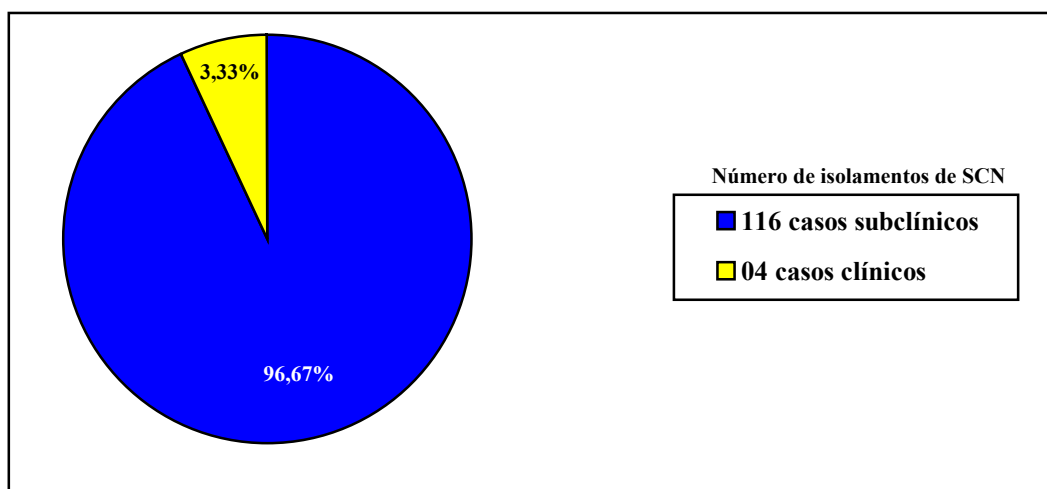


Figura 1. Resultados dos isolamentos de *Staphylococcus* coagulase negativo entre casos subclínicos (96,67%) e clínicos (3,33%) de mamite em 30 rebanhos bovinos leiteiros da região sul de MG, 2004-2006.

Tabela 3. Distribuição dos *Staphylococcus* coagulase negativos isolados em casos de mamite subclínica e clínica e nos rebanhos bovinos da região da bacia leiteira do sul de MG, 2006.

Espécie	Nº de isolados	Percentual
<i>Staphylococcus hyicus</i> subsp. <i>hyicus</i>	18	15,0
<i>Staphylococcus hyicus</i> subsp. <i>chromogenes</i>	15	12,5
<i>Staphylococcus gallinarum</i>	15	12,5
<i>Staphylococcus lentus</i>	15	12,5
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	13	10,8
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	07	5,8
<i>Staphylococcus caprae</i>	06	5,0
<i>Staphylococcus simulans</i>	05	4,2
<i>Staphylococcus hominis</i>	04	3,3
<i>Staphylococcus sciuri</i>	03	2,5
<i>Staphylococcus capitis</i>	01	0,8
<i>Staphylococcus carnosus</i>	01	0,8
<i>Staphylococcus</i> spp	17	14,3
<b>Total</b>	<b>120</b>	<b>100</b>

A determinação da etiologia das IIM causadas por SCN pode se constituir em importante ferramenta para os programas de controle das mamicas causadas por estes microrganismos. Segundo Sears e McCarthy (2003), SCN são microrganismos que fazem parte da microbiota saprófita da pele, que podem colonizar o canal do teto. São comumente associados à IIM de

bovinos em rebanhos onde as infecções por *S. aureus* e *S. agalactiae* foram controladas. De acordo com aqueles autores, as principais espécies do grupo isoladas de IIM são *S. chromogenes* e *S. hyicus*, mas outras espécies, incluindo *S. simulans*, *S. epidermidis*, *S. hominis* e *S. xylosus* também podem ser isoladas. Resultados semelhantes foram encontrados entre os

rebanhos da bacia leiteira do sul de MG e associados, principalmente, aos casos subclínicos da doença, exceção ao não isolamento de *S. xylosus*.

A espécie de SCN mais prevalente nos casos de mamite clínica e, principalmente da subclínica, foi *S. hyicus*, correspondendo a 15,0% das amostras estudadas. Os achados deste estudo são semelhantes aos Harmon e Langlois (1989), Roberson et al. (1996), Sears e McCarthy (2003) e Lüthje e Schwarz (2006) que afirmaram ser este o agente mais frequentemente isolado nas mamicas contagiosas, transmitidas quase que exclusivamente durante a ordenha, representando grande importância epidemiológica nas mamicas bovinas. Porém, Taponen et al. (2006) observaram maior incidência de *S. simulans* (43,6%), seguido de *S. chromogenes* (23,3%) nas amostras de leite de vacas com mamite.

Os *S. hyicus* apresentam variações quanto à sua capacidade de coagular o plasma sanguíneo, razão pela qual podem participar do grupo dos estafilococos coagulase positivo ou coagulase negativo (Holt et al., 1994; Quinn et al., 1994). Dos espécimes isolados dos casos de mamite subclínica e/ou clínica nos 30 rebanhos bovinos da região sul de MG, todos se apresentaram como SCN.

Em nosso País, vários estudos sobre a distribuição de casos de mamicas em diferentes regiões, mostraram uma alta prevalência das IIM causadas pelos SCN (8,52% a 54,3%), entretanto, eles são restritos à determinação da capacidade dos estafilococos em coagular ou não o plasma sanguíneo ou, então, são citados como *Staphylococcus* spp (Mota et al., 1999; Pessoa et al., 1999; Pereira et al., 1999; Pinto et al., 1999; Freitas et al., 2005; Ribeiro et al., 2007). Desta maneira, não foi possível estabelecer uma relação entre os achados daqueles autores com os que aqui são relatados. Apenas Ribeiro et al. (1999) isolaram 14,8% de *S. epidermidis* em vacas, em região de clima temperado, enquanto que Brabes et al. (1999) observaram índices mais elevados de *S. chromogenes* (11,81%), *S. sciuri* (9,45%), *S. simulans*

(7,08%), *S. hyicus* (6,30%), *S. xylosus* (4,72%), *S. warneri* (2,36%), *S. epidermidis* (0,79%), *S. hominis* (0,79%), *S. caprae* (0,79%), *S. saprophyticus*.

Os resultados obtidos no presente trabalho estão de acordo com as citações feitas por Lüthje e Schwarz (2006) que encontraram altos índices de *S. chromogenes* e *S. epidermidis* e baixos índices de *S. sciuri*, *S. capitis*, *S. hominis* e *S. caprae*.

Embora SCN sejam considerados genericamente como agentes contagiosos, alguns deles, como os *S. sciuri* e *S. xylosus* podem ser de origem ambiental, sendo encontrados em camas orgânicas (Harmon e Langlois, 1989; Sears e McCarthy, 2003), o que poderia justificar a maior frequência de isolamentos destes patógenos em sistemas de confinamento, onde normalmente existem problemas com a higiene das instalações e de camas. Neste trabalho *S. sciuri* representou 2,5% dos isolamentos e não foram isoladas amostras de *S. xylosus*, provavelmente por influência das condições de ordenha e fatores relacionados ao manejo dos animais, como assinalado por Mendonça et al. (1999). Segundo esses autores fatores relacionados à nutrição, manejo, higiene e condições ambientais, aliados às características genéticas, podem influenciar os índices de mamicas nos rebanhos, assim como a prevalência de determinadas espécies.

Não foi possível a identificação de 17 amostras de SCN (14,3%) a partir de animais apresentando casos clínicos e/ou subclínicos de mamite. Contudo, a identificação das espécies de SCN é baseada em testes bioquímicos desenvolvidos para determinar amostras de origem humanas (Kloos e Bannerman, 1994), esses testes não conseguem identificar todos os SCN de origem animal (Bes et al., 2000; Couto et al., 2001).

Tentativas de identificação foram realizadas com kits de identificação rápida, entretanto os resultados obtidos com as amostras de bovinos não foram muito reais, assim como foi relatado por Thorberg e Brändström (2000). Daí a opção por testes

convencionais de identificação microbiológicas (Quin et al., 1994), mesmo porque nem sempre é possível identificar todos os espécimes de SCN isolados de matérias clínicos (Piccolomini et al., 1994; Monsen et al., 1998).

#### **4.3. Teste de susceptibilidade a antimicrobianos**

A avaliação dos perfis de susceptibilidade *in vitro* das 120 amostras de SCN isoladas em casos de mamite em 35 rebanhos bovinos leiteiros da região do sul de MG se encontra na tabela 4. Das amostras avaliadas, 33 delas (27,5%) foram resistentes à penicilina, 25 (20,8%) à estreptomicina, 22 (18,3%) à ampicilina e 17 (14,2%) à tetraciclina.

Entre os diferentes antibióticos de utilização em medicina veterinária para tratamento das IIM, a danofloxacina, a enrofloxacina e o florfenicol foram os antibióticos frente aos quais os SCN demonstraram o maior percentual de susceptibilidade (100%).

A alta eficácia destas drogas se deve, possivelmente, ao pouco uso destes antibióticos em medicina veterinária, pois em nenhuma das propriedades estudadas este medicamento era utilizado, segundo informações obtidas junto aos proprietários.

Comparando-se os resultados dos testes de susceptibilidade aos diferentes antimicrobianos, realizados nos 35 rebanhos bovinos, pertencentes à bacia leiteira do sul de MG, observa-se que os SCN apresentam baixos níveis de resistência em relação às drogas utilizadas na rotina dos tratamentos das IIM de bovinos em relação a outras regiões do País (Mota et al., 1999; Pinto et al., 1999). As amostras de SCN isoladas em casos de mamite bovina por Lopes et al. (1999) em Pedro Leopoldo, Minas Gerais, foram sensíveis à gentamicina (100%), ao cloranfenicol (83%), à norfloxacina (80%) e à eritromicina (76,6%). Esta é uma informação importante no âmbito técnico,

principalmente para profissionais que atuam a campo e que não dispõem de estrutura para procedimentos laboratoriais. Em Pernambuco, os ensaios de sensibilidade *in vitro* demonstraram 100% de sensibilidade antimicrobiana à gentamicina em cabras com mamite subclínica (Castro et al., 1999b).

Outro aspecto importante a ser considerado neste estudo foi o elevado percentual de bactérias sensíveis às quinolonas (danofloxacina e enrofloxacina), fazendo destes uma opção de tratamento sistêmico associado ao uso intramamário da gentamicina. Pode-se atribuir este fato a pouca indicação das quinolonas para tratamento de mastites nos rebanhos estudados, conforme informações dos proprietários, o que sugere a falta de pressão de seleção sobre os isolados, daí o alto percentual de amostras susceptíveis a esta droga. A utilização deste antimicrobiano nos testes de susceptibilidade é indicada pelos mecanismos de ação das mesmas sobre os microrganismos, assim como por ser uma droga de uso parenteral, enquadra-se no tipo de medicação a ser indicada para os casos de tratamento das IIM causadas por outros microrganismos (Silva et al., 1999).

Os estafilococos coagulase negativos isolados de leite de vacas com mamite apresentaram índices de resistência à penicilina de 27,5%, cujo nível de resistência varia entre as espécies (Sampimon et al., 2007). A penicilina, a ampicilina (Benites et al., 2000) e a tetraciclina (Cunha et al., 2006) foram as drogas que apresentaram maiores percentuais de resistência, concordando com os achados do presente trabalho. Os betalactâmicos foram amplamente empregados no passado, porém, através de testes de susceptibilidade *in vitro* foi possível, ainda, detectar amostras de SCN sensíveis e sugerir a utilização de penicilina no tratamento *in vivo*, ao invés de medicamentos de última geração.

Tabela 4. Avaliação da resistência de 120 amostras de *Staphylococcus* coagulase negativos isoladas de casos subclínicos e clínicos de mamite em 30 rebanhos bovinos da região sul de Minas Gerais, 2004-2006.

Microrganismos Isolados *	Número de amostras resistentes aos antimicrobianos testados*															
	AMP	CFL	CFZ	CTX	CTF	CLO	EST	GEN	LIN	NEO	NIT	NOV	PEN	POL	SUT	TET
<i>S. capitis</i> (1)	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0
<i>S. caprae</i> (6)	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1
<i>S. chromogenes</i> (15)	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>S. epidermidis</i> (13)	3	0	0	0	0	1	5	0	1	1	0	0	3	0	0	1
<i>S. gallinarum</i> (15)	3	0	1	1	1	0	3	0	2	1	0	1	5	0	0	3
<i>S. haemolyticus</i> (7)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1
<i>S. hominis</i> (4)	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2	0	0	2
<i>S. hyicus</i> (18)	2	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	2	0	0	2
<i>S. lentus</i> (15)	3	0	1	0	0	0	4	0	0	0	0	0	3	0	0	1
<i>S. sciuri</i> (3)	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1
<i>S. simulans</i> (5)	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1
<i>Staphylococcus</i> spp (17)	4	2	0	0	2	2	6	2	4	1	1	4	12	1	3	4
Taxa de resistência (%)	18,3	3,3	1,7	0,8	3,3	3,3	20,8	3,3	9,2	2,5	1,7	5,0	27,5	3,3	3,3	14,2

AMP: Ampicilina; CFL: Cefalotina; CFZ: cefoperazona; CTX: Cefotaxima; CTF: Ceftiofur; CLO: Cloranfenicol; EST: Estreptomicina; GEN: Gentamicina; LIN: Lincomicina; NEO: Neomicina; NIT: Nitrofurantoína; NOV: Novobiocina; PEN: Penicilina; POL: Polimixina B; SUT: Trimethoprim/Sulfametoxazole; TET: Tetraciclina.

\* Todos os microrganismos foram sensíveis à Danofloxacina, Enrofloxacina e Florfenicol.

O uso incorreto associado à seleção natural dos microrganismos desafiados, provavelmente resulta no fenômeno da resistência. Essa resistência às drogas está relacionada, principalmente, com o uso excessivo de antibióticos em medicina veterinária e às aplicações sub-terapêuticas de antimicrobianos para a prevenção de doenças, para a promoção do crescimento e eficiência alimentar em animais de produção (Meng et al., 1998; Silva, 1999). Este baixo percentual de amostras de SCN resistentes às penicilinas e ampicilinas revela que nesses 35 rebanhos bovinos as mamites clínicas e subclínicas estão sendo causadas por SCN  $\beta$ -lactamase negativo, sugerindo o uso de penicilina G, parental ou intramamária, em combinação com aminoglicosídeo (Irlinger, 2007). Entretanto, não se recomenda o tratamento da mamite subclínica durante a lactação (Reis et al., 2003; Irlinger, 2007).

O percentual de multiresistência revelado pelos isolados de SCN nas amostras estudadas não é preocupante, posto que a maioria dos antibióticos disponíveis no mercado têm efeito sobre esta bactéria não trazendo dificuldades ou impossibilitando o tratamento dos animais com mamite, principalmente pelos baixos índices de mamite clínica verificada nos rebanhos (3,3%). De todas as maneiras, a determinação da susceptibilidade das diferentes espécies de estafilococos coagulase negativos se constitui em importante ferramenta para o controle das mamites causadas por estes microrganismos, além de indicar que nos rebanhos trabalhados a pressão de seleção de outros tipos de microrganismos envolvidos em casos de IIM ainda não existe ou está em baixos níveis (Silva et al., 1999; Irlinger, 2007).

## 5. CONCLUSÕES

- Os *Staphylococcus* coagulase negativos têm participação ativa como causa de mamite subclínica em rebanhos bovinos leiteiros da região sul de Minas Gerais;
- *Staphylococcus hyicus* foram os principais responsáveis pela mamite bovina causada por SCN entre os rebanhos trabalhados;
- O percentual de multiresistência revelado pelos isolados de SCN nas amostras estudadas não é preocupante, posto que a maioria dos antibióticos disponíveis no mercado tem efeito sobre estas bactérias;
- Quinolonas e aminoglicosídeos em associação podem ser os antibióticos de eleição para o tratamento e controle das mamites clínica e subclínica por SCN nos rebanhos da região sul de Minas Gerais.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. Detecção e identificação de bactérias de importância médica. Módulo V, 2004.

ALVIM, R. S. Importância do Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite (PNQL). Disponível em: <[www.cna.org.br](http://www.cna.org.br)> Acesso em: 05. jan 2008.

AMARAL, L. A.; ROSSI JÚNIOR, O. D.; NADER FILHO, A. et al. Ocorrência de *Staphylococcus* sp. em água utilizada em propriedades leiteiras do Estado de São Paulo. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 55, pp. 620-623, n. 5, 2003.

- ARAÚJO, R. N.; PAIVA, C. A. V.; COELHO, M. F. S. et al. Relação entre a produção de leite e a reação ao CMT no rebanho leiteiro da fazenda modelo da UFMG - Pedro Leopoldo (MG). In: *Encontro de Pesquisadores em Mamites*, 3, 1999, Botucatu. *Anais...* Botucatu: FMVZ - UNESP, 1999. p.168.
- ARENALES, M. C. *Mastite: sua importância econômica*. Disponível em: <[www.bichoonline.com.br](http://www.bichoonline.com.br)> Acesso em 05: jan 2008.
- BALABAN, N.; RASOOLY, A. Analytical chromatography for recovery of small amounts of staphylococcal enterotoxins from food. *Int. J. Food Microbiol.* v. 64, n. 1-2, p. 33-40, 2001.
- BALOWS, A.; HAUSLER JR., W. J.; HERRMANN, K. L. et al. *Manual of Clinical Microbiology*. 5 ed. Washington: American Society for Microbiology, 1991. 1384p.
- BANNERMAN, T. L. *Staphylococcus, Micrococcus* and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In: Murray, P. R.; Barron, E. J.; Jorgensen, J. H. et al. (Eds) *Manual of Clinical Microbiology*. Washington, 2003. American Society Microbiology. p. 383-404.
- BARBOSA, C. P.; BENEDETTI, E.; RIBEIRO, S. C. A. et al. Relação entre a Contagem de Células Somáticas (CCS) e os resultados do "California Mastitis Test" (CMT), no diagnóstico de mastite bovina. *Biosci. J.*, v.18, n.1, p. 93-102, 2002.
- BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, v. 45, n. 4, p. 493-496, 1966.
- BENITES, N. R.; MELVILLE, P. A.; GUERRA, J. L. et al. Avaliação do status microbiológico de diferentes estruturas de glândulas mamárias de vacas leiteiras abatidas. *Rev. Napgama*, v. 3, n. 3, p. 10-13, 2000.
- BERGONIER, D.; DE CREMOUX, R.; RUPP, R. et al. Mastitis of dairy small ruminants. *Vet. Res.*, v. 34, n. 5, p. 689-716, 2003.
- BES, M.; GUERIN-FAUBLEE, V.; MEUGNIER, H. et al. Improvement of the identification of staphylococci isolated from bovine mammary infections using molecular methods. *Vet. Microbiol.*, v. 71, n. 3-4, p. 287-394, 2000.
- BLAIOTTA, C.; PENNACCHIA, F.; VILLANI, A. et al. Diversity and dynamics of communities of coagulase-negative staphylococci in traditional fermented sausages. *J. Appl. Microbiol.*, v. 97, n. 2, p. 271, 2004.
- BLOOD, D. C.; RADOSTITS, O. M. Mastite, In: *Clínica Veterinária*. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p. 423-470.
- BRABES, K. C. S.; CARVALHO, E. P.; DIONÍSIO, F. L. et al. Participação de espécies coagulase positivas e negativas produtoras de enterotoxinas do gênero *Staphylococcus* na etiologia dos casos de mamite bovina em propriedades de produção leiteira dos Estados de São Paulo e Minas Gerais. *Rev. Napgama*, v. 2, n. 3, p. 4-11, 1999.
- BRASIL. Instrução Normativa nº 51 de 18 de setembro de 2002. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite Tipo A, do Leite Tipo B, do Leite Tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. *Diário Oficial da União*, Brasília, 18 de setembro de 2002. Disponível em: <[www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br)> Acesso em 05 jan 2008.
- BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; SILVA, M. A. S. et al. Concentração mínima inibitória de dez antimicrobianos para amostras de *S. aureus* isoladas de infecção intramamária bovina. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 53, n. 5, p. 10-17, 2001.



- BRITO, M. A.; BRITO, J. R.; ARCURI, E. et al. Mastite. Política de privacidade 2005-2007. Disponível em: <[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01\\_202\\_2172003924\\_7.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_202_2172003924_7.html)> Acesso em: 08/01/08.
- BUENO, V. F. F.; NICOLAU, E. S.; MESQUITA, A. J. et al. Mastite bovina clínica e subclínica, na região de Pirassununga, SP: frequências e redução na produção. *Cienc. Anim. Bras.*, v. 3, n. 2, p. 47-52, 2002.
- BURRIEL, A. R. Resistance of coagulase-negative staphylococci isolated from sheep to various antimicrobial agents. *Res. Vet. Sci.*, v. 63, n. 2, p. 189-190, 1997.
- BURRIEL, A. R.; SCOTT, M. A comparison of methods used in species identification of coagulase-negative staphylococci isolated from milk of sheep. *Vet. J.*, v. 155, n. 2, p. 183-188, 1998.
- CAPURRO, A.; CONCHA, C.; NILSSON, L. et al. Identification of coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk. *Acta Vet. Scand.*, v. 40, n. 4, p. 315-321, 1999.
- CARRETTO, E.; BARBARINI, D.; COUTO, I. et al. Identification of coagulase-negative staphylococci other than *Staphylococcus epidermidis* by automated ribotyping. *Clin. Microbiol. Infect.*, v. 11, n. 3, p. 177-184, 2005.
- CASSOLI, L. D.; MACHADO, P. F. Impacto da Instrução Normativa 51 na qualidade do leite. In: *Encontro de Pesquisadores em Mamites*, 4, 2007, Botucatu. *Anais...* Botucatu: FMVZ - UNESP, 2007. p. 30-37.
- CARDOSO, M.; SCHWARZ, S. Chloramphenicol resistance plasmids in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. *Vet. Microbiol.* v. 30, n. 2-3, p. 223-232, 1992.
- CASTRO, F. J. C. DE; MOTA, R. A.; SILVA, L. B. G. et al. Utilização de enzimas proteolíticas no tratamento das mastites em cabras leiteiras da região metropolitana do Recife-PE. In: *Encontro de Pesquisadores em Mamites*, 3, 1999, Botucatu. *Anais...* Botucatu: FMVZ - UNESP, 1999a. p. 172.
- CASTRO, F. J. C. DE; MOTA, R. A.; SILVA, L. B. G. et al. Avaliação da eficácia da gentamicina no tratamento das mastites subclínicas caprinas no município de Olinda-PE. In: *Encontro de Pesquisadores em Mamites*, 3, 1999b, Botucatu. *Anais...* Botucatu: FMVZ - UNESP, 1999b. p. 138.
- CERQUEIRA, M. O. P. Contagem bacteriana do leite: como está e como melhorá-la? *Rev. Tec. Bov. Leite*, v. 1, n. 2, 2006.
- CHAFFER, M.; LEITNER, G.; WINKLER, M. et al. Coagulase-negative staphylococci and mammary gland infections in cows. *J. Vet. Med. B.*, v. 46, n. 10, p. 707-712, 1999.
- COSTA, E. O.; COUTINHO, S. D. A.; CASTILHO, W. et al. Etiologia Bacteriana da mamite bovina no estado de São Paulo, Brasil. *Rev. Microbiol.*, v. 17, n. 2, p. 107-112, 1986.
- COSTA, E. O.; BENITES, N. R.; MELVILLE, P. A. et al. Estudo etiológico da mamite clínica bovina. *Rev. Bras. Med. Vet.*, v. 17, n. 4, p. 156-158, 1995.
- COSTA, E. O. Importância da mamite na produção leiteira do Brasil. *Rev. Educ. Contin. CRMV-SP*, v. 1, p. 3-9, 1998.
- COSTA, E. O. Tratamento de Mastite. In: *Encontro de Pesquisadores em Mamites*, 3, 1999, Botucatu. *Anais...* Botucatu: FMVZ - UNESP, 1999. p. 87-101.
- COSTA, E. O.; MOTA, R.; SANTOS, F. G. B. et al. Contagem de células somáticas de amostras de leite de glândulas mamárias de fêmeas bovinas em lactação infectadas por microrganismos dos gêneros *Streptococcus*, *Staphylococcus* e *Corynebacterium*. *Rev. Napgama*, v. 8, n. 2, p. 3-7, 2005.

- COUTO, I.; PEREIRA, S.; MIRAGAIA, M. et al. Identification of clinical staphylococcal isolated from humans by internal transcribed spacer PCR. *J. Clin. Microbiol.* v. 39, n.9, p. 3099-3103, 2001.
- CRUZ, A. S.; LOPES, C. A. M.; MODOLO, J. R. et al. Comparative “*in vitro*” study on the susceptibility and emergence of mutants resistant to danofloxacin among *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *Rev. Microbiol.*, v. 28, p. 61-64, 1997.
- CUNHA, A. P.; SILVA, L. B. G.; PINHEIRO JÚNIOR, J. W. et al. Perfil de sensibilidade antimicrobiana de agentes contagiosos e ambientais isolados de mastite clínica e subclínica de búfalas. *Arq. Inst. Biol.*, v. 73, n. 1, p. 17-21, 2006.
- CUNHA, M. L. R. S.; SINZATO, K. S.; SILVEIRA, L. V. A. Comparison of methods for the identification of coagulase negative staphylococci. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 99, n. 8, p. 855-860, 2004.
- DEINHOFER, M.; PERNTHANER, A. *Staphylococcus spp.* as mastitis-related pathogens in goat milk. *Vet. Microbiol.* v. 43, n. 2-3, p. 161-166, 1995.
- DELLA LIBERA, A. M. M. P.; AZEDO, M. R.; BLAGITZ, M. G. Mastite em pequenos ruminantes. In: *Encontro de Pesquisadores em Mamites*, 4, 2007, Botucatu. *Anais...* Botucatu: FMVZ - UNESP, 2007. p. 64-73.
- DEVRIESE, L. A. Isolation and identification of *Staphylococcus hyicus*. *Am. J. Vet. Res.*, v. 38, n. 6, p. 787-797, 1977.
- DEVRIESE, L. A. Identification of clumping-factor-negative staphylococci isolated from cow udders. *Res. Vet. Sci.*, v. 27, p. 313-320, 1979.
- DOBBINS JR., C. N. Mastitis losses. *J. Am. Vet. Medic. Assoc.*, v. 170, n. 10, p. 1129-1132, part 2, 1977.
- DOMINGUES, P. F. *Produção de leite e mamite bovina subclínica por Staphylococcus aureus, Streptococcus agalactiae e Corynebacterium bovis*, 1993. 39 p. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Produção Animal) – Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP, 1993.
- DÜRR, J. W. Como produzir leite de alta qualidade/ João Walter Dürr – Brasília: SENAR, 2005. 28p.
- EDWARDS, S. J.; JONES, G. W. The distribution and characters of coagulase-negative staphylococci of the bovine udder. *J. Dairy Res.*, v. 33, p. 261-270, 1966.
- EUZÉBY, J. P. List of bacterial names with standing nomenclature: a folder available on the internet. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1997. List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature, v. 47, p. 590-592. Disponível em: <www.bacterio.net> Acesso em: 08 jan 2008.
- FERNANDES J. C. T.; MOOJEN, V.; FERREIRO, L. Agentes etiológicos das mastites bovinas na bacia leiteira de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. *Arq. Fac. Vet., UFRGS*, v. 1, p. 41-46, 1973.
- FERRÃO, S. P. B. Influência de contagem de células somáticas na qualidade do leite. *Bol. Inf. Nutr. Anin. Set.*, 2002. Disponível em: <www.serrana.com.br/NutricaoAnimal/BoletimTecnico/PDF/Setembro2002.pdf ->Acesso: 15 dez 2007.
- FERREIRO, L. Agentes etiológicos e terapêutica da mastite bovina no Brasil. *Rev. Inst. Lat. Candido Tostes.*, set/out, p. 37-41, 1980.
- FERREIRO, L. Mastite bovina: causas e conseqüências na produção e qualidade do leite do gado mestiço da microregião de Juiz de Fora-MG. *Bolm. 3 Cent. Nac. Pesq. Gado de Leite*, Embrapa, Coronel Pacheco, MG, p. 1-8, 1984.

- FERREIRO, L.; SANTOS, E. C.; SILVA, N. Ocorrência e etiologia da mastite bovina na zona da mata do Estado de Minas Gerais. *Arq. Esc. Vet. UFMG*, v. 33, n.1, p. 31-37, 1981.
- FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. *Qualidade do Leite e Controle de Mastite*. São Paulo: Lemos, 2000. 175p.
- FREITAS, M. F. L.; LEAL BALBINO, T. C.; MOTA, R. A. et al. Exotoxinas estafilocócicas. *Cienc. Vet. Trop.*, v. 7, n. 2 - 3, p. 63-74, 2004.
- FREITAS, M. F. L.; PINHEIRO JÚNIOR, J. W.; STAMFORD, T. L. M. et al. Perfil de sensibilidade antimicrobiana in vitro de *Staphylococcus* coagulase positivos isolados de leite de vaca com mamite no Agreste do Estado de Pernambuco. *Arq. Inst. Biol.*, v. 72, n. 2, p. 171-177, 2005.
- HARMON, R. J.; LANGLOIS, B. E. Mastitis due to coagulase-negative *Staphylococcus* species. *Agri-Practice*, v. 10, n. 1, p. 29-34, 1989.
- HARMON, R. J.; LANGLOIS, B. E. Mastitis due to coagulase-negative *Staphylococcus* species. In: *Proc. Natl. Mastitis Counc.* National Mastitis Council, Madison WI, 1995. v. 34, p. 56-64.
- HERNANDES, G. S.; LUCHEIS, S. B. Monitoramento microbiológico da mastite ovina na região de Bauru (SP). In: *Encontro de Pesquisadores em Mamites*, 4, 2007, Botucatu. *Anais...* Botucatu: FMVZ - UNESP, 2007. p. 102.
- HIROOKA, E. Y.; MÜLLER, E. E.; FREITAS, J. C. et al. Enterotoxigenicity of *Staphylococcus intermedius* of canine origin. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 7, n.3, p. 185-191, 1988.
- HOLMBERG, C. *Staphylococcus epidermidis* isolated from bovine milk. *Acta Vet. Scandinavia*, v. 45, p. 141-144, 1973.
- HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A. et al. *Bergeys's Manual of Determinative Bacteriology*. 9 ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 787p.
- HONKAKANEN-BUZALSKI, T.; MYLLYS, V.; PYORALA, S. Bovine clinical mastitis due to coagulase-negative staphylococci and their susceptibility to antimicrobials. *J. Vet. Med. B.* v. 41, p. 344-350, 1994.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Bovine mastitis - definition and guidelines for diagnosis. *Bull. Int. Dairy Fed.*, n. 211, v. 7, 1987.
- IRLINGER, F.; MORVAN, A.; EL SOLH, N. et al. Taxonomic characterization of coagulase-negative staphylococci in ripening flora from traditional french cheeses. *Syst. Appl. Microbiol.*, v. 20, n. 2, p. 319-328, 1997.
- IRLINGER, F. Coagulase negative Staphylococci, *Int. J. Food Microbiol.*, Part VII, 2007. Disponível em: <10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.016.> Acesso em: 10 dez 2007.
- JHALA, V. M. In vitro trials on antibiotic sensitivity of bacteria in milk samples received at gujarat Veterinary College Anand. *Indian Vet. J.*, v. 53, p. 247-251, 1976.
- KLOOS, W. E.; SCHLEIFER, K. H. Genus IV. *Staphylococcus*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986. p. 1013-1035.
- KLOOS, W. E.; BANNERMAN, T. L. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clin. Microbiol.*, v.7, n. 1, p. 117-140, 1994.
- KLOOS, W. E.; BANNERMAN, T. L. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: Murray, P. R., et al. (Eds.). *Manual of Clinical Microbiology*. 6 ed. Washington, D.C., USA: ASM Press, 1999. p. 264-298.

- KNAPP, C. C.; WASHINGTON, J. A. Evaluation of trehalose-mannitol broth for differentiation of *Staphylococcus epidermidis* from other coagulase-negative staphylococcal species. *J. Clin. Microbiol.* v. 27, n. 11, p. 2624, 1989.
- KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M. et al. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, 5 ed., Philadelphia: Lippincott, 1997. 1395p.
- LAEVENS, H.; DELUYKER, H.; DEVRIESE, L. et al. The influence of intramammary infections with *Staphylococcus chromogenes* and *Staphylococcus warneri* or haemolyticus on the somatic cell count in dairy cows. *Epidemiol. sante' anim.* p. 31–32, 1997.
- LAFFRANCHI, A.; MULLER, E. E.; FREITAS, J. C. et al. Etiologia das infecções intramamárias em vacas primíparas ao longo dos primeiros quatro meses de lactação. *Cienc. Rural*, v. 31, n. 6, p. 1027-1032, 2001.
- LAMAITA, H. C.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; CARMO, L. S. et al. *Staphylococcus sp.* counting and detection of staphylococcal enterotoxins and toxic shock toxin syndrome from cooled raw milk. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 57, n. 5, p. 702-709, 2005.
- LANGLOIS, B. E.; HARMON, R. J.; AKERS, K. Identification of *Staphylococcus* species of bovine origin with API Staph-Ident system. *J. Clin. Microbiol.*, v.18, n. 5, p. 1212-1219, 1983.
- LANGONI, H.; PINTO, M. P.; DOMINGUES, P. F. et al. Etiologia e sensibilidade bacteriana da mastite bovina subclínica. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 43, n.6, p. 507-515, 1991.
- LANGONI, H. Complexidade etiológica na mamite bovina. In: *Encontro de Pesquisadores em Mamites*, 3, 1999, Botucatu. *Anais...* Botucatu: FMVZ-UNESP, 1999. p. 154.
- LI, F. C.; CHENG, C. C. Growth and enterotoxins production by coagulase-negative *Staphylococcus* strains, *Staphylococcus warneri* CCRC 12929 and *S. haemolyticus* CCRC 12923 in cow milk and goat milk. *Food-Sci*, v. 24, n. 1, p. 120-128, 1997.
- LIGOZZI, M.; BERNINI, C.; BONORA, M. G. et al. Evaluation of the VITEK 2 system for identification and antimicrobial susceptibility testing of medically relevant gram-positive cocci. *J. Clin. Microbiol.*, v. 40, n. 5, p. 1681-6, 2002.
- LOPES, L. B.; BALSAMÃO, G. M.; SILVA, N. Susceptibilidade aos antimicrobianos apresentada por estafilococos coagulase-negativos em casos de mamite subclínica em bovinos leiteiros da fazenda modelo de Pedro Leopoldo. In: *Encontro de Pesquisadores em Mamites*, 3, 1999, Botucatu. *Anais...* Botucatu: FMVZ-UNESP, 1999. p. 170.
- LÜTHJE, P.; SCHWARZ, S. Antimicrobial resistance of coagulase-negative staphylococci from bovine subclinical mastitis with particular reference to macrolide-lincosamide resistance phenotypes and genotypes. *J. Antimicrob. Chemoth.*, v. 57, n. 5, p. 966-969, 2006.
- MANSUR, P. U.; FOLLY, M. M.; CARLOS, L. A. et al. Avaliação do período de persistência do antibiótico cloxacilina no leite de vacas com mamite subclínica. *Rev. Hig. Aliment.*, v. 17, n. 104/105, p. 106-107, 2003.
- MARTINEAU, F.; PICARD, F. J.; KE, D. et al. Development of a rapid PCR assay specific for *Staphylococcus saprophyticus* and application to direct detection from urine samples. *J. Clin. Microbiol.*, v. 38, n. 9, p. 3280-3284, 2000.
- MASLOW, J. N.; MULLIGAN, M. E.; ARBEIT, R. D. Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. *Clin. Infect. Dis.*, v. 17, n. 2, p. 153-164, 1993.

- MENDONÇA, C. L.; FIORAVANT, M. C. S.; SILVA, J. A. B. A. Etiologia da Mamite Bovina. *Vet. Notic.*, v. 5, n. 1, p. 107-118, 1999.
- MENG, J.; ZHAO, S.; DOYLE, P. et al. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* O157:H7 and O157:NM isolated from animals, food and humans. *J. Food Protec.*, v. 61, n. 11, p. 1511-1514, 1998.
- MONSEN, T.; RÖNNMARK, M.; OLOFSSON, C. et al. An inexpensive and reliable method for routine identification of staphylococcal species. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 17, n. 5, p. 327-335, 1998.
- MORONI, P.; PISONI, G.; ANTONINI, M. et al. Subclinical mastitis and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus caprae* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from two Italian goat herds. *J. Dairy Sci.*, v. 88, n. 5, p. 1694-1704, 2005.
- MOTA, R. A.; CASTRO, F. J. C. DE; OLIVEIRA, A. A. et al. Avaliação *in vitro* da sensibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de mastite subclínica de cabras do estado de Pernambuco-Brasil. In: *Encontro de Pesquisadores em Mamites*, 3, 1999, Botucatu. *Anais...* Botucatu: FMVZ-UNESP, 1999. p.140.
- MOTA, R. A.; PINHEIRO JÚNIOR, J. W.; SILVA, D. R. et al. Etiologia da mastite subclínica em bovinos da bacia leiteira do estado de Pernambuco. *Rev. Napgama*, v. 7, n. 1, p. 10-13, 2004.
- MURDOUGH, P. A.; DEITZ, K. E.; PANDEY, J. W. Effects of freezing on the viability of nine pathogens from quarters with subclinical mastitis. *J. Dairy Sci.*, v. 79, n. 2, p. 334-336, 1996.
- MÜLLER, E. E. Mastite em novilhas. In: *Encontro de Pesquisadores em Mamites*, 3, 1999, Botucatu. *Anais...* Botucatu: FMVZ-UNESP, 1999. p. 79-85.
- MYLLYS, V.; HONKANEN-BUZLADKI, T.; VIRTANEN, H. et al. Effect of abrasion teat orifice epithelium on development of bovine staphylococcal mastitis. *J. Dairy Sci.* v. 77, n. 2, p. 446-452, 1994.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY PERFORMANCE STANDARDS. *Performance Standards for antimicrobial disk susceptibility tests*. Approved Standard M2-A5 NCCLS, Villanova, PA, 2002.
- NICKERSON, S.; OWENS, W. E.; DEROUEN, S. M. Mastitis prevalence in first calf beef heifers and effect on calf weaning weight. *Larg. Anim. Pract.*, v. 21, n. 3, p. 20-23, 2000.
- NICOLAU, E. S.; NADER-FILHO, A.; AMARAL, L. A. et al. Influência da mamite subclínica estafilocócica sobre as características físico-químicas e celulares do leite. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 16, n. 1, p. 35-38, 1996.
- OLIVEIRA, A. M. *Investigação do comportamento de estafilococos enterotoxigênicos coagulase negativos em alimentos*. 1999. 102f. Doutorado em Ciência de Alimentos. Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas.
- OLIVER, S. P.; JARAYAO, B. M. Coagulase negative staphylococcal intramammary infections in cows and heifers during nonlactating and periparturient period. *J. Vet. Med. (series B)* v. 44, n. 6, p. 355-63, 1997.
- PENGOV, A. The role of coagulase-negative *Staphylococcus spp.* and associated somatic cell counts in the ovine mammary gland. *J. Dairy Sci.*, v. 84, n. 3, p. 572-574, 2001.

- PEREIRA, D. I. B.; SALLIS, E. S. V.; SCHAFHAUSER, J. R. et al. Prevalência e etiologia da mastite subclínica bovina no município de Uruguaiana, Rio Grande do Sul. In: *Encontro de Pesquisadores em Mamites*, 3, 1999, Botucatu. *Anais...* Botucatu: FMVZ-UNESP, 1999. p.167.
- PERL, T. M.; RHOMBERG, P. R.; BALE, M. J. et al. Comparison of identification systems for *Staphylococcus epidermidis* and other coagulase-negative *Staphylococcus* species. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 18, n. 3, p. 151-155, 1994.
- PERRETEN, V.; GIAMPA, N.; SCHULERSCHMID, U. et al. Antibiotic resistance genes in coagulase-negative staphylococci isolated from food. *Syst. Appl. Microbiol.*, v. 21, n. 1, p. 113-20, 1998.
- PESSOA, A. L.; LIMA JÚNIOR, A. D.; MOTA, R. A. Estudo do limiar de células somáticas em leite de cabras do estado de Pernambuco. In: *Encontro de Pesquisadores em Mamites*, 3, 1999, Botucatu. *Anais...* Botucatu: FMVZ-UNESP, 1999. p. 154.
- PICCOLOMINI, R.; CATAMO, G.; PICCIANI, C. et al. Evaluation of Staf-System 18 R for identification of Staphylococcal clinical isolates to the species level. *J. Clin. Microbiol.*, v. 32, n. 3, p. 649-653, 1994.
- PINTO, M. R. R.; LADEIRA, S.; CARDOSO, C. M. et al. Mastite bovina: ocorrência de agentes etiológicos e resistência a antimicrobianos. In: *Encontro de Pesquisadores em Mamites*, 3, 1999, Botucatu. *Anais...* Botucatu: FMVZ-UNESP, 1999. p. 160.
- PITKÄLÄ, A.; HAVERI, M.; PYÖRÄLÄ, S. et al. Bovine mastitis in Finland 2001 – prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. *J. Dairy Sci.*, v. 87, n. 8, p. 2433-2441, 2004.
- QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B. et al. *Clinical Veterinary Microbiology*, London: Wolfe, 1994. 648 p.
- RAHMAN, H.; BAXI, K. K. Antibiogram of pathogens isolated from clinical cases of mastitis. *Indian Vet. J.*, v. 60, n. 6, p. 434-437, 1983.
- RAJALA-SCHULZ, P. J.; SMITH, K. L.; HOGAN, J. S. et al. Antimicrobial susceptibility of mastitis pathogens from first lactation and older cows. *Vet. Microbiol.*, v. 102, n. 1-2, p. 33-42, 2004.
- RAPINI, L. S.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; CARMO, L. S. et al. Presença de *Staphylococcus spp.* produtores de enterotoxinas e da toxina da síndrome do choque tóxico em manipuladores de queijo de cabra. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 57, n. 6, p. 825-829, 2005.
- REIS, S. R.; SILVA, N.; BRESCIA, M. V. Antibioticoterapia para controle de mastite subclínica de vacas em lactação. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 55, n. 6, p. 651-658, 2003.
- RIBEIRO, M. E. R.; SCHRAMM, R.; STUMPF, J. R. et al. Agentes causadores de mastite em vacas da raça Jersey, manejadas em estábulo “free-stall”, na região de clima temperado. In: *Encontro de Pesquisadores em Mamites*, 3, 1999, Botucatu. *Anais...* Botucatu: FMVZ-UNESP, 1999. p.133.
- RIBEIRO, M. E. R.; ZANELA, M. B.; GOMES, J. F. et al. Mastite bovina no sul do Rio Grande do Sul. In: *Encontro de Pesquisadores em Mamites*, 4, 2007, Botucatu. *Anais...* Botucatu: FMVZ-UNESP, 2007. p.95.
- ROBERSON, J. R.; FOX, L. K.; HANCOCK, D. D. et al. Prevalence of coagulase-positive staphylococci, other than *Staphylococcus aureus*, in bovine mastitis. *Am. J. Vet. Res.*, v. 57, n. 1, p. 54-58, 1996.

- SAMPIMON, O. C.; VERNOOIJ, J. V.; MEVIUS, D. J. et al. Sensitivity to various antibiotics of coagulase-negative staphylococci isolated from samples of milk from Dutch dairy cattle. *Tijdschr. Diergeneeskd.*, v. 132, n. 6, p. 200-204, 2007.
- SANTOS, C. D. M. *Staphylococcus sp e enterobactérias isoladas de mastite recorrente em oito rebanhos da região de Uberlândia-MG: perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos*. 2006. 69 p. Mestrado em Produção Animal - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia.
- SARGEANT, J. M.; SCOTT, H. M.; LESLIE, K. E. et al. Clinical mastitis in dairy cattle in Ontario: frequency of occurrence in bacteriological isolates. *Can. Vet. Journal*, v. 39, n. 4, p. 240, 1998.
- SCHALM, O. W.; CARROL, B. S.; JAIN, N. C. *Bovine Mastitis*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1971. 360p.
- SCHUKKEN, Y. H.; WILSON, D. J.; WELCOME, F. et al. Monitoring udder health and milk quality using somatic cell count. *Vet. Res.*, v. 34, n. 5, p. 579-596, 2003.
- SEARS, P. H.; MCCARTHY, K. K. Management and treatment of staphylococcal mastitis. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.*, v. 19, n. 1, p. 171-185, 2003.
- SILVA, E. R.; SIQUEIRA, A.; MARTINS, J. et al. Identification and in vitro antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* species isolated from goat mastitis in the Northeast of Brazil. *Small Rumin. Res.*, v. 55, n. 1-3, p. 45-49, 2004.
- SILVA, N. Diagnóstico de mamite em animais de importância econômica. In: *Encontro de Pesquisadores em Mamites*, 3, 1999, Botucatu. *Anais...* Botucatu: FMVZ-UNESP, 1999. p. 51-55.
- SILVA, N.; BRAGA, C. E.; COSTA, G. M. et al. Isolation and antimicrobial susceptibility of bacteria in uterine infections in mares. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 51, n. 3, p. 213-216, 1999.
- SILVA, N. Doença da glândula mamária/Mamite bovina. In: Marques, D. C. *Criação de bovinos*. 7 ed. Belo Horizonte: CVP, 2003. p. 435-451.
- SKOW, A.; MANGOLD, K. A.; TAJUDDIN, M. et al. Species-level identification of staphylococcal isolates by real-time PCR and melt curve analysis. *J. Clin. Microbiol.*, v. 43, n. 6, p. 2876-2880, 2005.
- STOAKES, L; JOHN, M. A.; LANNIGAN, R. et al. Gas liquid chromatography of cellular fatty acids for identification of staphylococci. *J. Clin. Microbiol.*, v. 32, n. 8. p. 1908-1910, 1994.
- TAPONEN, S.; SIMOJOKI, H.; MAARIT, H. et al. Clinical characteristics and persistence of bovine mastitis caused by different species of coagulase-negative staphylococci identified with API or AFLP. *Vet. Microbiol.*, v. 115, n. 1-3, p. 199-207, 2006.
- TENHAGEN, B. A.; KÖSTER, G.; WALLMANN, J. et al. Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. *J. Dairy Sci.*, v. 89, n. 7, p. 2542-2551, 2006.
- THIERS, F. O.; BENITES, N. R.; MELVILLE, P. A. et al. Comparação entre contagem de células somáticas no tanque de resfriamento e porcentagem de mastite subclínica no rebanho. *Rev. Napgama*, v. 5, n. 1, p. 16-19, 2002.
- THORBERG, B. M.; BRÄNDSTRÖM, B. Evaluation of two commercial systems and a new identification scheme based on solid substrates for identifying coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis. *J. Vet. Med.*, v. 47, n. 9, p. 683-691, 2000.

TIMMS, L. L.; SCHULTZ, L. H. Dynamics and significance of coagulase-negative staphylococcal intramammary infections. *J. Dairy Sci.*, v. 70, n. 12, p. 2648-2657, 1987.

TUTEJA, F. C.; KAPUR, M. P.; VINAYAKA, A. K. Studies on bovine subclinical mastitis: Prevalence and microflora. *Indian Vet. J.*, v. 70, n. 9, p. 787-791, 1993.

VALLE, J.; GOMEZ-LUCIA, E.; PIRIZ, S. et al. Enterotoxin production by staphylococci isolated from healthy goats. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 56, n. 5, p. 1323-1326, 1990.

VEIGA, V. M. O. *Diagnóstico da Mastite Bovina*. Juiz de Fora: EMBRAPA-CNPGL-ADT, 1998. EMBRAPA-CNPGL, Circular Técnica, n. 51, 24p.

WATTS, J. L. Etiological agents of bovine mastitis. *Vet. Microbiol.*, v.16, n. 1, p. 41-66, 1988.

WATTS, J. L.; RAY, C. H.; WASHBURN, P. J. A convenient method for differentiation of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mammary glands. *J. Dairy Sci.*, v. 74, n. 2, p. 426-428, 1991.

WAAGE, S.; MØRK, T.; RØROS, A. et al. Bacteria associated with clinical mastitis in dairy heifers. *J. Dairy Sci.*, v. 82, n. 4, p. 712-719, 1999.

ZAFALON, L. F.; AMARAL, L. A. DO; NADER FILHO, A. et al. Influência de bactérias do gênero *Corynebacterium* e estafilococos coagulase positivos e negativos sobre a contagem de células somáticas e a produção láctea de quartos mamários com mastite subclínica. *Rev. Nappama*, n. 6, p. 4-6, 1999.

ZHANG, S.; MADDOX, W. Cytotoxic activity of coagulase-negative staphylococci in bovine mastitis. *Infect. Immun.*, v. 68, n. 3, p. 1102-1108, 2000.