

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ – UEM

**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PRODUÇÃO SUSTENTÁVEL E SAÚDE ANIMAL**



Relatório de Defesa

**PERFIL MICROBIOLÓGICO E DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE
AGENTES CAUSADORES DE MASTITE SUBCLÍNICA BOVINA EM
PROPRIEDADES LEITEIRAS DA REGIÃO OESTE E NOROESTE DO PARANÁ**

KATUANE REGINA DOS SANTOS GABIATO

**UMUARAMA-PR
FEVEREIRO/2022**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ – UEM

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PRODUÇÃO SUSTENTÁVEL E SAÚDE ANIMAL

**PERFIL MICROBIOLÓGICO E DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE
AGENTES CAUSADORES DE MASTITE SUBCLÍNICA BOVINA EM
PROPRIEDADES LEITEIRAS DA REGIÃO OESTE E NOROESTE DO
PARANÁ**

Nível: Mestrado

Área de concentração: Saúde Animal

Autor: Katuane Regina dos Santos Gabiato

Orientador: Prof. Dr. André Marcos Santana

Co-Orientadora: Prof^ª Dr^ª. Sheila Rezier Woisiacki

Relatório de defesa apresentada como parte das exigências ao Programa de Pós-Graduação em Produção Sustentável e Saúde Animal da Universidade Estadual de Maringá para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

**UMUARAMA-PR
FEVEREIRO/2022**

Gabiato, Katuane Regina dos Santos

Perfil microbiológico de agentes causadores de mastites subclínicas e resistência antimicrobiana como um componente para avaliação de protocolos preventivos. Umuarama-Pr/2022.

Orientador: Prof. Dr. André Marcos Santana

Co-Orientadora: Prof^a Dr. Sheila Rezier Woisiacki

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Medicina Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Produção Sustentável e Saúde Animal, 2022.

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

Katuane Regina dos Santos Gabiato

**PERFIL MICROBIOLÓGICO E DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE
AGENTES CAUSADORES DE MASTITE SUBCLÍNICA BOVINA EM
PROPRIEDADES LEITEIRAS DA REGIÃO OESTE E NOROESTE DO
PARANÁ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Sustentável e Saúde Animal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Veterinária pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. André Marcos Santana

Universidade Estadual de Maringá

(Presidente)

Prof. Dr. Antonio Campanha Matinez

Universidade Estadual de Maringá

(Membro)

Prof. Dr. Mauro Henrique Bueno de Camargo

Universidade Estadual de Maringá

(Membro)

Local da defesa: Remota.

DEDICATÓRIA

Ao meu companheiro de vida João
Vinícius, aos meus pais Sonia e Lourival,
à minha irmã Aline e aos que caminham
verdadeiramente comigo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao doce Espírito Santo, por permanecer em mim em todas minhas tentativas de evolução, permitindo-me visualizar meus sonhos de modo eterno, sem permitir desistências desnecessárias.

Agradeço aos meus orientadores neste projeto Prof. Dr. André Marcos Santana e Prof^a Dr^a. Sheila Rezier Woisiacki, que com paciência e sabedoria foram a base para o desenvolvimento da pesquisa.

Agradeço ao meu companheiro de vida João Vinicius pela cumplicidade e paciência durante este período.

Agradeço a Prof^a Dr^a. Daniela Gomes da Silva, pela grande contribuição e orientações oferecidas.

Agradeço ao meu irmão e amigo Adriano Rogério Mendes, por todo conhecimento e exemplo compartilhado. Seus conselhos foram fundamentais.

RESUMO

A mastite bovina destaca-se como uma das principais afecções que acometem os bovinos leiteiros, causando prejuízos diretos e indiretos a indústria e aos produtores. Apesar de apresentar etiologia multifatorial, destaca-se as mastites de origem infecciosa, as quais necessitam de diagnóstico laboratorial para isolamento do agente etiológico. Esta afecção é marcada pelo uso indiscriminado de antibióticos, devido, principalmente, a ausência de diagnóstico adequado e acesso facilitado a estes fármacos pelo produtor. O objetivo desse trabalho foi de avaliar o perfil microbiológico dos agentes causadores de mastites subclínicas e a resistência antimicrobiana relacionada a estes, em 72 propriedades localizadas na região oeste e noroeste do Paraná. Foram avaliados 1066 laudos de cultura e 767 resultados de antibiograma, oriundos de amostras compostas, por animal, de quartos mamários negativos para mastite clínica e positivos em *California Mastitis Test* (CMT). Mediante ao estudo, foi possível observar maior frequência de isolamento microbiológico para *Staphylococcus sp.* e na avaliação geral, incluindo todos microrganismos isolados, foi possível verificar maior percentil de resistência a Sulfametoxazol mais Trimetoprima, apresentando 33,51% de resistência, seguido de 27,90% de resistência a Penicilina G.

Palavras-Chave: Antibiograma, Células somáticas, Qualidade do leite.

ABSTRACT

Bovine mastitis, stands out as a mainly disease occurs in milkin bovine that's cause lot of loss direct and indirectly to the industry and produtors.

Despite having a multifactorial etiology, stands out as matitis infectious origin, whose need a laboratory diagnosis for isolation to the etiological agent. Thats disease is measured by treatment indiscriminate of antibiotic, however, mainly the appropriate diagnosis and easy acess to that drugs by the produtors. The purpose of work is avaliable the microbiological profile of the causative agents subclinical mastitis and the related antimicrobial resistance to these, in seventy two proprieties located in the west and north of the Parana state, as goal to contribute decision makin to the protocol to be used to control and prevent mastitis. One thousand and sixty six report were avaliable and seven hundred sixty seven result of antibiogram, from sample, by animals fourth mammary glands neggative for clinical mastitis and positive for *California Mastitis Test* (CMT). Through the study, was possible note the more frequency microbiological isolation to *Staphylococcus sp.* In the general evaluation, included all the isolated microorganism, was possible verify the highest percentage of the resistance to sulfamethoxazole and trimethoprim present 33,51% resistance, following by the 27,90% resistance of Penicillin G.

Keywords: Antibiogram, Somatic cells, Milk quality.

SUMÁRIO

1 Revisão bibliográfica.....	4
1.1 Classificação da mastite.....	4
1.2 Impacto da mastite na produção.....	5
1.3 Métodos de diagnóstico.....	6
1.4 Controle e prevenção da mastite.....	7
2 Objetivos	8
2.1 Objetivo geral	8
2.2 Objetivo Específico.....	8
3 Materiais e Métodos.....	9
3.1 Propriedades, seleção dos quartos mamários utilizados e coleta das amostras de leite.....	9
3.2 Coleta das amostras de leite.....	12
3.3 Análises Laboratoriais.....	13
3.4 Análise estatística.....	14
4 Resultados.....	15
5 Discussão.....	23
6 Conclusão.....	27
7 Referências bibliográficas.....	28
8 Artigo para publicação.....	32

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Classificação da mastite

A mastite é caracterizada pela inflamação da glândula mamária (AITKEN, 2011), estando entre as principais afecções relacionadas a produção de leite, acarretando em prejuízos principalmente ao produtor e indústria. Trata-se de uma afecção de etiologia multifatorial, que quando possui origem infecciosa, pode ser causada por diferentes espécies de bactérias, fungos, leveduras e algas (LOPES, 2018), que levam ao desencadeamento de um processo inflamatório capazes de atingir a mucosa, tecido secretor e ainda interstício da mama, causando alterações na qualidade e quantidade de leite produzido (GONÇAVELS et al., 2021; LANGONI et al., 1998).

A mastite pode ser classificada quanto a sua manifestação: A mastite clínica é caracterizada por alterações visíveis no leite, ou no leite e no úbere, podendo ser acompanhada de sintomas como dor, calor, rubor, edema e perda de função. Ademais, alterações sistêmicas como taquicardia, inapetência, febre, queda abrupta na produção de leite e apatia podem estar presentes. Já a mastite subclínica é caracterizada pela ausência de alterações sistêmicas ou visíveis no leite ou no úbere, porém nota-se aumento expressivo da contagem de células somáticas (CCS), oriundas do influxo de leucócitos, e em alguns casos alterações químicas na composição do leite (PHILIP, 2003).

As mastites clínicas e subclínicas ainda podem ser classificadas como ambientais e contagiosas, sendo as ambientais causadas por patógenos encontrados nas instalações e demais ambientes de permanência dos animais e as contagiosas na pele e mucosa dos animais (MASSOTE et al., 2019; LANGONI, 2013).

Os agentes contagiosos estão presentes na linha de ordenha, onde são disseminados por meio de tetos infectados, pela mão do ordenhador e equipamento de ordenha, sendo mais frequentemente responsáveis por manifestações da forma subclínica da doença. São listados como agentes contagiosos mais frequentes o *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus spp.*, *Corynebacterium bovis* e *Streptococcus uberis* (LANGONI et al., 2017)

Diferentemente das mastites contagiosas, as mastites ambientais são caracterizadas por agentes infectantes que se encontram habitualmente no ambiente. Entretanto, alguns destes patógenos se adaptaram a glândula mamária e podem apresentar

comportamento contagioso como o *Streptococcus uberis* e a *Klebsiella pneumoniae*. As mastites ambientais são mais frequentemente responsáveis por manifestações da forma clínica da doença, sendo causada principalmente por *Escherichia coli*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Prothoteca spp.*, *Nocardia asteroides* e *Trueperella pyogenes*.(LANGONI et al., 2017)

1.2 Impactos da mastite na produção

De acordo com Pitkalã et al (2003), a mastite subclínica afeta 20 a 50 % do total das vacas em lactação do rebanho, sendo uma das principais causas de prejuízo ao produtor, já que se apresenta de maneira silenciosa. Quando o patógeno invade a glândula mamária, o sistema imune responde enviando células de defesa para o local da infecção, causando a elevação das células somáticas, que são compostas por células do sistema imune e células de descamação da glândula mamária. Este é o principal indicativo de mastite subclínica (COSER et al., 2012). As alterações das mastites sobre a produção de leite estão relacionadas ao nível de lesão no parênquima mamário. A principal causa de redução da produção está relacionada a destruição das células secretoras pelo agente causador da mastite (LANGONI, 2013).

Em uma pesquisa realizada por Lopes et al (2011), com objetivo de quantificar o impacto econômico da contagem de células somáticas no rebanho, observou-se que as despesas com a prevenção da mastite (CCS do tanque, CCS individual, pré e pós dipping, cultura microbiológica e antibiograma, vacinação, terapia de secagem e manutenção do equipamento de ordenha), representaram no máximo 10,8% do impacto econômico. O investimento nas práticas de prevenção demonstra vantagens, já que, irão contribuir com a redução da células somáticas no tanque e como consequência, haverá redução no impacto econômico da mastite.

Mesquita et al (2018), em sua pesquisa avaliando Contagem Bacteriana Total e Contagem de Células Somáticas como indicadores de perda de produção, observou por meio da Contagem de células somáticas do tanque, impacto significativo sobre a perda de volume de leite, estimando-se por meio da equação sugerida pelo National Mastitis Council (NMC) perda média de 8.884 litros de leite anual nas propriedades estudadas.

Coelho et. al. (2012) em seu experimento, ao comparar a produção de queijo prato com matéria prima em diferentes valores de Contagem de Células Somáticas, observou que a quantidade de leite utilizado para produzir 1,0Kg de queijo prato, aumentou em 1,2 litros de leite quando elevou-se a CCS da matéria prima de 100 para 400 mil células por mL de leite.

Além do impacto sobre o rendimento de produtos derivado do leite na indústria, a presença de agentes causadores de mastites pode indicar um risco a segurança alimentar. Como *Staphylococcus aureus*, frequente causador de intoxicações alimentares (REBOUÇAS, 2016).

1.3 Métodos de diagnóstico

Os quadros de mastites clínicas podem ser diagnosticados na rotina de ordenha diária, por meio da inspeção clínica do animal e do úbere e avaliação do leite por meio do teste da caneca de fundo escuro, que possibilita a visualização da presença de grumos ou mudança de consistência ou coloração (MASSOTE et al, 2019). Já as mastites subclínicas dependem de ferramentas específicas para seu diagnóstico, como *California mastitis test* (CMT) ou análise de CCS individual (DIAS, 2007; MASSOTE et al, 2019).

Para identificação dos agentes causadores de mastites é necessário a realização de cultura microbiológica, desta forma subsequentemente é possível realizar teste de sensibilidade a antimicrobianos e tomar decisões mais assertivas nos casos individuais.. A cultura microbiológica pode ser realizada em laboratórios especializados e também na própria fazenda, por meio de métodos simplificados utilizando meio de culturas prontos que são comercializados juntos a um laboratório portátil, nos quais é possível obter resultados de isolamento em 24 horas (BRITO, 2009).

Para estabelecer uma terapia eficiente, além de diagnosticar o agente causador da mastite, é importante o monitoramento do perfil de sensibilidade e resistência antimicrobiana, visto que o uso inadequado de antimicrobianos é uma das principais causas de resistência a antimicrobianos em animais e humanos (COSTA, 2013). Assim sendo, o diagnóstico do agente causador da mastite subclínica auxilia na tomada de decisão de tratamento ou não do quadro e no protocolo a ser empregado. Dessa forma, pode-se reduzir o número de animais tratados e consequentemente reduzir o resíduo de

antimicrobianos no leite, evitar tratamentos desnecessários e realizar o tratamento com o melhor e mais eficiente fármaco antimicrobiano disponível.

O antibiograma é um teste que possibilita a identificação de padrões de resistência e sensibilidade a antimicrobianos testados. O método mais utilizado baseia-se na difusão do antimicrobiano por meio de discos dispostos no agar contendo o patógeno isolado. Para obtenção de resultados confiáveis, recomenda-se seguir a metodologia padronizada pelo CLSI (Clinical and Laboratory Institute) (BRITO, 2009)

1.4 Controle e prevenção de mastites subclínicas

Segundo Langoni et al. (2017), apesar das mastites subclínicas serem importante causa de destruição de tecido mamário e consequente perda de produção, a terapia desses quadros durante a lactação apresentam barreiras de alto impacto na decisão de terapia, principalmente devido a baixa resposta a terapia e descarte do leite, afetando diretamente o custo benefício. Reis (2003) não observou diferença significativa entre grupos tratados e não tratados ao realizar antibioticoterapia para tratamento de mastites subclínicas de animais em lactação. Apesar disso, o tratamento da mastite subclínica é preconizado e realizada ao final do período de lactação.

O controle da mastite está relacionado com princípios básicos: redução do desafio, ou seja, diminuição da exposição dos quartos mamários aos patógenos, terapias adequadas e aumento da imunidade da vaca. A redução do desafio, se dá pelo controle higiênico-sanitário, medidas que podem ser empregadas no manejo de ordenha como realização de pré e pós dipping, linha de ordenha, utilização de toalha de papel individual por teto, assim como cuidados entre as ordenhas, principalmente cuidados com a cama (COSER et al, 2012).

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O objetivo deste estudo foi de avaliar o perfil microbiológico dos agentes causadores de mastites subclínicas e a resistência antimicrobiana relacionada a estes, com a finalidade de contribuir com o controle da mastite bovina nas propriedades avaliadas.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar a prevalência das principais bactérias relacionadas a mastite subclínica nos rebanhos estudados.

Avaliar o perfil de susceptibilidade e resistência a drogas antimicrobianas de bactérias isoladas de quadros de mastites subclínicas nos rebanhos estudados.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Propriedades, seleção dos quartos mamários utilizados e coleta das amostras de leite

Esta pesquisa, protocolada sob o CEUA N° 4268070222, foi realizada por meio da análise do banco de dados pertencente a LEICOR – Consultoria Veterinária, localizada no município de Paranaíba-PR, referente as coletas para análise de cultura e antibiograma realizadas no período de julho de 2019 à maio de 2020. As propriedades analisadas estão dispostas na região noroeste e oeste do Paraná (Imagem 1; Imagem 2; imagem 3), assistidas pela empresa de consultoria, vinculada a dois diferentes laticínios, que contratavam a empresa para execução do trabalho de diagnóstico de mastites e orientação técnica aos produtores. Para execução do trabalho, as propriedades eram selecionadas por dois principais fatores: apresentar Contagem de Células Somáticas (CCS) de tanque acima do recomendado pela Instrução Normativa 77 (500.000 Células por mL de leite) e haver aceitação do produtor ou responsável pela unidade produtora para realização do trabalho. O atendimento ocorria de forma gratuita ao produtor, sendo custeado os serviços e análises pelo laticínio contratante.

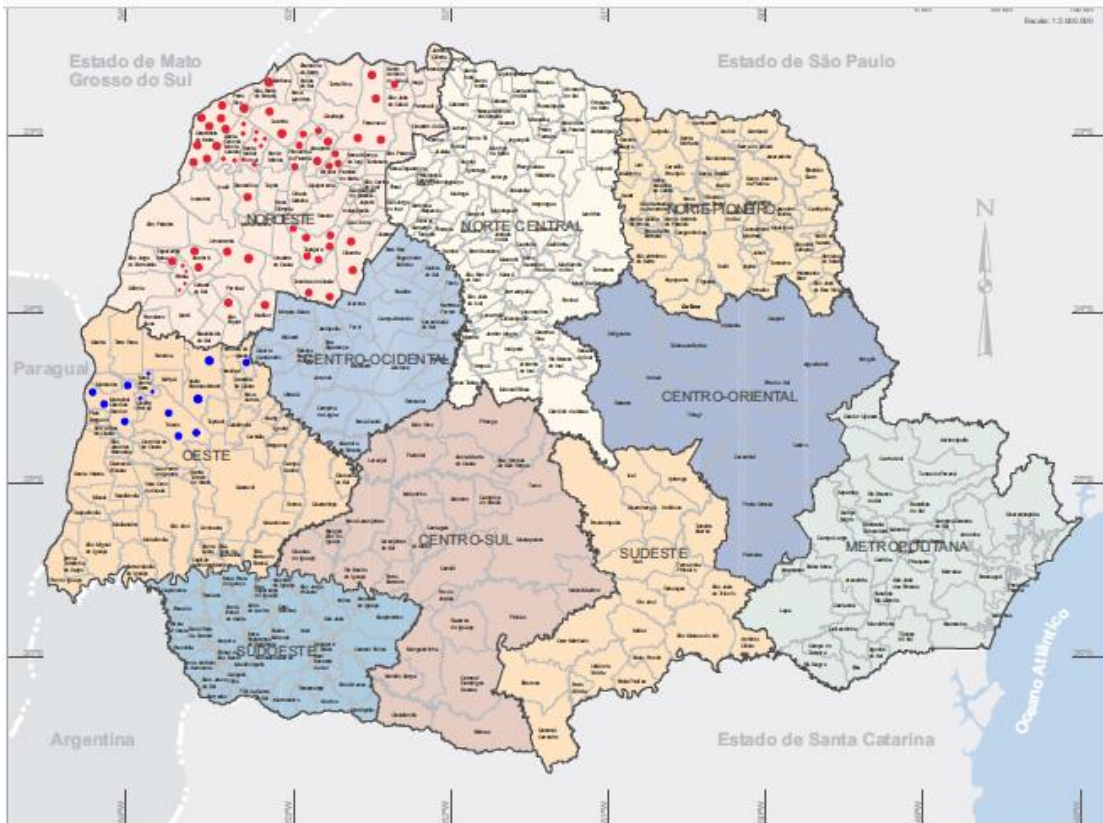


Imagem 1. Mapeamento de distribuição das propriedades por municípios localizados no estado do Paraná- Brasil.

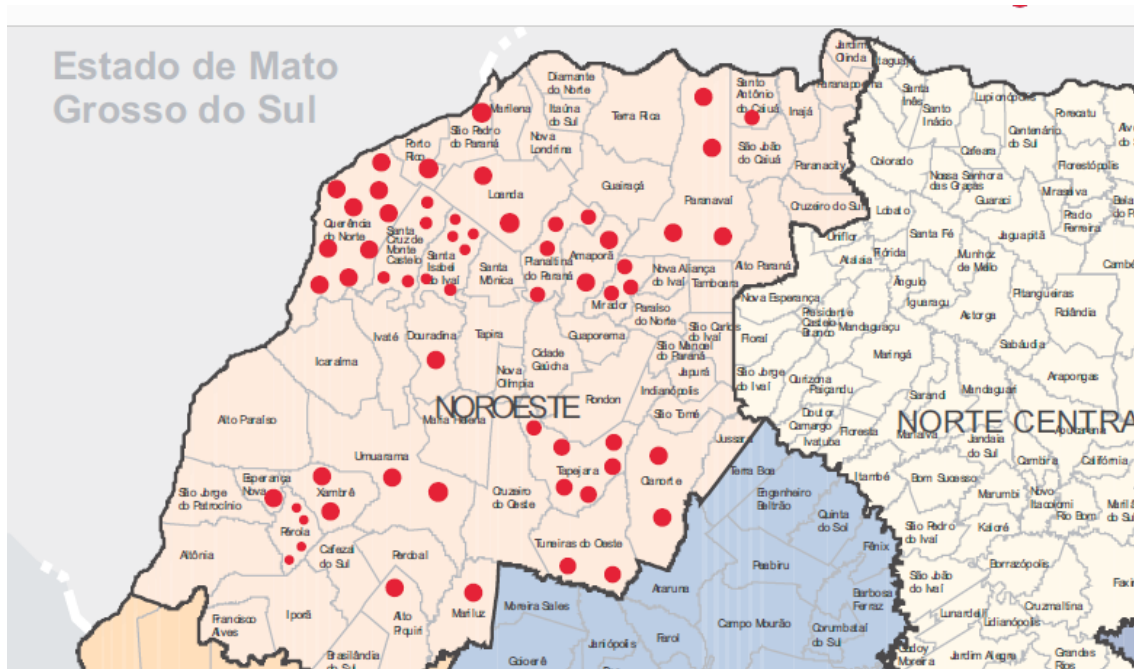


Imagem 2. Mapeamento de distribuição das propriedades por município da região noroeste do Paraná-Brasil.

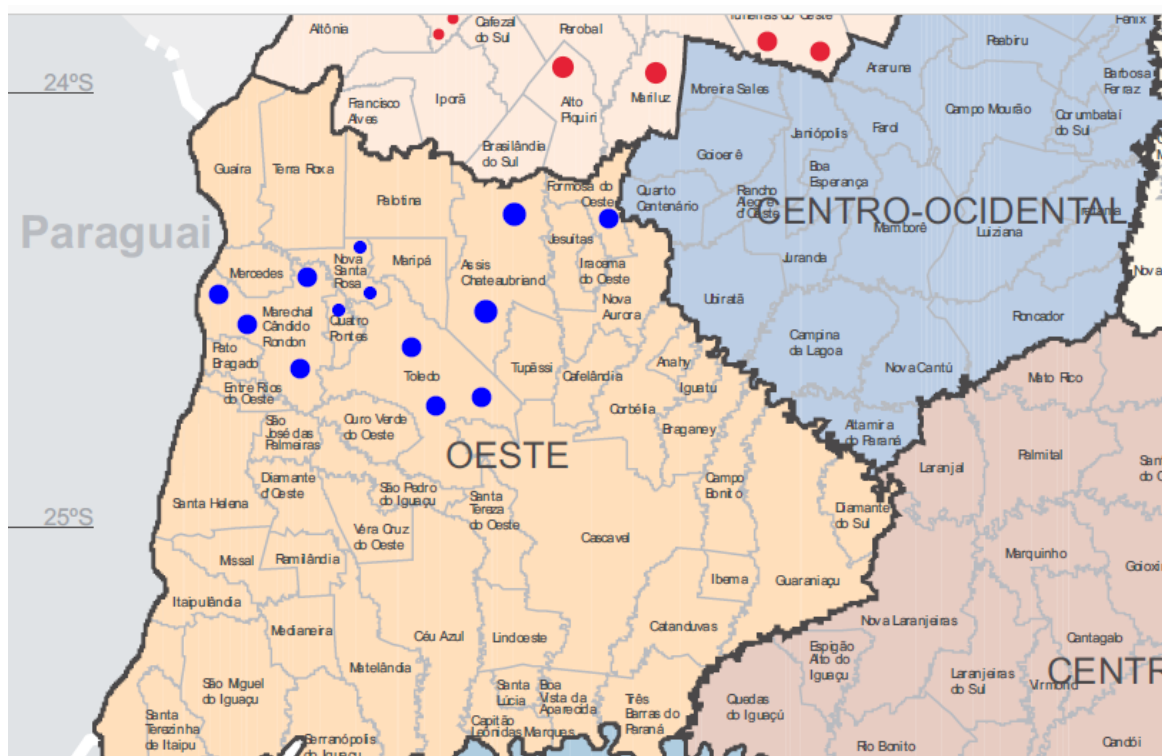


Imagem 3. Mapeamento de distribuição das propriedades por município da região oeste do Paraná-Brasil.

Inicialmente, durante a ordenha, os animais de todas as propriedades foram submetidos a uma triagem, caracterizado pela realização, para cada quarto mamário, do teste da caneca de fundo escuro, seguido do “*California Mastitis Test*” (CMT). Apenas os quartos mamários negativos no teste da caneca de fundo escuro e positivos no CMT foram selecionados para coleta e posterior realização do isolamento bacteriológico.

3.2. Coleta das amostras de leite

Ao apresentar teste da caneca de fundo escuro negativo, seguido do “*California Mastitis Test*” (CMT) positivo, independente do grau, os quartos positivos eram higienizados por meio de pré-dipping, disponível na propriedade, seguido de assepsia

com gaze embebida em álcool 70°. Dez segundos após a assepsia, os quartos positivos eram coletados em coletor estéril de modo asséptico, em amostra composta e identificadas com nome ou número do animal. Em seguida, eram refrigerados em caixa isotérmica por até 2 horas, posteriormente congeladas e encaminhadas ao laboratório, que processava as amostras em até 15 dias.

3.3. Análises Laboratoriais

O exame bacteriológico das amostras de leite composto das vacas foi realizado no Laboratório de análises clínicas localizado no município de Paranavaí- PR.

3.3.1. Cultivo bacteriológico do leite e identificação de bactérias

O leite, colhido de forma asséptica de cada quarto mamário, visando o cultivo bacteriológico e a identificação qualitativa das bactérias, foi semeado em cromoagar. Posteriormente, foi realizado Gram das colônias, seguido de provas bioquímicas para identificação das bactérias gram negativas e para gram positivas, provas de catalase, coagulase, pigmentação, camp test, bile esculina e crescimento em BHI com NaCl.

3.3.2. Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos

As bactérias isoladas foram submetidas ao teste de sensibilidade antimicrobiana em ágar Mueller-Hinton, pelo método de discos de difusão de Kirb-Bauer (BAUER et al., 1966), utilizando-se discos tratados com 15 diferentes antibióticos, sendo eles: ampicilina, azitromicina, cefoxitina, ciprofloxacina, clindamicina, cloranfenicol, eritromicina, gentamicina, linezolida, oxacilina, penicilina G, rifampicina, sulfametoxazol + trimetoprim, tetraciclina e vancomicina.

As bactérias foram semeadas em ágar Mueller-Hinton utilizando suabes estéreis. Após um período de 3 a 5 minutos, os discos contendo antibióticos foram colocados na superfície do ágar, respeitando-se uma distância mínima de 24 mm entre os mesmos. As placas de cultura foram invertidas e colocadas em estufa a 37°C, 15 minutos após a colocação dos discos, e a leitura realizada 16 a 18 horas após a incubação. A interpretação

dos resultados se baseou no diâmetro das zonas de completa inibição, conforme recomendação do NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (2003).

3.4. Análise estatística

O banco de dados gerado a partir das análises foi incluído em planilhas do Excel com os seguintes dados: data, propriedade leiteira ou produtor, nome do animal, resultado da cultura e identificação do patógeno, perfil de resistência encontrada no isolado bacteriano frente a cada antimicrobiano testado e avaliação do antibiótico de resistência encontrado.

Posteriormente, as análises estatísticas foram realizadas mediante cálculo da frequência absoluta e relativa dos patógenos e de seus perfis de resistências a cada antibiótico testado.

4 RESULTADOS

Por meio do levantamento realizado, obteve-se 28,05 % de amostras sem crescimento, seguido de 21,86% amostras positivas para *Staphylococcus spp.* Coagulase positiva, 21,11 % de amostras positivas para *Staphylococcus aureus*, 14,07% para *Streptococcus agalactiae*, 10,69% para *Streptococcus spp.*, 3,28% para Bacilos difteróides e 0,94% de amostras positivas para *Enterococcus faecali* (Tabela 1).

Tabela 1. Frequência absoluta e relativa de agentes bacterianos isolados de amostras de leite provenientes de vacas com mastite subclínica (n=1028 amostras/ n=1066 isolados), coletadas no período entre julho de 2019 e maio de 2020 em propriedades rurais da região Oeste e Noroeste – Pr (Brasil).

Bactérias Isoladas	Número de Isolados	%
Sem Crescimento	299	28,05
<i>Staphylococcus spp.</i> Coagulase +	233	21,86
<i>Staphylococcus aureus</i>	225	21,11
<i>Streptococcus agalactiae</i>	150	14,07
<i>Streptococcus spp.</i>	114	10,69
Bacilos difteróides	35	3,28
<i>Enterococcus faecalis</i>	10	0,94
Total	1066	100

Foi possível verificar a resistência e sensibilidade ou resistência intermediária dos antibióticos testados para os agentes isolados. Observando-se maior índice de resistência geral à Penicilina G

O perfil de sensibilidade aos antimicrobianos foi analisado por agente microbiológico, como podemos observar nas tabelas de 3 a 8. Nas quais, podemos verificar para *Staphylococcus spp.* maior percentual de isolados apresentando resistência a penicilina G (49,79%), para *Staphylococcus aureus* o maior percentual de resistência foi a sulfametoxazol mais trimetoprima (62,67%), *Streptococcus spp.* a sulfametoxazol mais trimetoprima (35,96%), Bacilos difteróides a sulfametoxazol mais trimetoprima

(28,57%) e *Enterococcus faecalis* a sulfametoxazol mais trimetoprima (60,00%) (Tabelas 2 a 8).

Tabela 2. Frequência absoluta e relativa do perfil de sensibilidade a antimicrobianos de microrganismos isolados de amostras de leite provenientes de vacas com mastite subclínica (n=767), coletadas no período entre julho de 2019 e maio de 2020 em propriedades rurais da região Oeste e Noroeste – Pr (Brasil).

Antimicrobiano	Sensível	Intermediário	Resistente
Ampicilina	98,17% (753/767)	-	1,83% (14/767)
Azitromicina	94,26% (723/767)	-	5,74% (44/767)
Cefoxitina	98,04% (752/767)	-	1,96% (15/767)
Ciprofloxacina	97,26% (746/767)	0,91% (7/767)	1,83% (14/767)
Clindamicina	90,61% (695/767)	0,39% (3/767)	9,00% (69/767)
Cloranfenicol	99,09% (760/767)	-	0,91% (7/767)
Eritromicina	92,96% (713/767)	0,39% (3/767)	6,65% (51/767)
Gentamicina	80,83% (620/767)	2,48% (19/767)	16,69% (128/767)
Linezolida	99,61% (764/767)	-	0,39% (3/767)
Oxacilina	92,31% (708/767)	-	7,69% (59/767)
Penicilina G	72,10% (553/767)	-	27,90% (214/767)
Rifampicina	97,78% (750/767)	0,13% (1/767)	2,09% (16/767)
Sulfametoxazol + Trimetoprima	66,23% (508/767)	0,26% (2/767)	33,51% (257/767)
Tetraciclina	86,57% (664/767)	1,83% (14/767)	11,60% (89/767)
Vancomicina	99,61% (764/767)	-	0,39% (3/767)

Tabela 3. Frequência absoluta e relativa do perfil de sensibilidade a antimicrobianos de *Staphylococcus spp.* isolados de amostras de leite provenientes de vacas com mastite subclínica (n=233), coletadas no período entre julho de 2019 e maio de 2020 em propriedades rurais da região Oeste e Noroeste – Pr (Brasil).

Antimicrobiano	Sensível	Intermediário	Resistente
Ampicilina	96,57% (225/233)	-	3,43% (8/233)
Azitromicina	94,85% (221/233)	-	5,15% (12/233)
Cefoxitina	99,14% (231/233)	-	0,86% (2/233)
Ciprofloxacina	97,42% (227/233)	0,43% (1/233)	2,15% (5/233)
Clindamicina	94,42% (220/233)	0,86% (2/233)	4,72% (11/233)
Cloranfenicol	98,28% (229/233)	-	1,72% (4/233)
Eritromicina	94,85% (221/233)	-	5,15% (12/233)
Gentamicina	95,71% (223/233)	0,86% (2/233)	3,43% (8/233)
Linezolida	98,71% (230/233)	-	1,29% (3/233)
Oxacilina	96,14% (224/233)	-	3,86% (9/233)
Penicilina G	50,21% (117/233)	-	49,79% (116/233)
Rifampicina	97,85% (228/233)	-	2,15% (5/233)
Sulfametoxazol + Trim.	75,97% (177/233)	0,43% (1/233)	23,60% (55/233)
Tetraciclina	88,41% (206/233)	0,86% (2/233)	10,73% (25/233)
Vancomicina	99,14% (231/233)	-	0,86% (2/233)

Tabela 4. Frequência absoluta e relativa do perfil de sensibilidade a antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite provenientes de vacas com mastite subclínica (n=22), coletadas no período entre julho de 2019 e maio de 2020 em propriedades rurais da região Oeste e Noroeste – Pr (Brasil).

Antimicrobiano	Sensível	Intermediário	Resistente
Ampicilina	97,75% (217/222)	-	2,25% (5/222)
Azitromicina	96,40% (214/222)	-	3,60% (8/222)
Cefoxitina	98,20% (218/222)	-	1,80% (4/222)
Ciprofloxacina	98,65% (219/222)	0,45% (1/222)	0,90% (2/222)
Clindamicina	93,70% (208/222)	0,45% (1/222)	5,85% (13/222)
Cloranfenicol	99,10% (220/222)	-	0,90% (2/222)
Eritromicina	93,70% (208/222)	1,35% (3/222)	4,95% (11/222)
Gentamicina	95,05% (211/222)	-	4,95% (11/222)
Linezolida	100% (222/222)	-	-
Oxacilina	95,95% (213/222)	-	4,05% (9/222)
Penicilina G	66,67% (148/222)	-	33,33% (74/222)
Rifampicina	99,55% (221/222)	-	0,45% (1/222)
Sulfametoxazol + Trimetoprima	77,03% (171/222)	-	22,97% (51/222)
Tetraciclina	88,29% (196/222)	1,35% (3/222)	10,36% (23/222)
Vancomicina	100% (222/222)	-	-

Tabela 5. Frequência absoluta e relativa do perfil de sensibilidade a antimicrobianos de *Streptococcus agalactiae* isolados de amostras de leite provenientes de vacas com mastite subclínica (n=150), coletadas no período entre julho de 2019 e maio de 2020 em propriedades rurais da região Oeste e Noroeste – Pr (Brasil).

Antimicrobiano	Sensível	Intermediário	Resistente
Ampicilina	99,33% (149/150)	-	0,67% (1/150)
Azitromicina	88,67% (133/150)	-	11,33% (17/150)
Cefoxitina	100% (150/150)	-	-
Ciprofloxacina	99,33% (149/150)	0,67% (1/150)	-
Clindamicina	86,0% (129/150)	-	14,0% (21/150)
Cloranfenicol	99,33% (149/150)	-	0,67% (1/150)
Eritromicina	88,0% (132/150)	-	12,0% (18/150)
Gentamicina	44,66% (67/150)	6,67% (10/150)	48,67% (73/150)
Linezolida	100% (150/150)	-	-
Oxacilina	97,33% (146/150)	-	2,67% (4/150)
Penicilina G	96,0% (144/150)	-	4,00% (6/150)
Rifampicina	98,67% (148/150)	-	1,33% (2/150)
Sulfametoxazol + Trimetoprima	37,33% (56/150)	-	62,67% (94/150)
Tetraciclina	78,67% (118/150)	1,33% (2/150)	20,0% (30/150)
Vancomicina	100% (150/150)	-	-

Tabela 6. Frequência absoluta e relativa do perfil de sensibilidade a antimicrobianos de **Streptococcus spp.** isolados de amostras de leite provenientes de vacas com mastite subclínica (n=114), coletadas no período entre julho de 2019 e maio de 2020 em propriedades rurais da região Oeste e Noroeste – Pr (Brasil).

Antimicrobiano	Sensível	Intermediário	Resistente
Ampicilina	100% (114/114)	-	-
Azitromicina	96,49% (110/114)	-	3,51% (4/114)
Cefoxitina	95,61% (109/114)	-	4,39% (5/114)
Ciprofloxacina	92,98% (106/114)	3,51% (4/114)	3,51% (4/114)
Clindamicina	84,21% (96/114)	-	15,79% (18/114)
Cloranfenicol	100% (114/114)	-	-
Eritromicina	93,86% (107/114)	-	6,14% (7/114)
Gentamicina	65,79% (75/114)	6,14% (7/114)	28,07% (32/114)
Linezolida	100% (114/114)	-	-
Oxacilina	72,81% (83/114)	-	27,19% (31/114)
Penicilina G	89,47% (102/114)	-	10,53% (12/114)
Rifampicina	95,61% (109/114)	0,88% (1/114)	3,51% (4/114)
Sulfametoxazol + Trimetoprima	64,04% (73/114)	-	35,96% (41/114)
Tetraciclina	87,72% (100/114)	5,26% (6/114)	7,02% (8/114)
Vancomicina	99,12% (113/114)	-	0,88% (1/114)

Tabela 7. Frequência absoluta e relativa do perfil de sensibilidade a antimicrobianos de **Bacilos difteróides** isolados de amostras de leite provenientes de vacas com mastite subclínica (n=35), coletadas no período entre julho de 2019 e maio de 2020 em propriedades rurais da região Oeste e Noroeste – Pr (Brasil).

Antimicrobiano	Sensível	Intermediário	Resistente
Ampicilina	100% (35/35)	-	-
Azitromicina	94,29% (33/35)	-	5,71% (2/35)
Cefoxitina	94,29% (33/35)	-	5,71% (2/35)
Ciprofloxacina	97,14% (34/35)	-	2,86% (1/35)
Clindamicina	88,57% (31/35)	-	11,43% (4/35)
Cloranfenicol	100% (35/35)	-	-
Eritromicina	94,29% (33/35)	-	5,71% (2/35)
Gentamicina	97,14% (34/35)	-	2,86% (1/35)
Linezolida	100% (35/35)	-	-
Oxacilina	94,29% (33/35)	-	5,71% (2/35)
Penicilina G	88,57% (31/35)	-	11,43% (4/35)
Rifampicina	94,29% (33/35)	-	5,71% (2/35)
Sulfametoxazol + Trimetoprima	68,57% (24/35)	2,86% (1/35)	28,57% (10/35)
Tetraciclina	97,14% (34/35)	-	2,86% (1/35)
Vancomicina	100% (35/35)	-	-

Tabela 8. Frequência absoluta e relativa do perfil de sensibilidade a antimicrobianos de *Enterococcus faecalis* isolados de amostras de leite provenientes de vacas com mastite subclínica (n=10), coletadas no período entre julho de 2019 e maio de 2020 em propriedades rurais da região Oeste e Noroeste – Pr (Brasil).

Antimicrobiano	Sensível	Intermediário	Resistente
Ampicilina	100% (10/10)	-	-
Azitromicina	100% (10/10)	-	-
Cefoxitina	80,0% (8/10)	-	20,0% (2/10)
Ciprofloxacina	80,0% (8/10)	-	20,0% (2/10)
Clindamicina	90,0% (9/10)	-	10,0% (1/10)
Cloranfenicol	100% (10/10)	-	-
Eritromicina	100% (10/10)	-	-
Gentamicina	70,0% (7/10)	-	30,0% (3/10)
Linezolida	100% (10/10)	-	-
Oxacilina	60,0% (6/10)	-	40,0% (4/10)
Penicilina G	80,0% (8/10)	-	20,0% (2/10)
Rifampicina	80,0% (8/10)	-	20,0% (2/10)
Sulfametoxazol + Trimetoprima	40,0% (4/10)	-	60,0% (6/10)
Tetraciclina	80,0% (8/10)	10,0% (1/10)	10,0% (1/10)
Vancomicina	100% (10/10)	-	-

5 DISCUSSÃO

Staphylococcus aureus é considerado o agente de maior importância para mastites, devido a sua alta contagiosidade, capacidade de colonizar o epitélio do teto e fixar células epiteliais da mama. O descarte de vacas repetidoras de mastites é uma das estratégias de controle e redução desse agente. O leite contaminado pode apresentar enterotoxinas termoestáveis, causadoras de distúrbios alimentares (MARTINS et al., 2010). Saeki (2011) obteve em seu estudo alta taxa de sensibilidade aos antibióticos testados, obtendo 100% de sensibilidade para gentamicina, cefalexina e ciprofloxacina, seguido de 94,6% para norfloxacina. Neste estudo foi possível observar 66,67% de sensibilidade de *Staphylococcus aureus* a penicilina G, 98,05% de sensibilidade a gentamicina, 77,03%

de sensibilidade a Sulfametoxazol + trimetoprima e 88,29% a tetraciclina. Em um levantamento realizado por Paiva (2009), observou-se que quando realiza-se apenas uma amostragem, reduz-se as chances de isolamento do agente presente. Como observado por Sears et al. (1990) que verificou 74,5% de probabilidade de uma única amostra permitir o isolamento de *Staphylococcus aureus*, devido ao padrão cíclico de eliminação deste patógeno no leite. Estes dados permitem compreender uma possível contribuição no número de amostras sem crescimento oriundas de animais acometidos por *Staphylococcus aureus*, mas submetidos apenas a uma coleta, como no presente estudo. Visto a importância de isolamento deste patógeno para o controle da mastite no rebanho, e considerando que neste estudo obteve-se uma taxa de 28,05% de amostras sem crescimento, observa-se a necessidade de realização de mais de uma amostragem, já que a adoção deste procedimento pode melhorar o sucesso de identificação microbiológica.

Bexiga et al (2011), em seu estudo, ao comparar a taxa de isolamento de microrganismos oriundos de amostras duplicadas congeladas e não congeladas, não observou diferença significativa. Apesar do congelamento não atribuir melhoria na taxa de isolamento microbiológico, o congelamento não representa redução do isolamento quando nos referimos a mastites subclínicas. Visto isto, podemos observar que o congelamento não é uma estratégia para reduzir o número de amostras sem crescimento, mas não se trata de um grande obstáculo quando o congelamento torna-se necessário.

Já *Staphylococcus spp.* apresenta menor patogenicidade, porém causam infecções persistentes com aumento de células somáticas (CSS) e diminuição na produção de leite. É frequentemente encontrada no início da lactação (KUROSAWA et al., 2020). As cepas resistentes podem ser transmitidas aos seres humanos por meio da ingestão de produtos oriundos do leite contaminado, além de que, quando os animais estão em tratamento, o resíduo antimicrobiano presente no leite, caso seja consumido, pode causar reações de hipersensibilidade em humanos (Zanette et al., 2010). Em trabalho realizado por Kurosawa et al (2020), ao realizar o antibiograma em 29 amostras de *Staphylococcus spp.*, observaram que a maior porcentagem de resistência bacteriana foi à penicilina (34,5%). Esta porcentagem elevada é observada na maioria dos trabalhos realizados com betalactâmicos, sendo que um dos motivos para justificar este dado é a capacidade de produção de betalactamases pelo microrganismo. A gentamicina se apresentou com alta porcentagem de sensibilidade (96,5%) a oxacilina, 79,3% e as tetraciclina 86,2%. No

presente estudo, nas amostras positivas para *Staphylococcus sp.* observou-se um cenário diferente do encontrado por Kurosawa et al (2020), já que apenas 10,53% das amostras foram resistentes a penicilina e apresentou sensibilidade a gentamicina em 65,79% das amostras. 100% das amostras apresentaram sensibilidade a amoxicilina.

Streptococcus agalactiae é altamente contagioso e dependente dos animais infectados para realizar disseminação para o rebanho, pois não sobrevivem por longos períodos no ambiente. Se manifesta, na maioria dos casos, de forma subclínica (CUNHA et al., 2006). O tratamento através do uso de extrato alcoólico de própolis a 30% apresentou resultados satisfatórios, acima de 90%, semelhantes aos microbianos comumente utilizados (SAEKI et al., 2011). No Brasil, cerca de 44,5% das amostras de leite de tanques de expansão contém esse agente. Este patógeno apresenta boas taxas de cura, entretanto neste estudo apenas 37,33% das amostras apresentaram sensibilidade para Sulfametoxazol + trimetoprima e 44,66% de sensibilidade a gentamicina. Este resultado indica a importância da informação do antibiograma na escolha do antibiótico utilizado para tratamento das mastites bacterianas. A terapia de mastites subclínicas tem se mostrado economicamente mais viável no fim da lactação, exceto nos casos de *Streptococcus agalactiae*, que apresenta viabilidade de terapia em lactação (CARVALHO et al, 2021).

Ademais, a escolha da molécula mais sensível e com melhor atuação na glândula mamária, é importante destacar que apesar da terapia de secagem ter se mostrado como uma ferramenta financeiramente viável para controle e prevenção dos quadros de mastite no período seco e no início da lactação seguinte, esta prática pode provocar resistência bacteriana na microbiota dos animais tratados e conseqüentemente representa um risco para saúde pública, já que estes microrganismos podem chegar aos consumidores de produtos de origem animal. Mediante a este risco, a terapia seletiva de secagem, tornou-se uma possível alternativa para redução na utilização de antimicrobianos. Esta prática consiste em realizar infusão de antimicrobianos intramamário apenas quando há Contagem de células somáticas no quarto mamário acima de duzentos mil células por mL de leite ou cultura positiva (WEBSTER, 2020; CARVALHO et al., 2021). Visto a preocupação a nível mundial em realizar o controle e redução da resistência a antimicrobianos, o controle da mastite pode ser realizado em redução do uso dessas

moléculas, quando a resistência do hospedeiro é elevada, a chance de contato do patógeno com hospedeiro é reduzida e

Bacilos difteroides, representam neste estudo *Corynebacterium bovis*, pertencente à família dos *Actinomycetales*. Considerado agente infeccioso por vários autores, relacionado a diminuição da produção de leite e encontrado com elevada frequência em quadros de mastite subclínica. É muito encontrado associado a outros microrganismos e em mastites subclínicas crônicas. Apesar de apresentar baixa patogenicidade, tem alto grau de contágio (LANGONI et al., 2017).

O *Streptococcus uberis* é um patógeno altamente infeccioso e geralmente associado aos quadros clínicos e subclínicos da mastite, podendo ser encontrado no solo, cama, epiderme ou úbere dos animais, e portanto também se caracteriza por transmissão contagiosa (ABUREEMA et al., 2014). É capaz de adentrar na glândula mamária e gerar um processo inflamatório, sendo também classificado como microrganismo oportunista (SCHUKKEN et al., 2014). Poutrel (2018), em um estudo realizado na França com isolados de *Streptococcus uberis*, observou alta suscetibilidade aos betalactâmicos, com exceção à cloxacilina, no qual 32,5% das amostras foram resistentes. Gentamicina e Tilosina também apresentaram baixa sensibilidade. No presente estudo a oxacilina prediz a sensibilidade a cloxacilina, que obteve 94,29% de sensibilidade, ou seja, apenas 5,71% dos isolados se apresentaram resistentes a este patógeno. Este comparativo, indica a necessidade de realização de estudo em cada unidade produtora, já que não é possível extrapolar resultados de antibiograma para isolados de *Streptococcus Uberis*, assim como para outros agentes causadores de mastites.

Notabiliza-se que apesar do possível monitoramento do perfil de sensibilidade por meio da realização dos antibiogramas, nem sempre as moléculas que apresentam sensibilidade resultam em cura microbiológica, já que outros fatores como difusão do antimicrobiano na glândula mamária, alteração de pH, idade do animal e características do agente, são capazes de interferir no processo de cura (RIBEIRO, 2008; LANGONI et al., 2017). Apesar da sensibilidade observada in vitro não ser totalmente correspondente in vivo, vale ressaltar que bactérias que apresentarem resistência in vitro, também apresentarão resistência in vivo (PAIVA, 2009), portanto a realização do antibiograma é uma estratégia para exclusão de drogas que apresentariam pouca ou nenhuma efetividade se utilizada em casos onde há resistência da mesma.

Como observado nas tabelas 2 a 8, alguns antimicrobianos presentes neste estudo, não possuem apresentação para bovinos, mas estes compõem o padrão utilizado de rotina no laboratório utilizado para processamento das amostras. Esta informação aponta índices de resistência a drogas eventualmente utilizadas em humanos, em patógenos isolados que podem ter origem do ambiente e/ou animais. isso seria interessante discutir

6 CONCLUSÃO

A mastite subclínica é um dos desafios encontrados na pecuária leiteira. A necessidade do uso reduzido de antimicrobianos, assim como a necessidade de elevar a taxa de cura e reduzir os casos de mastites subclínicas e suas consequências, indicam a necessidade da realização de cultura microbiológica e antibiograma individualmente, visto que mediante aos estudos já realizados há diferentes resultados de resistência a antimicrobianos para os mesmos patógenos. A presença marcante de *Staphylococcus aureus*, assim como a taxa significativa de amostras sem crescimento, indicam a importância da realização de cultura seriada para os casos de primeira cultura negativa. Estudos como este, indicam a necessidade de realização de pesquisas acerca de agentes etiológicos causadores de mastites subclínicas regionalmente, com objetivo de compreender a epidemiologia da doença em cada região e como os diversos fatores podem influenciar na manutenção da doença.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUREEMA, S.; SMOOKER, P.; MALMO, J., & DEIGHTON, M. Molecular epidemiology of recurrent clinical mastitis due to *Streptococcus uberis*: evidence of both an environmental source and recurring infection with the same strain. *Journal Of Dairy Science*, v. 97, n. 1, p. 285-290, jan. 2014. **American Dairy Science Association**. <DOI: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2013-7074>. Acesso em: 08 fev 2022.

AITKEN, S. L.; CORL, C. M.; SORDILLO, L. M. Immunopathology of mastitis: insights into disease recognition and resolution. **Journal of mammary gland biology and neoplasia**, v. 16, n. 4, p. 291-304, 2011. <DOI: 10.1007/s10911-011-9230-4.

BARROS, J. P. N.; LOPES, L. V.; LIMA, D. M.; ESTEVAM, I. P.; et al. Limitações ao uso do antibiograma no tratamento e controle das mastites na rotina das propriedades leiteiras. **Revista Brasileira Medicina Veterinária**. v.35, c.3, p 212-216, jul/set, 2013. Acesso em: 8 fev. 2022.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standard single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493-496, 1966.

BEXIGA, R.; KOSKINEN, M. T.; HOLOPAINEN, J.; CARNEIRO, C, et al. Diagnosis of intramammary infection in samples yielding negative results or minor pathogens in conventional bacterial culturing. **Journal Of Dairy Research**, v. 78, n. 1, p. 49-55, 7 dez. 2010. Cambridge University Press (CUP). <DOI:<http://dx.doi.org/10.1017/s0022029910000725>.

PAIVA, Maria Aparecida Vasconcelos et al. Diagnóstico microbiológico da mastite bovina. **Ciência Animal Brasileira**, 2009.

CARVALHO, A. S. S. et al. Estudo e caracterização de microrganismos causadores de mastite bovina no DF e entorno, sua resistência aos antimicrobianos e os fatores de risco para a ocorrência da doença. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 9, p. 86772-86797, 2021. <DOI: <http://dx.doi.org/10.34117/bjdv7n9-032>.

COELHO, Karyne Oliveira et al. Níveis de células somáticas sobre a proteólise do queijo Mussarela. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 13, n. 3, p. 682-693, 2012.

COSER, S. M.; LOPES, M. A.; DE COSTA, G. M. **Mastite bovina: controle e prevenção**. Lavras, MG. Governo do Brasil. 2012, v. 93, p. 1-30. (Governo do Brasil. Boletim técnico, n°93).

COSTA, G. M.; BARROS, R. A.; CUSTÓDIO, D. A. D. C.; PEREIRA, U. D.P. FIGUEIREDO, D.J.; & SILVA, N.D. Resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite em bovinos leiteiros de Minas Gerais, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 80, p. 297-302, 2013.

CUNHA, M. L. R. S.; PERESI, E.; CALSOLARI, R. A. O., & ARAÚJO JÚNIOR, J. P. Detection of enterotoxins genes in coagulase-negative *Staphylococcus* isolated from foods. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 70- 74, 2006. <DOI: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822006000100013>>

DIAS, RV da C. Principais métodos de diagnóstico e controle da mastite bovina. **Acta Veterinária Brasília**, v. 1, n. 1, p. 23-27, 2007.

GERSTNER, D. G.; GUERIOS, E. M. A. Comparativo de eficiência terapêutica entre dois protocolos para secagem de vacas leiteiras. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária FAG**. v. 3, n° 3, jul/dez. 2020.

GONÇALVES, J. L.; CUE, R. I.; NETTO, E. P. L.; GAMEIRO, A. H., & SANTOS, M. V. Herd-level associations between somatic cell counts and economic performance indicators in Brazilian dairy herds. **Journal Of Dairy Science**, v. 104, n. 2, p. 1855-1863, fev. 2021. **American Dairy Science Association**.<DOI: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2019-17834>>

KLAAS, I. C.; ZADOKS, R. N. An update on environmental mastitis: Challenging perceptions. **Transboundary and emerging diseases**, v. 65, p. 166-185, 2018.

KUROSAWA, L. S.; CÉZAR, L. M. L.; MARQUES, F. A.; ORIANI, M. R. de G., & ARAOJO, M. E. M. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus* spp. associados a mastite bovina. **Pubvet**, v. 14, n. 5, p. 1-6, maio. 2020. Editora MV Valero. <DOI: <http://dx.doi.org/10.31533/pubvet.v14n5a563.1-6>>

LANGONI, H.; SALINA, A.; OLIVEIRA, G. C. O.; JUNQUEIRA, N. B., & JOAQUIM, S. F. Considerações sobre o tratamento das mastites. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 11, p. 1261-1269, nov. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1590/s0100-736x2017001100011>.

LANGONI, H.; SILVA, A.D.; CABRAL, K. G. & DOMINGUES, P. F. Aspectos etiológicos na mastite bovina: flora bacteriana aeróbica. **Revista Brasileira Medicina Veterinária**, v. 20, n. 5, p. 204-209, 1998.

LANGONI H. Qualidade do leite: utopia sem um programa sério de monitoramento da ocorrência de mastite bovina. **Pesquisa. Veterinária. Brasileira**. 33: 620-626. 2013. Disponível em <<https://www.scielo.br/pdf/pvb/v33n5/12.pdf>>.

LANGONI H. et al. Considerações sobre o tratamento de mastite. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 2017. <DOI: 10.1590/S0100-736X2017001100011.

LOPES, M.A.; DEMEU, F.A; COSTA, G.M. da; ROCHA, C.M.B.M. da; et al. A influência da contagem de células somáticas sobre o impacto econômico da mastite em rebanhos bovinos leiteiros. **Arquivos do Instituto Biológico**. v. 78, n. 4, p. 493-499, dez. 2011. <DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1808-1657v78p4932011>.

LOPES, B. C.; MANZI, M. P.; LANGONI, H. Etiologia das mastites: pesquisa de microorganismos da classe Mollicutes. **Veterinária e Zootecnia**, v 25, n 1, p. 173-179, 2018. <DOI: <https://doi.org/10.35172/rvz.2018.v25.41>.

MANZI, M. P.; JOAQUIM S. F.; GUIMARÃES, F.F.; BRUDER-NASCIMENTO, A. C.; PANTOJA, J. C. & LANGONI, H. Prevalência de Mycoplasma bovis em rebanhos de vacas leiteiras. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 4, p. 665-669, 2018. <DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-5192>.

MARTINS, L.; BARCELOS, M.M.; CUE, R.I, ANDERSON, K. L. DOS SANTOS, M.V & GONÇALVES, J. L. Chronic subclinical mastitis reduces milk and components yield at the cow level. **Journal of Dairy Research**, v.87, n.3, p.298-305, 2020. <DOI: <https://doi.org/10.1017/S0022029920000321>. Acesso em: 08 fev 2022.

MASSOTE, V.P.; ZANATELI, B.M.; ALVES, G.V.; GOLÇALVES, E.S., e GUEDES, E. **Diagnóstico e controle de mastite bovina**. **Revista Agroveterinária do Sul de Minas**, v. 1, n. 1, p. 1-14, 2019. Acesso em: 08 fev 2022.

MESQUITA, A. A.; BORGES, J.; PINTO, S. M.; LUGLI, F. F.; et al. Contagem bacteriana total e contagem de células somáticas como indicadores de perdas de produção de leite. **Pubvet**. v. 12, n. 6, p. 1-8, jun. 2018. <DOI: <http://dx.doi.org/10.22256/pubvet.v12n6a119.1-8>. Acesso em: 8 fev. 2022.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (UNITED STATES). **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests**. National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003.

PYÔRÃLA, S. Indicators of inflammation in the diagnosis of mastites. **Veterinary Research**, v.34, p.565-578, 2003.

PHILIP M. S., Diagnosis of mastitis for therapy desicion. **Veterinary Clinics**, 2003. <DOI: [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(02\)00074-9](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(02)00074-9).

POUNTREL, B.; BAREILLE, S.; LEQUEUX, G.; & LEBOUUEUF, F. Prevalence of mastitis pathogens in France: Antimicrobial susceptibility of Staphylococcus aureus, Streptococcus uberis and Escherichia coli. **Jornal of Veterinary Science & Technology**, v 9, n 2, 2018. <DOI: : 10.4172/2157-7579.1000522.

REBOUÇAS, Rodolpho Almeida. **Mastite subclínica causada por Staphylococcus aureus: impacto econômico e na saúde pública**. 2016. 42 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Residência) - Programa de Residência em Área Profissional da Saúde - Medicina Veterinária, Sanidade de Ruminantes, Clínica de Bovinos, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Garanhuns, 2016.

RIBEIRO, M.G. **Manual Terapêutica Veterinária**. Princípios terapêuticos na mastite em animais de produção e de companhia. 3. ed. São Paulo: Editora Roca, 2008. p.759-771.

REIS S. R.; SILVA N.; BRESCIA M. V. Antibiotic therapy for subclinical mastitis control of lactating cows. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* v.55 n.6 Belo Horizonte dez. 2003. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352003000600001>

SAEKI, E. K; PEIXOTO, Erika C. T.; MATSUMOTO, L. S.; MARCUSSO, P. F., & MONTEIRO, R. M. Mastite bovina por staphylococcus aureus: sensibilidade às drogas antimicrobianas e ao extrato alcoólico de própolis. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 5, n. 3, p. 284– 290, 2011. <DOI: <http://dx.doi.org/10.21708/avb.2011.5.3.2172>.

SCHUKKEN, Y.H.; BRONZO, V.; LOCATELLI, C.; POLLERA, C.; ROTA, N.; CASULA, A.; TESTA, F.; SCACCABAROZZI, L.; MARCH, R., & ZALDUENDO, D. Efficacy of vaccination on Staphylococcus aureus and coagulase-negative staphylococci intramammary infection dynamics in 2 dairy herds. *Journal Of Dairy Science*, v. 97, n. 8, p. 5250-5264, ago. 2014. **American Dairy Science Association**. <DOI: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2014-8008>.

SEARS, P.M; SMIT, B.S.; ENGLISH, P.B.; HERER, P.S.; et. Al. Shedding pattern of Staphylococcus aureus from bovine intramammary infections. **Journal of Dairy**, v. 73, p. 2785-2789, 1990.

WEBSTER, John. **Understanding the dairy cow**. John Wiley & Sons, 2020.

ZANETTE, E.; SCAPIN, D.; ROSSI, E. Suscetibilidade antimicrobiana de Staphylococcus aureus isolados de amostras de leite de bovinos com suspeita de mastite. **Unoesc & Ciência-ACBS**, v. 1, n. 1, p. 65-70, 2010.

8 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

PERFIL MICROBIOLÓGICO E DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE AGENTES CAUSADORES DE MASTITE SUBCLÍNICA BOVINA EM PROPRIEDADES LEITEIRAS DA REGIÃO OESTE E NOROESTE DO PARANÁ

Microbiological profile and antimicrobial resistance of causing agents of bovine subclinical mastite in dairy properties in the west and northwest region of Paraná

Katuane Regina Dos Santos Gabiato, André Marcos Santana

RESUMO

A mastite bovina destaca-se como uma das principais afecções que acometem os bovinos leiteiros, causando prejuízos diretos e indiretos a indústria e aos produtores. Apesar de apresentar etiologia multifatorial, destaca-se as mastites de origem infecciosa, as quais necessitam de diagnóstico laboratorial para isolamento do agente etiológico. Esta afecção é marcada pelo uso indiscriminado de antibióticos, devido, principalmente, a ausência de diagnóstico adequado e acesso facilitado a estes fármacos pelo produtor. O objetivo desse trabalho foi de avaliar o perfil microbiológico dos agentes causadores de mastites subclínicas e a resistência antimicrobiana relacionada a estes, em 72 propriedades localizadas na região oeste e noroeste do Paraná. Foram avaliados 1066 laudos de cultura e 767 resultados de antibiograma, oriundos de amostras compostas, por animal, de quartos mamários negativos para mastite clínica e positivos em *California Mastitis Test* (CMT). Mediante ao estudo, foi possível observar maior frequência de isolamento microbiológico para *Staphylococcus sp.* e na avaliação geral, incluindo todos microrganismos isolados, foi possível verificar maior percentil de resistência a Sulfametoxazol mais Trimetoprima, apresentando 33,51% de resistência, seguido de 27,90% de resistência a Penicilina G.

Palavras-Chave: Antibiograma, Células somáticas, Qualidade do leite.

ABSTRACT

Bovine mastitis, stands out as a mainly disease occurs in milkin bovine that's cause lot of loss direct and indirectly to the industry and produtors.

Despite having a multifactorial etiology, stands out as matitis infectious origin, whose need a laboratory diagnosis for isolation to the etiological agent. Thats disease is measured by treatment indiscriminate of antibiotic, however, mainly the appropriate diagnosis and easy acess to that drugs by the produtors. The purpose of work is avaliable the microbiological profile of the causative agents subclinical mastitis and the related antimicrobial resistance to these, in seventy two proprieties located in the west and north of the Parana state, as goal to contribute decision makin to the protocol to be used to control and prevent mastitis. One thousand and sixty six report were avaliable and seven hundred sixty seven result of antibiogram, from sample, by animals fourth mammary glands neggative for clinical mastitis and positive for *California Mastitis Test* (CMT). Through the study, was possible note the more frequency microbiological isolation to *Staphylococcus sp.* In the general evaluation, included all the isolated microorganism, was possible verify the highest percentage of the resistance to sulfamethoxazole and trimethoprim present 33,51% resistance, following by the 27,90% resistance of Penicillin G.

Keywords: Antibiogram, Somatic cells, Milk quality.

INTRODUÇÃO

A mastite é caracterizada pela inflamação da glândula mamária (AITKEN, 2011), estando entre as principais afecções relacionadas a produção de leite, acarretando em prejuízos principalmente ao produtor e indústria. Trata-se de uma afecção de etiologia multifatorial, que quando possui origem infecciosa, pode ser causada por diferentes espécies de bactérias, fungos, leveduras e algas (LOPES, 2018), que levam ao desencadeamento de um processo inflamatório capazes de atingir a mucosa, tecido secretor e ainda interstício da mama, causando alterações na qualidade e quantidade de leite produzido (GONÇAVELS et al., 2021; LANGONI et al., 1998).

A mastite pode ser classificada quanto a sua manifestação: A mastite clínica é caracterizada por alterações visíveis no leite, ou no leite e no úbere, podendo ser acompanhada de sintomas como dor, calor, rubor, edema e perda de função. Ademais, alterações sistêmicas como taquicardia, inapetência, febre, queda abrupta na produção de leite e apatia podem estar presentes. Já a mastite subclínica é caracterizada pela ausência de alterações sistêmicas ou visíveis no leite ou no úbere, porém nota-se aumento expressivo da contagem de células somáticas (CCS), oriundas do influxo de leucócitos, e em alguns casos alterações químicas na composição do leite (PHILIP, 2003).

As mastites clínicas e subclínicas ainda podem ser classificadas como ambientais e contagiosas, sendo as ambientais causadas por patógenos encontrados nas instalações e demais ambientes de permanência dos animais e as contagiosas na pele e mucosa dos animais (MASSOTE et al., 2019; LANGONI, 2013).

Os agentes contagiosos estão presentes na linha de ordenha, onde são disseminados por meio de tetos infectados, pela mão do ordenhador e equipamento de ordenha, sendo mais frequentemente responsáveis por manifestações da forma subclínica da doença. São listados como agentes contagiosos mais frequentes o *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus spp.*, *Corynebacterium bovis* e *Streptococcus uberis* (LANGONI et al., 2017)

Diferentemente das mastites contagiosas, as mastites ambientais são caracterizadas por agentes infectantes que se encontram habitualmente no ambiente.

Entretanto, alguns destes patógenos se adaptaram a glândula mamária e podem apresentar comportamento contagioso como o *Streptococcus uberis* e a *Klebsiella pneumoniae*. As mastites ambientais são mais frequentemente responsáveis por manifestações da forma clínica da doença, sendo causada principalmente por *Escherichia coli*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Prothoteca spp.*, *Nocardia asteroides* e *Trueperella pyogenes*.(LANGONI et al., 2017)

De acordo com Pitkalã et al (2003), a mastite subclínica afeta 20 a 50 % do total das vacas em lactação do rebanho, sendo uma das principais causas de prejuízo ao produtor, já que se apresenta de maneira silenciosa. Quando o patógeno invade a glândula mamária, o sistema imune responde enviando células de defesa para o local da infecção, causando a elevação das células somáticas, que são compostas por células do sistema imune e células de descamação da glândula mamária. Este é o principal indicativo de mastite subclínica (COSER et al., 2012). As alterações das mastites sobre a produção de leite estão relacionadas ao nível de lesão no parênquima mamário. A principal causa de redução da produção está relacionada a destruição das células secretoras pelo agente causador da mastite (LANGONI, 2013).

Em uma pesquisa realizada por Lopes et al (2011), com objetivo de quantificar o impacto econômico da contagem de células somáticas no rebanho, observou-se que as despesas com a prevenção da mastite (CCS do tanque, CCS individual, pré e pós dipping, cultura microbiológica e antibiograma, vacinação, terapia de secagem e manutenção do equipamento de ordenha), representaram no máximo 10,8% do impacto econômico. O investimento nas práticas de prevenção demonstra vantagens, já que, irão contribuir com a redução da células somáticas no tanque e como consequência, haverá redução no impacto econômico da mastite.

Mesquita et al (2018), em sua pesquisa avaliando Contagem Bacteriana Total e Contagem de Células Somáticas como indicadores de perda de produção, observou por meio da Contagem de células somáticas do tanque, impacto significativo sobre a perda de volume de leite, estimando-se por meio da equação sugerida pelo National Mastitis Council (NMC) perda média de 8.884 litros de leite anual nas propriedades estudadas. Coelho et. al. (2012) em seu experimento, ao comparar a produção de queijo prato com matéria prima em diferentes valores de Contagem de Células Somáticas, observou que a

quantidade de leite utilizado para produzir 1,0Kg de queijo prato, aumentou em 1,2 litros de leite quando elevou-se a CCS da matéria prima de 100 para 400 mil células por mL de leite.

Além do impacto sobre o rendimento de produtos derivado do leite na indústria, a presença de agentes causadores de mastites pode indicar um risco a segurança alimentar. Como *Staphylococcus aureus*, frequente causador de intoxicações alimentares (REBOUÇAS, 2016).

Os quadros de mastites clínicas podem ser diagnosticados na rotina de ordenha diária, por meio da inspeção clínica do animal e do úbere e avaliação do leite por meio do teste da caneca de fundo escuro, que possibilita a visualização da presença de grumos ou mudança de consistência ou coloração (MASSOTE et al, 2019). Já as mastites subclínicas dependem de ferramentas específicas para seu diagnóstico, como *California mastitis test* (CMT) ou análise de CCS individual (DIAS, 2007; MASSOTE et al, 2019).

Para identificação dos agentes causadores de mastites é necessário a realização de cultura microbiológica, desta forma subsequentemente é possível realizar teste de sensibilidade a antimicrobianos e tomar decisões mais assertivas nos casos individuais.. A cultura microbiológica pode ser realizada em laboratórios especializados e também na própria fazenda, por meio de métodos simplificados utilizando meio de culturas prontos que são comercializados juntos a um laboratório portátil, nos quais é possível obter resultados de isolamento em 24 horas (BRITO, 2009).

Para estabelecer uma terapia eficiente, além de diagnosticar o agente causador da mastite, é importante o monitoramento do perfil de sensibilidade e resistência antimicrobiana, visto que o uso inadequado de antimicrobianos é uma das principais causas de resistência a antimicrobianos em animais e humanos (COSTA, 2013). Assim sendo, o diagnóstico do agente causador da mastite subclínica auxilia na tomada de decisão de tratamento ou não do quadro e no protocolo a ser empregado. Dessa forma, pode-se reduzir o número de animais tratados e consequentemente reduzir o resíduo de antimicrobianos no leite, evitar tratamentos desnecessários e realizar o tratamento com o melhor e mais eficiente fármaco antimicrobiano disponível.

O antibiograma é um teste que possibilita a identificação de padrões de resistência e sensibilidade a antimicrobianos testados. O método mais utilizado baseia-se na difusão do antimicrobiano por meio de discos dispostos no agar contendo o patógeno isolado.

Para obtenção de resultados confiáveis, recomenda-se seguir a metodologia padronizada pelo CLSI (Clinical and Laboratory Institute) (BRITO, 2009)

Segundo Langoni et al. (2017), apesar das mastites subclínicas serem importante causa de destruição de tecido mamário e consequente perda de produção, a terapia desses quadros durante a lactação apresentam barreiras de alto impacto na decisão de terapia, principalmente devido a baixa resposta a terapia e descarte do leite, afetando diretamente o custo benefício. Reis (2003) não observou diferença significativa entre grupos tratados e não tratados ao realizar antibioticoterapia para tratamento de mastites subclínicas de animais em lactação. Apesar disso, o tratamento da mastite subclínica é preconizado e realizada ao final do período de lactação.

O controle da mastite está relacionado com princípios básicos: redução do desafio, ou seja, diminuição da exposição dos quartos mamários aos patógenos, terapias adequadas e aumento da imunidade da vaca. A redução do desafio, se dá pelo controle higiênico-sanitário, medidas que podem ser empregadas no manejo de ordenha como realização de pré e pós dipping, linha de ordenha, utilização de toalha de papel individual por teto, assim como cuidados entre as ordenhas, principalmente cuidados com a cama (COSER et al, 2012).

O objetivo deste estudo foi de avaliar o perfil microbiológico dos agentes causadores de mastites subclínicas e a resistência antimicrobiana relacionada a estes, com a finalidade de contribuir com o controle da mastite bovina nas propriedades avaliadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa, protocolada sob o CEUA N° 4268070222, foi realizada por meio da análise do banco de dados pertencente a LEICOR – Consultoria Veterinária, localizada no município de Paranaíba-PR, referente as coletas para análise de cultura e antibiograma realizadas no período de julho de 2019 à maio de 2020. As propriedades analisadas estão dispostas na região noroeste e oeste do Paraná (Imagem 1; Imagem 2; imagem 3), assistidas pela empresa de consultoria, vinculada a dois diferentes laticínios, que contratavam a empresa para execução do trabalho de diagnóstico de mastites e orientação técnica aos produtores. Para execução do trabalho, as propriedades eram selecionadas por dois principais fatores: apresentar Contagem de Células Somáticas (CCS) de tanque acima do recomendado pela Instrução Normativa 77 (500.000 Células por mL de leite) e haver aceitação do produtor ou responsável pela unidade produtora para realização do trabalho. O atendimento ocorria de forma gratuita ao produtor, sendo custeado os serviços e análises pelo laticínio contratante.

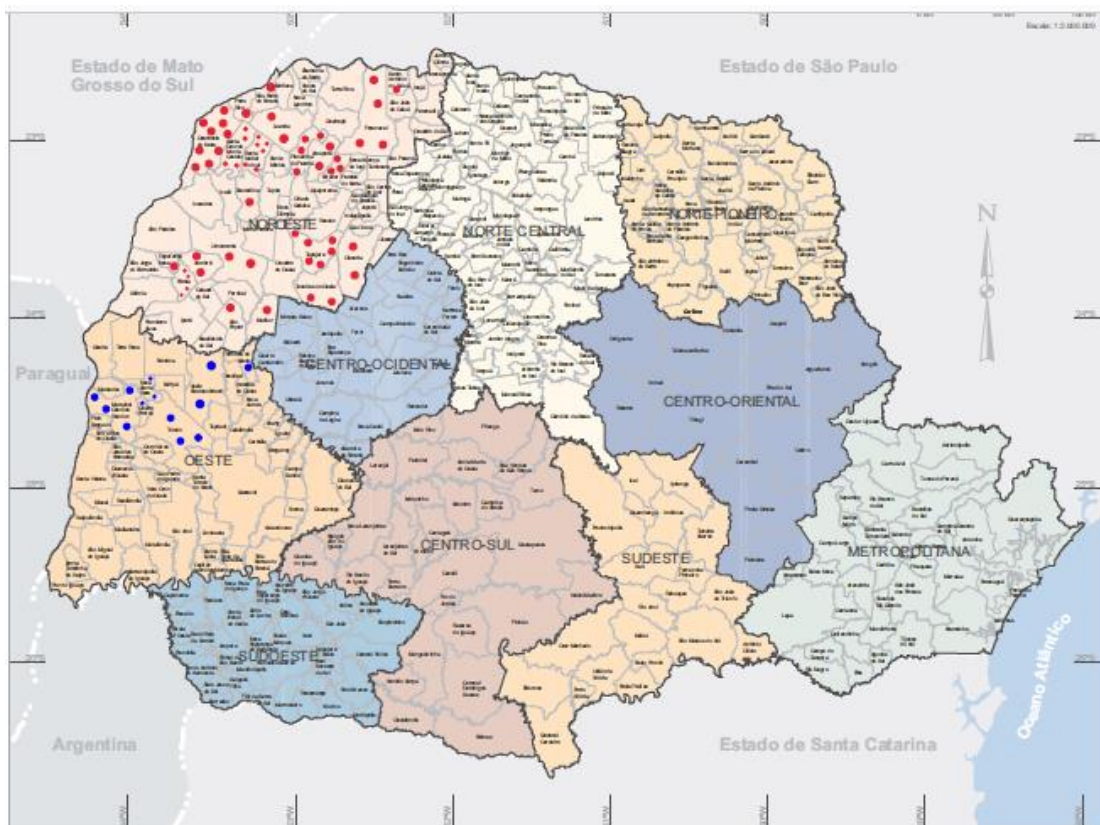


Imagem 1. Mapeamento de distribuição das propriedades por municípios localizados no estado do Paraná- Brasil.

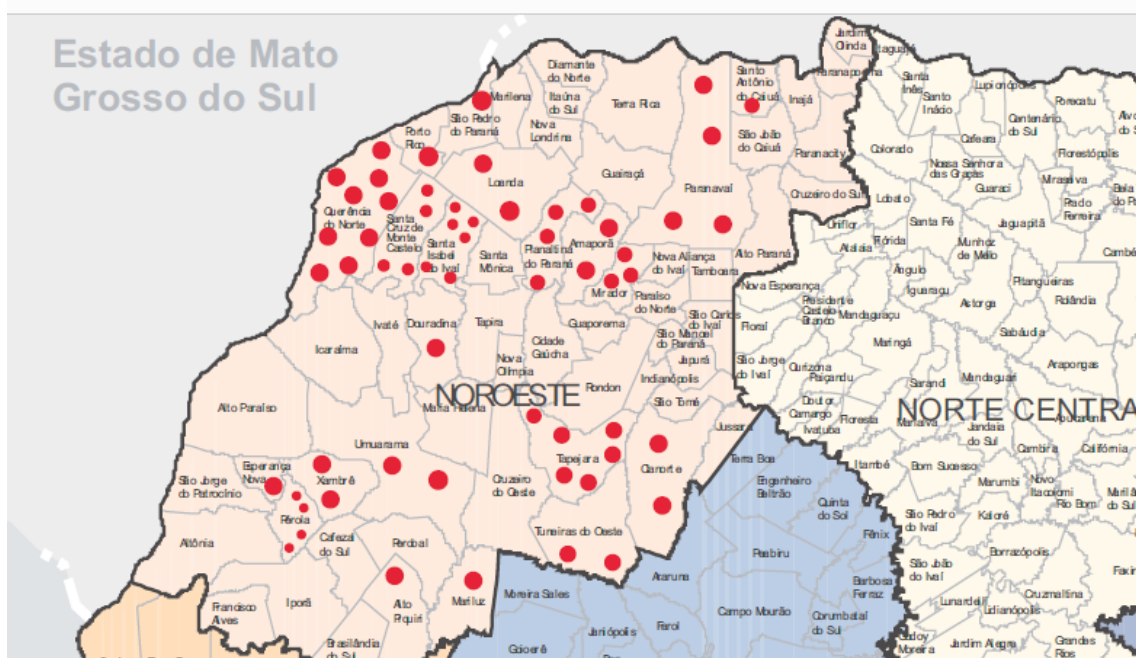


Imagem 2. Mapeamento de distribuição das propriedades por município da região noroeste do Paraná-Brasil.

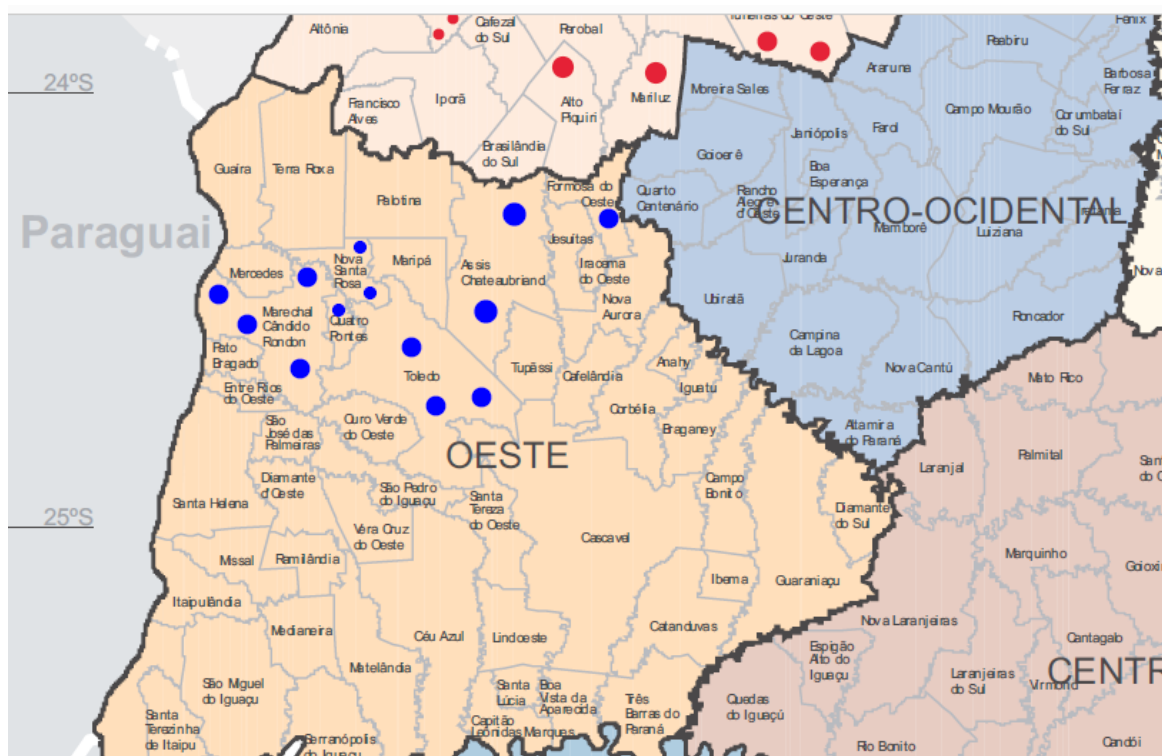


Imagem 3. Mapeamento de distribuição das propriedades por município da região oeste do Paraná-Brasil.

Inicialmente, durante a ordenha, os animais de todas as propriedades foram submetidos a uma triagem, caracterizado pela realização, para cada quarto mamário, do teste da caneca de fundo escuro, seguido do “*California Mastitis Test*” (CMT). Apenas os quartos mamários negativos no teste da caneca de fundo escuro e positivos no CMT foram selecionados para coleta e posterior realização do isolamento bacteriológico.

Ao apresentar teste da caneca de fundo escuro negativo, seguido do “*California Mastitis Test*” (CMT) positivo, independente do grau, os quartos positivos eram higienizados por meio de pré-dipping, disponível na propriedade, seguido de assepsia com gaze embebida em álcool 70°. Dez segundos após a assepsia, os quartos positivos eram coletados em coletor estéril de modo asséptico, em amostra composta e identificadas com nome ou número do animal. Em seguida, eram refrigerados em caixa isotérmica por

até 2 horas, posteriormente congeladas e encaminhadas ao laboratório, que processava as amostras em até 15 dias.

O exame bacteriológico das amostras de leite composto das vacas foi realizado no Laboratório de análises clínicas localizado no município de Paranaíba- PR.

O leite, colhido de forma asséptica de cada quarto mamário, visando o cultivo bacteriológico e a identificação qualitativa das bactérias, foi semeado em cromogagar. Posteriormente, foi realizado Gram das colônias, seguido de provas bioquímicas para identificação das bactérias gram negativas e para gram positivas, provas de catalase, coagulase, pigmentação, camp test, bile esculina e crescimento em BHI com NaCl.

As bactérias isoladas foram submetidas ao teste de sensibilidade antimicrobiana em ágar Mueller-Hinton, pelo método de discos de difusão de Kirb-Bauer (BAUER et al., 1966), utilizando-se discos tratados com 15 diferentes antibióticos, sendo eles: ampicilina, azitromicina, cefoxitina, ciprofloxacina, clindamicina, cloranfenicol, eritromicina, gentamicina, linezolida, oxacilina, penicilina G, rifampicina, sulfametoxazol + trimetoprim, tetraciclina e vancomicina.

As bactérias foram semeadas em ágar Mueller-Hinton utilizando suabes estéreis. Após um período de 3 a 5 minutos, os discos contendo antibióticos foram colocados na superfície do ágar, respeitando-se uma distância mínima de 24 mm entre os mesmos. As placas de cultura foram invertidas e colocadas em estufa a 37°C, 15 minutos após a colocação dos discos, e a leitura realizada 16 a 18 horas após a incubação. A interpretação dos resultados se baseou no diâmetro das zonas de completa inibição, conforme recomendação do NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (2003).

O banco de dados gerado a partir das análises foi incluído em planilhas do Excel com os seguintes dados: data, propriedade leiteira ou produtor, nome do animal, resultado da cultura e identificação do patógeno, perfil de resistência encontrada no isolado bacteriano frente a cada antimicrobiano testado e avaliação do antibiótico de resistência encontrado.

Posteriormente, as análises estatísticas foram realizadas mediante cálculo da frequência absoluta e relativa dos patógenos e de seus perfis de resistências a cada antibiótico testado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Por meio do levantamento realizado, obteve-se 28,05 % de amostras sem crescimento, seguido de 21,86% amostras positivas para *Staphylococcus spp.* Coagulase positiva, 21,11 % de amostras positivas para *Staphylococcus aureus*, 14,07% para *Streptococcus agalactiae*, 10,69% para *Streptococcus spp.*, 3,28% para Bacilos difteróides e 0,94% de amostras positivas para *Enterococcus faecali* (Tabela 1).

Tabela 1. Frequência absoluta e relativa de agentes bacterianos isolados de amostras de leite provenientes de vacas com mastite subclínica (n=1028 amostras/ n=1066 isolados), coletadas no período entre julho de 2019 e maio de 2020 em propriedades rurais da região Oeste e Noroeste – Pr (Brasil).

Bactérias Isoladas	Número de Isolados	%
Sem Crescimento	299	28,05
<i>Staphylococcus spp.</i> Coagulase +	233	21,86
<i>Staphylococcus aureus</i>	225	21,11
<i>Streptococcus agalactiae</i>	150	14,07
<i>Streptococcus spp.</i>	114	10,69
Bacilos difteróides	35	3,28
<i>Enterococcus faecalis</i>	10	0,94
Total	1066	100

Foi possível verificar a resistência e sensibilidade ou resistência intermediária dos antibióticos testados para os agentes isolados. Observando-se maior índice de resistência geral à Penicilina G

O perfil de sensibilidade aos antimicrobianos foi analisado por agente microbiológico, como podemos observar nas tabelas de 3 a 8. Nas quais, podemos verificar para *Staphylococcus spp.* maior percentual de isolados apresentando resistência a penicilina G (49,79%), para *Staphylococcus aureus* o maior percentual de resistência foi a sulfametoxazol mais trimetoprima (62,67%), *Streptococcus spp.* a sulfametoxazol mais trimetoprima (35,96%), Bacilos difteróides a sulfametoxazol mais trimetoprima

(28,57%) e *Enterococcus faecalis* a sulfametoxazol mais trimetoprima (60,00%) (Tabelas 2 a 8).

Tabela 2. Frequência absoluta e relativa do perfil de sensibilidade a antimicrobianos de microrganismos isolados de amostras de leite provenientes de vacas com mastite subclínica (n=767), coletadas no período entre julho de 2019 e maio de 2020 em propriedades rurais da região Oeste e Noroeste – Pr (Brasil).

Antimicrobiano	Sensível	Intermediário	Resistente
Ampicilina	98,17% (753/767)	-	1,83% (14/767)
Azitromicina	94,26% (723/767)	-	5,74% (44/767)
Cefoxitina	98,04% (752/767)	-	1,96% (15/767)
Ciprofloxacina	97,26% (746/767)	0,91% (7/767)	1,83% (14/767)
Clindamicina	90,61% (695/767)	0,39% (3/767)	9,00% (69/767)
Cloranfenicol	99,09% (760/767)	-	0,91% (7/767)
Eritromicina	92,96% (713/767)	0,39% (3/767)	6,65% (51/767)
Gentamicina	80,83% (620/767)	2,48% (19/767)	16,69% (128/767)
Linezolida	99,61% (764/767)	-	0,39% (3/767)
Oxacilina	92,31% (708/767)	-	7,69% (59/767)
Penicilina G	72,10% (553/767)	-	27,90% (214/767)
Rifampicina	97,78% (750/767)	0,13% (1/767)	2,09% (16/767)
Sulfametoxazol + Trimetoprima	66,23% (508/767)	0,26% (2/767)	33,51% (257/767)
Tetraciclina	86,57% (664/767)	1,83% (14/767)	11,60% (89/767)
Vancomicina	99,61% (764/767)	-	0,39% (3/767)

Tabela 3. Frequência absoluta e relativa do perfil de sensibilidade a antimicrobianos de *Staphylococcus spp.* isolados de amostras de leite provenientes de vacas com mastite subclínica (n=233), coletadas no período entre julho de 2019 e maio de 2020 em propriedades rurais da região Oeste e Noroeste – Pr (Brasil).

Antimicrobiano	Sensível	Intermediário	Resistente
Ampicilina	96,57% (225/233)	-	3,43% (8/233)
Azitromicina	94,85% (221/233)	-	5,15% (12/233)
Cefoxitina	99,14% (231/233)	-	0,86% (2/233)
Ciprofloxacina	97,42% (227/233)	0,43% (1/233)	2,15% (5/233)
Clindamicina	94,42% (220/233)	0,86% (2/233)	4,72% (11/233)
Cloranfenicol	98,28% (229/233)	-	1,72% (4/233)
Eritromicina	94,85% (221/233)	-	5,15% (12/233)
Gentamicina	95,71% (223/233)	0,86% (2/233)	3,43% (8/233)
Linezolida	98,71% (230/233)	-	1,29% (3/233)
Oxacilina	96,14% (224/233)	-	3,86% (9/233)
Penicilina G	50,21% (117/233)	-	49,79% (116/233)
Rifampicina	97,85% (228/233)	-	2,15% (5/233)
Sulfametoxazol + Trim.	75,97% (177/233)	0,43% (1/233)	23,60% (55/233)
Tetraciclinas	88,41% (206/233)	0,86% (2/233)	10,73% (25/233)
Vancomicina	99,14% (231/233)	-	0,86% (2/233)

Tabela 4. Frequência absoluta e relativa do perfil de sensibilidade a antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite provenientes de vacas com mastite subclínica (n=22), coletadas no período entre julho de 2019 e maio de 2020 em propriedades rurais da região Oeste e Noroeste – Pr (Brasil).

Antimicrobiano	Sensível	Intermediário	Resistente
Ampicilina	97,75% (217/222)	-	2,25% (5/222)
Azitromicina	96,40% (214/222)	-	3,60% (8/222)
Cefoxitina	98,20% (218/222)	-	1,80% (4/222)
Ciprofloxacina	98,65% (219/222)	0,45% (1/222)	0,90% (2/222)
Clindamicina	93,70% (208/222)	0,45% (1/222)	5,85% (13/222)
Cloranfenicol	99,10% (220/222)	-	0,90% (2/222)
Eritromicina	93,70% (208/222)	1,35% (3/222)	4,95% (11/222)
Gentamicina	95,05% (211/222)	-	4,95% (11/222)
Linezolida	100% (222/222)	-	-
Oxacilina	95,95% (213/222)	-	4,05% (9/222)
Penicilina G	66,67% (148/222)	-	33,33% (74/222)
Rifampicina	99,55% (221/222)	-	0,45% (1/222)
Sulfametoxazol + Trimetoprima	77,03% (171/222)	-	22,97% (51/222)
Tetraciclina	88,29% (196/222)	1,35% (3/222)	10,36% (23/222)
Vancomicina	100% (222/222)	-	-

Tabela 5. Frequência absoluta e relativa do perfil de sensibilidade a antimicrobianos de *Streptococcus agalactiae* isolados de amostras de leite provenientes de vacas com mastite subclínica (n=150), coletadas no período entre julho de 2019 e maio de 2020 em propriedades rurais da região Oeste e Noroeste – Pr (Brasil).

Antimicrobiano	Sensível	Intermediário	Resistente
Ampicilina	99,33% (149/150)	-	0,67% (1/150)
Azitromicina	88,67% (133/150)	-	11,33% (17/150)
Cefoxitina	100% (150/150)	-	-
Ciprofloxacina	99,33% (149/150)	0,67% (1/150)	-
Clindamicina	86,0% (129/150)	-	14,0% (21/150)
Cloranfenicol	99,33% (149/150)	-	0,67% (1/150)
Eritromicina	88,0% (132/150)	-	12,0% (18/150)
Gentamicina	44,66% (67/150)	6,67% (10/150)	48,67% (73/150)
Linezolida	100% (150/150)	-	-
Oxacilina	97,33% (146/150)	-	2,67% (4/150)
Penicilina G	96,0% (144/150)	-	4,00% (6/150)
Rifampicina	98,67% (148/150)	-	1,33% (2/150)
Sulfametoxazol + Trimetoprima	37,33% (56/150)	-	62,67% (94/150)
Tetraciclina	78,67% (118/150)	1,33% (2/150)	20,0% (30/150)
Vancomicina	100% (150/150)	-	-

Tabela 6. Frequência absoluta e relativa do perfil de sensibilidade a antimicrobianos de **Streptococcus spp.** isolados de amostras de leite provenientes de vacas com mastite subclínica (n=114), coletadas no período entre julho de 2019 e maio de 2020 em propriedades rurais da região Oeste e Noroeste – Pr (Brasil).

Antimicrobiano	Sensível	Intermediário	Resistente
Ampicilina	100% (114/114)	-	-
Azitromicina	96,49% (110/114)	-	3,51% (4/114)
Cefoxitina	95,61% (109/114)	-	4,39% (5/114)
Ciprofloxacina	92,98% (106/114)	3,51% (4/114)	3,51% (4/114)
Clindamicina	84,21% (96/114)	-	15,79% (18/114)
Cloranfenicol	100% (114/114)	-	-
Eritromicina	93,86% (107/114)	-	6,14% (7/114)
Gentamicina	65,79% (75/114)	6,14% (7/114)	28,07% (32/114)
Linezolida	100% (114/114)	-	-
Oxacilina	72,81% (83/114)	-	27,19% (31/114)
Penicilina G	89,47% (102/114)	-	10,53% (12/114)
Rifampicina	95,61% (109/114)	0,88% (1/114)	3,51% (4/114)
Sulfametoxazol + Trimetoprima	64,04% (73/114)	-	35,96% (41/114)
Tetraciclina	87,72% (100/114)	5,26% (6/114)	7,02% (8/114)
Vancomicina	99,12% (113/114)	-	0,88% (1/114)

Tabela 7. Frequência absoluta e relativa do perfil de sensibilidade a antimicrobianos de **Bacilos difteróides** isolados de amostras de leite provenientes de vacas com mastite subclínica (n=35), coletadas no período entre julho de 2019 e maio de 2020 em propriedades rurais da região Oeste e Noroeste – Pr (Brasil).

Antimicrobiano	Sensível	Intermediário	Resistente
Ampicilina	100% (35/35)	-	-
Azitromicina	94,29% (33/35)	-	5,71% (2/35)
Cefoxitina	94,29% (33/35)	-	5,71% (2/35)
Ciprofloxacina	97,14% (34/35)	-	2,86% (1/35)
Clindamicina	88,57% (31/35)	-	11,43% (4/35)
Cloranfenicol	100% (35/35)	-	-
Eritromicina	94,29% (33/35)	-	5,71% (2/35)
Gentamicina	97,14% (34/35)	-	2,86% (1/35)
Linezolida	100% (35/35)	-	-
Oxacilina	94,29% (33/35)	-	5,71% (2/35)
Penicilina G	88,57% (31/35)	-	11,43% (4/35)
Rifampicina	94,29% (33/35)	-	5,71% (2/35)
Sulfametoxazol + Trimetoprima	68,57% (24/35)	2,86% (1/35)	28,57% (10/35)
Tetraciclina	97,14% (34/35)	-	2,86% (1/35)
Vancomicina	100% (35/35)	-	-

Tabela 8. Frequência absoluta e relativa do perfil de sensibilidade a antimicrobianos de *Enterococcus faecalis* isolados de amostras de leite provenientes de vacas com mastite subclínica (n=10), coletadas no período entre julho de 2019 e maio de 2020 em propriedades rurais da região Oeste e Noroeste – Pr (Brasil).

Antimicrobiano	Sensível	Intermediário	Resistente
Ampicilina	100% (10/10)	-	-
Azitromicina	100% (10/10)	-	-
Cefoxitina	80,0% (8/10)	-	20,0% (2/10)
Ciprofloxacina	80,0% (8/10)	-	20,0% (2/10)
Clindamicina	90,0% (9/10)	-	10,0% (1/10)
Cloranfenicol	100% (10/10)	-	-
Eritromicina	100% (10/10)	-	-
Gentamicina	70,0% (7/10)	-	30,0% (3/10)
Linezolida	100% (10/10)	-	-
Oxacilina	60,0% (6/10)	-	40,0% (4/10)
Penicilina G	80,0% (8/10)	-	20,0% (2/10)
Rifampicina	80,0% (8/10)	-	20,0% (2/10)
Sulfametoxazol + Trimetoprima	40,0% (4/10)	-	60,0% (6/10)
Tetraciclina	80,0% (8/10)	10,0% (1/10)	10,0% (1/10)
Vancomicina	100% (10/10)	-	-

Staphylococcus aureus é considerado o agente de maior importância para mastites, devido a sua alta contagiosidade, capacidade de colonizar o epitélio do teto e fixar células epiteliais da mama. O descarte de vacas repetidoras de mastites é uma das estratégias de controle e redução desse agente. O leite contaminado pode apresentar enterotoxinas termoestáveis, causadoras de distúrbios alimentares (MARTINS et al., 2010). Saeki (2011) obteve em seu estudo alta taxa de sensibilidade aos antibióticos testados, obtendo 100% de sensibilidade para gentamicina, cefalexina e ciprofloxacina, seguido de 94,6% para norfloxacina. Neste estudo foi possível observar 66,67% de sensibilidade de *Staphylococcus aureus* a penicilina G, 98,05 % de sensibilidade a gentamicina, 77,03% de sensibilidade a Sulfametoxazol + trimetoprima e 88,29% a tetraciclina. Em um

levantamento realizado por Paiva (2009), observou-se que quando realiza-se apenas uma amostragem, reduz-se as chances de isolamento do agente presente. Como observado por Sears et al. (1990) que verificou 74,5% de probabilidade de uma única amostra permitir o isolamento de *Staphylococcus aureus*, devido ao padrão cíclico de eliminação deste patógeno no leite. Estes dados permitem compreender uma possível contribuição no número de amostras sem crescimento oriundas de animais acometidos por *Staphylococcus aureus*, mas submetidos apenas a uma coleta, como no presente estudo. Visto a importância de isolamento deste patógeno para o controle da mastite no rebanho, e considerando que neste estudo obteve-se uma taxa de 28,05% de amostras sem crescimento, observa-se a necessidade de realização de mais de uma amostragem, já que a adoção deste procedimento pode melhorar o sucesso de identificação microbiológica.

Bexiga et al (2011), em seu estudo, ao comparar a taxa de isolamento de microrganismos oriundos de amostras duplicadas congeladas e não congeladas, não observou diferença significativa. Apesar do congelamento não atribuir melhoria na taxa de isolamento microbiológico, o congelamento não representa redução do isolamento quando nos referimos a mastites subclínicas. Visto isto, podemos observar que o congelamento não é uma estratégia para reduzir o número de amostras sem crescimento, mas não se trata de um grande obstáculo quando o congelamento torna-se necessário.

Já *Staphylococcus spp.* apresenta menor patogenicidade, porém causam infecções persistentes com aumento de células somáticas (CSS) e diminuição na produção de leite. É frequentemente encontrada no início da lactação (KUROSAWA et al., 2020). As cepas resistentes podem ser transmitidas aos seres humanos por meio da ingestão de produtos oriundos do leite contaminado, além de que, quando os animais estão em tratamento, o resíduo antimicrobiano presente no leite, caso seja consumido, pode causar reações de hipersensibilidade em humanos (Zanette et al., 2010). Em trabalho realizado por Kurosawa et al (2020), ao realizar o antibiograma em 29 amostras de *Staphylococcus spp.*, observaram que a maior porcentagem de resistência bacteriana foi à penicilina (34,5%). Esta porcentagem elevada é observada na maioria dos trabalhos realizados com betalactâmicos, sendo que um dos motivos para justificar este dado é a capacidade de produção de betalactamases pelo microrganismo. A gentamicina se apresentou com alta porcentagem de sensibilidade (96,5%) a oxacilina, 79,3% e as tetraciclinas 86,2%. No presente estudo, nas amostras positivas para *Staphylococcus sp.* observou-se um cenário

diferente do encontrado por Kurosawa et al (2020), já que apenas 10,53% das amostras foram resistentes a penicilina e apresentou sensibilidade a gentamicina em 65,79% das amostras. 100% das amostras apresentaram sensibilidade a amoxicilina.

Streptococcus agalactiae é altamente contagioso e dependente dos animais infectados para realizar disseminação para o rebanho, pois não sobrevivem por longos períodos no ambiente. Se manifesta, na maioria dos casos, de forma subclínica (CUNHA et al., 2006). O tratamento através do uso de extrato alcoólico de própolis a 30% apresentou resultados satisfatórios, acima de 90%, semelhantes aos microbianos comumente utilizados (SAEKI et al., 2011). No Brasil, cerca de 44,5% das amostras de leite de tanques de expansão contém esse agente. Este patógeno apresenta boas taxas de cura, entretanto neste estudo apenas 37,33% das amostras apresentaram sensibilidade para Sulfametoxazol + trimetoprima e 44,66% de sensibilidade a gentamicina. Este resultado indica a importância da informação do antibiograma na escolha do antibiótico utilizado para tratamento das mastites bacterianas. A terapia de mastites subclínicas tem se mostrado economicamente mais viável no fim da lactação, exceto nos casos de *Streptococcus agalactiae*, que apresenta viabilidade de terapia em lactação (CARVALHO et al, 2021).

Ademais, a escolha da molécula mais sensível e com melhor atuação na glândula mamária, é importante destacar que apesar da terapia de secagem ter se mostrado como uma ferramenta financeiramente viável para controle e prevenção dos quadros de mastite no período seco e no início da lactação seguinte, esta prática pode provocar resistência bacteriana na microbiota dos animais tratados e conseqüentemente representa um risco para saúde pública, já que estes microrganismos podem chegar aos consumidores de produtos de origem animal. Mediante a este risco, a terapia seletiva de secagem, tornou-se uma possível alternativa para redução na utilização de antimicrobianos. Esta prática consiste em realizar infusão de antimicrobianos intramamário apenas quando há Contagem de células somáticas no quarto mamário acima de duzentos mil células por mL de leite ou cultura positiva (WEBSTER, 2020; CARVALHO et al., 2021). Visto a preocupação a nível mundial em realizar o controle e redução da resistência a antimicrobianos, o controle da mastite pode ser realizado em redução do uso dessas moléculas, quando a resistência do hospedeiro é elevada, a chance de contato do patógeno com hospedeiro é reduzida e

Bacilos difteroides, representam neste estudo *Corynebacterium bovis*, pertencente à família dos *Actinomycetales*. Considerado agente infeccioso por vários autores, relacionado a diminuição da produção de leite e encontrado com elevada frequência em quadros de mastite subclínica. É muito encontrado associado a outros microrganismos e em mastites subclínicas crônicas. Apesar de apresentar baixa patogenicidade, tem alto grau de contágio (LANGONI et al., 2017).

O *Streptococcus uberis* é um patógeno altamente infeccioso e geralmente associado aos quadros clínicos e subclínicos da mastite, podendo ser encontrado no solo, cama, epiderme ou úbere dos animais, e portanto também se caracteriza por transmissão contagiosa (ABUREEMA et al., 2014). É capaz de adentrar na glândula mamária e gerar um processo inflamatório, sendo também classificado como microrganismo oportunista (SCHUKKEN et al., 2014). Poutrel (2018), em um estudo realizado na França com isolados de *Streptococcus uberis*, observou alta suscetibilidade aos betalactâmicos, com exceção à cloxacilina, no qual 32,5% das amostras foram resistentes. Gentamicina e Tilosina também apresentaram baixa sensibilidade. No presente estudo a oxacilina prediz a sensibilidade a cloxacilina, que obteve 94,29% de sensibilidade, ou seja, apenas 5,71% dos isolados se apresentaram resistentes a este patógeno. Este comparativo, indica a necessidade de realização de estudo em cada unidade produtora, já que não é possível extrapolar resultados de antibiograma para isolados de *Streptococcus Uberis*, assim como para outros agentes causadores de mastites.

Notabiliza-se que apesar do possível monitoramento do perfil de sensibilidade por meio da realização dos antibiogramas, nem sempre as moléculas que apresentam sensibilidade resultam em cura microbiológica, já que outros fatores como difusão do antimicrobiano na glândula mamária, alteração de pH, idade do animal e características do agente, são capazes de interferir no processo de cura (RIBEIRO, 2008; LANGONI et al., 2017). Apesar da sensibilidade observada in vitro não ser totalmente correspondente in vivo, vale ressaltar que bactérias que apresentarem resistência in vitro, também apresentarão resistência in vivo (PAIVA, 2009), portanto a realização do antibiograma é uma estratégia para exclusão de drogas que apresentariam pouca ou nenhuma efetividade se utilizada em casos onde há resistência da mesma.

Como observado nas tabelas 2 a 8, alguns antimicrobianos presentes neste estudo, não possuem apresentação para bovinos, mas estes compõem o padrão utilizado de rotina

no laboratório utilizado para processamento das amostras. Esta informação aponta índices de resistência a drogas eventualmente utilizadas em humanos, em patógenos isolados que podem ter origem do ambiente e/ou animais. isso seria interessante discutir

CONCLUSÃO

A mastite subclínica é um dos desafios encontrados na pecuária leiteira. A necessidade do uso reduzido de antimicrobianos, assim como a necessidade de elevar a taxa de cura e reduzir os casos de mastites subclínicas e suas consequências, indicam a necessidade da realização de cultura microbiológica e antibiograma individualmente, visto que mediante aos estudos já realizados há diferentes resultados de resistência a antimicrobianos para os mesmos patógenos. A presença marcante de *Staphylococcus aureus*, assim como a taxa significativa de amostras sem crescimento, indicam a importância da realização de cultura seriada para os casos de primeira cultura negativa. Estudos como este, indicam a necessidade de realização de pesquisas acerca de agentes etiológicos causadores de mastites subclínicas regionalmente, com objetivo de compreender a epidemiologia da doença em cada região e como os diversos fatores podem influenciar na manutenção da doença.

REFERÊNCIAS

ABUREEMA, S.; SMOOKER, P.; MALMO, J., & DEIGHTON, M. Molecular epidemiology of recurrent clinical mastitis due to *Streptococcus uberis*: evidence of both an environmental source and recurring infection with the same strain. *Journal Of Dairy Science*, v. 97, n. 1, p. 285-290, jan. 2014. **American Dairy Science Association**. <DOI: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2013-7074>. Acesso em: 08 fev 2022.

AITKEN, S. L.; CORL, C. M.; SORDILLO, L. M. Immunopathology of mastitis: insights into disease recognition and resolution. **Journal of mammary gland biology and neoplasia**, v. 16, n. 4, p. 291-304, 2011. <DOI: 10.1007/s10911-011-9230-4.

BARROS, J. P. N.; LOPES, L. V.; LIMA, D. M.; ESTEVAM, I. P.; et al. Limitações ao uso do antibiograma no tratamento e controle das mastites na rotina das propriedades leiteiras. **Revista Brasileira Medicina Veterinária**. v.35, c.3, p 212-216, jul/set, 2013. Acesso em: 8 fev. 2022.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standard single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493-496, 1966.

BEXIGA, R.; KOSKINEN, M. T.; HOLOPAINEN, J.; CARNEIRO, C, et al. Diagnosis of intramammary infection in samples yielding negative results or minor pathogens in conventional bacterial culturing. **Journal Of Dairy Research**, v. 78, n. 1, p. 49-55, 7 dez. 2010. Cambridge University Press (CUP). <DOI:<http://dx.doi.org/10.1017/s0022029910000725>.

PAIVA, Maria Aparecida Vasconcelos et al. Diagnóstico microbiológico da mastite bovina. **Ciência Animal Brasileira**, 2009.

CARVALHO, A. S. S. et al. Estudo e caracterização de microrganismos causadores de mastite bovina no DF e entorno, sua resistência aos antimicrobianos e os fatores de risco para a ocorrência da doença. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 9, p. 86772-86797, 2021. <DOI: <http://dx.doi.org/10.34117/bjdv7n9-032>.

COELHO, Karyne Oliveira et al. Níveis de células somáticas sobre a proteólise do queijo Mussarela. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 13, n. 3, p. 682-693, 2012.

COSER, S. M.; LOPES, M. A.; DE COSTA, G. M. **Mastite bovina: controle e prevenção**. Lavras, MG. Governo do Brasil. 2012, v. 93, p. 1-30. (Governo do Brasil. Boletim técnico, nº93).

COSTA, G. M.; BARROS, R. A.; CUSTÓDIO, D. A. D. C.; PEREIRA, U. D.P. FIGUEIREDO, D.J.; & SILVA, N.D. Resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus*

aureus isolados de mastite em bovinos leiteiros de Minas Gerais, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 80, p. 297-302, 2013.

CUNHA, M. L. R. S.; PERESI, E.; CALSOLARI, R. A. O., & ARAÚJO JÚNIOR, J. P. Detection of enterotoxins genes in coagulase-negative Staphylococcus isolated from foods. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 70- 74, 2006. <DOI: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822006000100013>>

DIAS, RV da C. Principais métodos de diagnóstico e controle da mastite bovina. **Acta Veterinária Brasileira**, v. 1, n. 1, p. 23-27, 2007.

GERSTNER, D. G.; GUERIOS, E. M. A. Comparativo de eficiência terapêutica entre dois protocolos para secagem de vacas leiteiras. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária FAG**. v. 3, n° 3, jul/dez. 2020.

GONÇALVES, J. L.; CUE, R. I.; NETTO, E. P. L.; GAMEIRO, A. H., & SANTOS, M. V. Herd-level associations between somatic cell counts and economic performance indicators in Brazilian dairy herds. **Journal Of Dairy Science**, v. 104, n. 2, p. 1855-1863, fev. 2021. **American Dairy Science Association**.<DOI: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2019-17834>>

KLAAS, I. C.; ZADOKS, R. N. An update on environmental mastitis: Challenging perceptions. **Transboundary and emerging diseases**, v. 65, p. 166-185, 2018.

KUROSAWA, L. S.; CÉZAR, L. M. L.; MARQUES, F. A.; ORIANI, M. R. de G., & ARAOJO, M. E. M. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de Staphylococcus spp. associados a mastite bovina. **Pubvet**, v. 14, n. 5, p. 1-6, maio. 2020. Editora MV Valero. <DOI: <http://dx.doi.org/10.31533/pubvet.v14n5a563.1-6>>

LANGONI, H.; SALINA, A.; OLIVEIRA, G. C. O.; JUNQUEIRA, N. B., & JOAQUIM, S. F. Considerações sobre o tratamento das mastites. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 11, p. 1261-1269, nov. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1590/s0100-736x2017001100011>.

LANGONI, H.; SILVA, A.D.; CABRAL, K. G. & DOMINGUES, P. F. Aspectos etiológicos na mastite bovina: flora bacteriana aeróbica. **Revista Brasileira Medicina Veterinária**, v. 20, n. 5, p. 204-209, 1998.

LANGONI H. Qualidade do leite: utopia sem um programa sério de monitoramento da ocorrência de mastite bovina. **Pesquisa. Veterinária. Brasileira**. 33: 620-626. 2013. Disponível em < <https://www.scielo.br/pdf/pvb/v33n5/12.pdf>>.

LANGONI H. et al. Considerações sobre o tratamento de mastite. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 2017. <DOI: 10.1590/S0100-736X2017001100011.>

LOPES, M.A.; DEMEU, F.A; COSTA, G.M. da; ROCHA, C.M.B.M. da; et al. A influência da contagem de células somáticas sobre o impacto econômico da mastite em rebanhos bovinos leiteiros. **Arquivos do Instituto Biológico**. v. 78, n. 4, p. 493-499, dez. 2011. <DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1808-1657v78p4932011>.

LOPES, B. C.; MANZI, M. P.; LANGONI, H. Etiologia das mastites: pesquisa de micro-organismos da classe Mollicutes. **Veterinária e Zootecnia**, v 25, n 1, p. 173-179, 2018. <DOI: <https://doi.org/10.35172/rvz.2018.v25.41>.

MANZI, M. P.; JOAQUIM S. F.; GUIMARÃES, F.F.; BRUDER-NASCIMENTO, A. C.; PANTOJA, J. C. & LANGONI, H. Prevalência de Mycoplasma bovis em rebanhos de vacas leiteiras. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 4, p. 665-669, 2018. <DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-5192>.

MARTINS, L.; BARCELOS, M.M.; CUE, R.I, ANDERSON, K. L. DOS SANTOS, M.V & GONÇALVES, J. L. Chronic subclinical mastitis reduces milk and components yield at the cow level. **Journal of Dairy Research**, v.87, n.3, p.298-305, 2020. <DOI: <https://doi.org/10.1017/S0022029920000321>. Acesso em: 08 fev 2022.

MASSOTE, V.P.; ZANATELI, B.M.; ALVES, G.V.; GOLÇALVES, E.S., e GUEDES, E. **Diagnóstico e controle de mastite bovina. Revista Agroveterinária do Sul de Minas**, v. 1, n. 1, p. 1-14, 2019. Acesso em: 08 fev 2022.

MESQUITA, A. A.; BORGES, J.; PINTO, S. M.; LUGLI, F. F.; et al. Contagem bacteriana total e contagem de células somáticas como indicadores de perdas de produção de leite. **Pubvet**. v. 12, n. 6, p. 1-8, jun. 2018. <DOI: <http://dx.doi.org/10.22256/pubvet.v12n6a119.1-8>. Acesso em: 8 fev. 2022.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (UNITED STATES). **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests**. National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003.

PYÔRÅLA, S. Indicators of inflammation in the diagnosis of mastites. **Veterinary Research**, v.34, p.565-578, 2003.

PHILIP M. S., Diagnosis of mastitis for therapy desicion. **Veterinary Clinics**, 2003. <DOI: [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(02\)00074-9](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(02)00074-9).

POUNTREL, B.; BAREILLE, S.; LEQUEUX, G.; & LEBOUUEUF, F. Prevalence of mastitis pathogens in France: Antimicrobial susceptibility of Staphylococcus aureus, Streptococcus uberis and Escherichia coli. **Jornal of Veterinary Science & Technology**, v 9, n 2, 2018. <DOI: : 10.4172/2157-7579.1000522.

REBOUÇAS, Rodolpho Almeida. **Mastite subclínica causada por Staphylococcus aureus: impacto econômico e na saúde pública**. 2016. 42 f. Trabalho de Conclusão de

Curso (Residência) - Programa de Residência em Área Profissional da Saúde - Medicina Veterinária, Sanidade de Ruminantes, Clínica de Bovinos, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Garanhuns, 2016.

RIBEIRO, M.G. **Manual Terapêutica Veterinária**. Princípios terapêuticos na mastite em animais de produção e de companhia. 3. ed. São Paulo: Editora Roca, 2008. p.759-771.

REIS S. R.; SILVA N.; BRESCIA M. V. Antibiotic therapy for subclinical mastitis control of lactating cows. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* v.55 n.6 Belo Horizonte dez. 2003. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352003000600001>

SAEKI, E. K; PEIXOTO, Erika C. T.; MATSUMOTO, L. S.; MARCUSSO, P. F., & MONTEIRO, R. M. Mastite bovina por staphylococcus aureus: sensibilidade às drogas antimicrobianas e ao extrato alcoólico de própolis. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 5, n. 3, p. 284– 290, 2011. <DOI: <http://dx.doi.org/10.21708/avb.2011.5.3.2172>.

SCHUKKEN, Y.H.; BRONZO, V.; LOCATELLI, C.; POLLERA, C.; ROTA, N.; CASULA, A.; TESTA, F.; SCACCABAROZZI, L.; MARCH, R., & ZALDUENDO, D. Efficacy of vaccination on Staphylococcus aureus and coagulase-negative staphylococci intramammary infection dynamics in 2 dairy herds. *Journal Of Dairy Science*, v. 97, n. 8, p. 5250-5264, ago. 2014. **American Dairy Science Association**. <DOI: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2014-8008>.

SEARS, P.M; SMIT, B.S.; ENGLISH, P.B.; HERER, P.S.; et. Al. Shedding pattern of Staphylococcus aureus from bovine intramammary infections. **Journal of Dairy**, v. 73, p. 2785-2789, 1990.

WEBSTER, John. **Understanding the dairy cow**. John Wiley & Sons, 2020.

ZANETTE, E.; SCAPIN, D.; ROSSI, E. Suscetibilidade antimicrobiana de Staphylococcus aureus isolados de amostras de leite de bovinos com suspeita de mastite. **Unoesc & Ciência-ACBS**, v. 1, n. 1, p. 65-70, 2010.