



**PERFIL MICROBIOLÓGICO E DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DA
MASTITE BOVINA EM ASSENTAMENTO DO NOROESTE DE SP, BRASIL**

**SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO DO ESTADO DE
SÃO PAULO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO BIOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE, SEGURANÇA
ALIMENTAR E AMBIENTAL NO AGRONEGÓCIO**

**PERFIL MICROBIOLÓGICO E DE RESISTÊNCIA
ANTIMICROBIANA DA MASTITE BOVINA EM ASSENTAMENTO
DO NOROESTE DE SP, BRASIL**

Vanessa Castro

Tese apresentada para a obtenção do título
de Doutor em Sanidade, Segurança
Alimentar e Ambiental no Agronegócio.
Área de concentração: Segurança Alimentar e
Sanidade no Agrossistema

Orientadora:
Prof.^a Dra. Alessandra Figueiredo de Castro Nassar

**São Paulo
2023**

VANESSA CASTRO

**PERFIL MICROBIOLÓGICO E DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DA MASTITE
BOVINA EM ASSENTAMENTO DO NOROESTE DE SP, BRASIL**

Tese apresentada para a obtenção do
título de Doutor em Sanidade,
Segurança Alimentar e Ambiental no
Agronegócio.

Área de concentração: Segurança
Alimentar e Sanidade no
Agrossistema

SÃO PAULO
2023

Eu **Vanessa Castro**, autorizo o Instituto Biológico (IB-APTA), da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, a disponibilizar gratuitamente e sem ressarcimento dos direitos autorais, o presente trabalho acadêmico de minha autoria, no portal, biblioteca digital, catálogo eletrônico ou qualquer outra plataforma eletrônica do IB para fins de leitura, estudo, pesquisa e/ou impressão pela Internet desde que citada a fonte.

Assinatura:  Data 09/11/23

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo
Núcleo de Informação e Documentação – IB

Castro, Vanessa
Perfil microbiológico e de resistência antimicrobiana da mastite bovina em assentamento do noroeste de SP, Brasil. - São Paulo. / Vanessa Castro - São Paulo, 2023.
78 p.
doi: 10.31368/PGSSAAA.2023T.VC05

Tese (Doutorado). Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.
Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.
Linha de pesquisa: Sanidade, gestão ambiental e qualidade de alimentos, produtos e processos na produção agropecuária sustentável.

Orientadora: Alessandra Figueiredo de Castro Nassar

Versão do título para o inglês: Microbiological profile and antimicrobial resistance of bovine mastitis in a settlement in the northwest of SP, Brazil.

1. Staphylococcus 2. Alimento seguro 3. Antibióticos 4. Multidrogas
I. Castro, Vanessa. II. Nassar, Alessandra Figueiredo de Castro. III. Instituto Biológico (São Paulo). IV. Título.

IB/IBN/202305



SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO BIOLÓGICO
Pós-Graduação

Av. Cons. Rodrigues Alves 1252
CEP 04014-002 - São Paulo - SP
secretariapg@biologico.sp.gov.br



FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Vanessa Castro

Título: PERFIL MICROBIOLÓGICO E DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DA MASTITE BOVINA EM ASSENTAMENTO DO NOROESTE DE SP, BRASIL

Orientadora: Prof.^a Dra. Alessandra de Castro Nassar

Tese apresentada para a obtenção do título de Doutor em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.
Área de Concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agro ecossistema

Aprovada em:

Banca Examinadora

Prof. (a) Dr.(a):	Instituição:
Julgamento:	Assinatura:

Prof. (a) Dr.(a):	Instituição:
Julgamento:	Assinatura:

Prof. (a) Dr.(a):	Instituição:
Julgamento:	Assinatura:

Prof. (a) Dr.(a):	Instituição:
Julgamento:	Assinatura:

Prof. (a) Dr.(a):	Instituição:
Julgamento:	Assinatura:

**“São as verdadeiras
amizades que trazem inspirações para nossa vida.
Esteja ao lado de quem conhece o seu choro e o seu riso”**

*Dedico este trabalho a meu pai (in memorian), minha mãe e minha Pá;
Marido, Theus e Cata e ao meu Tio Lú*

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai, que me ensinou a seguir sempre, sem deixar que os obstáculos nos impeçam de sonhar e vencer!

À minha mãe, por tudo!

À minha irmã, que sempre esteve comigo, mesmo de longe!

À Pós-Graduação do Instituto Biológico pela possibilidade de crescimento profissional e pessoal

À minha orientadora **Dra. Alessandra F.C. Nassar**, pelo encorajamento para evoluir, por toda a paciência e ensinamentos durante esses anos.

À Dra. **Daniela Pontes Chiebao** pelos aconselhamentos e análises estatísticas

Ao Dr. **Daniel de Jesus Cardoso de Oliveira** pela imensa participação nas colheitas das amostras e sugestões

Às Dras. **Eliana Scarcelli Pinheiro** e **Maristela Vasconcellos Cardoso** pelos diagnósticos complementares.

Ao Dr. **Ricardo Harakava** pelos sequenciamentos

Às minhas amigas, de vida, **Alê**, **Maris** e **Lia** pelo ombro de todo dia....

Às parceiras de luta e glória (a última apaga a luz!!!) **Alessandra**, **Simone**, **Cristina**, **Daniela**

Às minhas queridas **Mariazinha** pelo apoio “nos bastidores” do Laboratório e **Cleonice** e **Nenza** pelo suporte administrativo (e laboratorial, quando foi necessário!)

Aos colegas **João Paulo Altenfender** e **Dr. Hugo** pelo apoio nas propriedades envolvidas

À minha família, que sempre esteve do meu lado!

A todos que, de alguma forma, à sua maneira, me ajudaram a chegar até aqui

CASTRO, V PERFIL MICROBIOLÓGICO E DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DA MASTITE BOVINA EM ASSENTAMENTO DO NOROESTE DE SP, BRASIL. 2023. 78f Tese (Doutorado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico

RESUMO

Mastite bovina é enfermidade que acomete a glândula mamária de vacas, acarretando grandes prejuízos econômicos devido à diminuição da produção leiteira e ao gasto com uso de medicamentos. O objetivo do presente trabalho realizado em propriedades rurais, no município de Promissão, região Noroeste do Estado de São Paulo, foi verificar a situação sanitária dos rebanhos, visando implementar melhorias na sanidade dos animais, na qualidade microbiológica do leite e na produtividade, a fim de agregar valor comercial ao produto final. Foram coletadas 228 amostras de leites de 113 animais que apresentaram aumento da celularidade no teste CMT (California Mastitis Test). No cultivo microbiológico foram isoladas 195 colônias, sendo: 59,5% *Staphylococcus aureus* (116/195), 5,6% *S. chromogenes* (11/195), 2,0% *Corynebacterium bovis* (4/195), 1,0% de colônias de *Pasteurella multocida* (2/195), além de outros microrganismos em associação. Do total de amostras, 14,5% (33/228) não apresentou crescimento bacteriano. Pela técnica de MALDI-TOF para confirmação das espécies de *Staphylococcus* e *Streptococcus* foi possível identificar *S. chromogenes*, *S. intermedius*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticum*, *S. borealis* e *S. aureus*. O gênero *Streptococcus* foi caracterizado como *S. dysgalactiae*, *S. agalactiae* e *S. uberis*. Ainda foi possível identificar o gênero *Corynebacterium* como *C. bovis*. Em nenhuma das amostras houve isolamento de *Campylobacter* spp. No antibiograma para o gênero *S. aureus*, mais prevalente no estudo, foram utilizados os seguintes antimicrobianos: azitromicina (15 µg), cefalotina (30 µg), ceftiofur (30 µg), cloranfenicol (30 µg), tetraciclina (30 µg), gentamicina (10 µg), penicilina (10 UI), eritromicina (15 µg), amoxicilina (25 µg) e sulfazotrim (25 µg) e das 116 colônias, 28 (24,2%) foram sensíveis a todos os antibióticos; 23 (19,8%) foram resistentes à amoxicilina, 19 (16,4%) foram resistentes à eritromicina, uma (0,9%) à azitromicina e uma (0,9%) à penicilina. Na PCR, em cinco (2,2%) amostras de leite foi detectado o gênero *Mycoplasma* spp. Foi detectado o gene *nuc* em 93,10 % (108/116) das colônias de *S. aureus*. Em 6,9% (8/116) das amostras, apesar de serem caracterizadas pelo isolamento e MALDI-TOF como *S. aureus*, não foi possível detectar o gene *nuc*. Foi detectado 25% (29/116) do gene de resistência *bla_Z*, enquanto que em nenhuma amostra foi detectada (0/116) o gene *mecA*. Foi encontrada expressiva frequência do gênero *Staphylococcus*, patógeno contagioso, frequentemente isolado em casos de mastite bovina, porém não foi verificada grande resistência bacteriana, fato que indica, possivelmente, que o maior problema das propriedades seja o manejo deficitário e a falta de higiene. Esse cenário propicia a perpetuação dos casos de mastite nas propriedades leiteiras em nosso país.

Palavras-chave: *Staphylococcus*, alimento seguro, antibióticos, multidroga.

CASTRO, V. Microbiological profile and antimicrobial resistance of bovine mastitis in a settlement in the northwest of SP. Sao Paulo. 2023. 78f. Thesis (Doctorate in Health, Food and Environmental Safety in Agribusiness) – Instituto Biológico

ABSTRACT

Bovine mastitis is a disease that affects the mammary gland of cows, causing great economic losses due to the decrease in milk production and the expense of medication. The objective of the present work carried out on rural properties, in the municipality of Promissão, Northwest region of the State of São Paulo, was to verify the health situation of the herds, aiming to implement improvements in the health of the animals, in the microbiological quality of the milk and in the productivity, in order to add commercial value to the final product. 228 milk samples were collected from 113 animals that showed increased cellularity in the CMT test (California Mastitis Test). In the microbiological culture, 195 colonies were isolated, of which: 59.5% *Staphylococcus aureus* (116/195), 5.6% *S. chromogenes* (11/195), 2.0% *Corynebacterium bovis* (4/195), 1.0 % of *Pasteurella multocida* colonies (2/195), in addition to other microorganisms in association. Of the total samples, 14.5% (33/228) did not show bacterial growth. Using the MALDI-TOF technique, to confirm the species of *Staphylococcus* and *Streptococcus*, it was possible to identify *S. chromogenes*, *S. intermedius*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticum*, *S. borealis* and *S. aureus*. The genus *Streptococcus* has been characterized as *S. dysgalactiae*, *S. agalactiae* and *S. uberis*. It was still possible to identify the genus *Corynebacterium* as *C. bovis*. In none of the samples was there any isolation of *Campylobacter* spp. In the antibiogram for the genus *S. aureus*, most prevalent in the study, the following antimicrobials were used: azithromycin (15 µg), cephalothin (30 µg), ceftiofur (30 µg), chloramphenicol (30 µg), tetracycline (30 µg), gentamicin (10 µg), penicillin (10 IU), erythromycin (15 µg), amoxicillin (25 µg) and sulfazotrim (25 µg) and of the 116 colonies, 28 (24.2%) were sensitive to all antibiotics; 23 (19.8%) were resistant to amoxicillin, 19 (16.4%) were resistant to erythromycin, one (0.9%) to azithromycin and one (0.9%) to penicillin. In the PCR, the genus *Mycoplasma* spp. was detected in five (2.2%) milk samples. The nuc gene was detected in 93.10% (108/116) of *S. aureus* colonies. In 6.9% (8/116) of the samples, despite being characterized by isolation and MALDI-TOF as *S. aureus*, it was not possible to detect the nuc gene. 25% (29/116) of the blaZ resistance gene was detected, while the mecA gene was not detected (0/116) in any sample. A significant frequency of the genus *Staphylococcus*, a contagious pathogen, frequently isolated in cases of bovine mastitis, was found, but no great bacterial resistance was found, a fact that possibly indicates that the biggest problem on the properties is poor management and lack of hygiene. This scenario leads to the perpetuation of mastitis cases on dairy farms in our country.

Key words: *Staphylococcus*, food safety, antibiotics, multidrugs.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Dados da produção de leite tabulado no período de 2016 a 2022.....	18
Figura 2: Mapa da produção leiteira do Estado de Paulo.....	19
Figura 3: Mapa da região de Promissão -SP	34
Figura 4: Cultivo bacteriológico dos leites em ágar Mueller Hinton acrescido de sangue de carneiro 5%.....	36
Figura 5 :Equipamento Maldi – Tof BD®.....	37
Figura 6: Placa para leitura no equipamento Maldi – Tof BD®.....	38
Figura 7: Antibiograma das cepas isoladas dos leites através da técnica de kirky-bauer,	39
Figura 8: Propriedade “A”.....	44
Figura 9: Propriedade “B”.....	45
Figura 10: Propriedade “C”.....	46
Figura 11: Propriedade”D”.....	47
Figura 12: Propriedade “E”.....	48
Figura 13 : Aumento da celularidade em amostras de leite de animais com mastite,.....	49
Figura 14: Antibiograma da cepa de <i>Streptococcus</i> sp pelo método de Kirky-Bauer evidenciado os halos de sensibilidade aos discos de antibióticos.....	53
Figura 15: Correlação do número de cepas <i>S. aureus</i> resistentes aos antibióticos do estudo realizado pelo antibiograma (método de Kirky-Bauer).....	55
Figura 16: Eletroforese utilizando os primers do gene nuc do <i>S. aureus</i> e dos genes de resistência (<i>mecA</i> e <i>blaZ</i>) aos antimicrobianos.....	56
Figura 17: Prevalência e desvios padrão das bactérias detectadas em amostras de leite coletadas propriedades (A, B, C, D e E).....	59
Figura 18:Projeção das diferentes correlações entre as espécies de bactérias isoladas de amostras de leite e as propriedades familiares leiteiras(A, B, C, D e E)..	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Descrição dos isolados bacterianos das amostras de leite coletadas nas propriedades (A, B, C, D e E),.....	51
quadro: Correlação dos resultados de resistência e sensibilidade bacteriana dos <i>S. aureus</i> realizado pelo antibiograma (método de Kirky-Bauer)	54
Tabela 3: Resultados do cultivo, Maldi-tofe PCR para o gene <i>nuc</i> e os genes de resistência <i>BlaZ</i> e <i>MecA</i> dos <i>S. aureus</i> , isolados das amostras de leite, São Paulo, 2023.	57
Tabela 4: Comparação dos resultados dos diagnósticos microbiológicos, Maldi Tof, presença do gene <i>nuc</i> com o sequenciamento pelo método Sanger.	58
Tabela 5: Número de amostras positivas e frequência (%) de acordo com o isolamento microbiológico e a propriedade.....	59
Tabela 6: Número de amostras positivas e frequência (%) de acordo com o agente biológico isolado (identificação por Maldi-Tof) e a propriedade. ...	60
Tabela 7: Número de amostras positivas e frequência (%) de acordo com o gene identificado e a propriedade.....	60

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Metodologia de interpretação do teste de CMT, conforme a bula do fabricante do kit, utilizado no presente estudo, São Paulo, 2023	35
Quadro 2 – Primers para confirmação do <i>S. aureus</i> (<i>nuc</i>) e detecção dos genes (<i>mecA</i> e <i>blaZ</i>) de resistência para antimicrobianos	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCS - Contagem de Células Somáticas

CMT - *California Mastitis Tests*

CO₂ – gás carbônico

CS/mL – Células Somáticas por mililitro

°C – Graus Celsius

g – grama

H₂S – sulfeto de hidrogênio

INs - Instruções Normativas

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

mg/mL – miligrama por mililitro

min - minuto

mL/min- mililitros por minuto

mM -microMolar

O₂ - oxigênio

RPM – Rotações por minuto

UI/L- Unidades Internacionais por litro

v/v – volume a volume

% - Porcentagem

μL – microlitro

μg - micrograma

Visto terem seu uso consagrado na literatura técnica, algumas abreviaturas seguem as iniciais de sua grafia no idioma inglês.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	x
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE QUADROS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xiii
1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 Panorama atual da produção leiteira no Brasil e no Estado de São Paulo.....	18
2.2 Fatores de risco que afetam a produção de leite	20
2.3 Ordenha e transporte.....	20
2.4. Parâmetros da composição físico-química do leite	21
2.5 Mastite.	22
2.5.1 <i>Staphylococcus</i> spp	23
2.5.2 <i>Streptococcus</i> spp	25
2.5.3 <i>Corynebacterium</i> spp	25
2.5.4 <i>Campylobacter</i> spp	26
2.5.5 <i>Mycoplama</i> spp	27
2.5.6 <i>Pasteurella</i> spp.	28
2.6 Genes de resistência bacteriana aos antimicrobianos	28
3. JUSTIFICATIVA	31
4. OBJETIVOS	32
4.1 Objetivo geral	32
4.2 Objetivos específicos	32
5. MATERIAL E MÉTODOS	33
5.1 Local e instalações.....	33
5.1.1 Assentamento no município de Promissão, SP	33
5.2 Obtenção das amostras	34
5.3 Análises Microbiológicas	36
5.3.1 Isolamento bacteriológico	36
5.3.2 Identificação Bacteriana por MALDI-TOF.....	37

5.3.3 Isolamento <i>Campylobacter</i> spp	38
5.3.4. Antibiograma - Impregnação de discos com antibióticos– método Kirky-Bauer .	39
5.4 PCR.....	40
5.4.1 Detecção de <i>Mycoplasma</i> spp. (<i>Mollicutes</i>).....	40
5.4.2 Detecção do gene <i>nuc</i> do <i>S. aureus</i> e dos genes de resistência (<i>mecA</i> e <i>blaZ</i>)	41
5.4.3 Sequenciamento pelo método de Sanger.	42
5.5 Análises estatísticas	43
6. RESULTADOS	44
6.1 Local e instalações.....	44
6.2 Obtenção das amostras	49
6.3 Análises Microbiológicas	49
6.3.1 Isolamento bacteriológico.....	49
6.4 Identificação Bacteriana por MALDI-TOF.....	50
6.5 Isolamento <i>Campylobacter</i> spp	52
6.6 Antibiograma - Impregnação de discos com antibióticos– método Kirky-Bauer	52
6.7 PCR.....	55
6.7.1 Detecção de <i>Mycoplasma</i> spp. (<i>Mollicutes</i>).....	55
6.7.2 Detecção do gene <i>nuc</i> do <i>S. aureus</i> e dos genes de resistência (<i>mecA</i> e <i>blaZ</i>) aos antimicrobianos	55
6.7.3 Sequenciamento pelo método de Sanger.	58
6.8 Análise estatística	58
7. DISCUSSÃO	62
8. CONCLUSÃO	68
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

1. INTRODUÇÃO

O Brasil figura entre os maiores produtores de leite do mundo. Em 2019, foram produzidos mais de 34 bilhões de litros de leite no país e cabe salientar a favorável relação comercial com países importadores, situando o país na condição de nação exportadora do agronegócio mundial. A exigência cada vez maior de alimentos de qualidade, por parte dos agentes comerciais internacionais, requer do país rigoroso controle do leite e derivados produzidos. O volume de leite movimentado no comércio internacional é bastante significativo, pois constitui, junto a seus derivados, importante fonte de nutrientes para a população mundial (FAO, 2019).

A produção de leite no Brasil se caracteriza por elevada heterogeneidade, em termos de mercado (produção, preços e consumo) e a baixa produtividade se torna fator limitante para que o produtor alcance melhores rendimentos (CARVALHO; ROCHA; CARNEIRO, 2018).

Apesar dos bons índices da produção leiteira do rebanho bovino nacional, ainda existem limitações de ordem genética, de manejo, nutrição e sanidade, sendo que, referente a este último aspecto, a mastite é a enfermidade que causa os maiores prejuízos à pecuária leiteira. Esta afecção da glândula mamária determina perdas econômicas decorrentes da redução na produção de leite (até 70%), gastos com medicamentos e assistência veterinária (8%), descarte do leite contaminado após tratamento (8%) e descarte de animais (14%). Medidas de controle baseadas na higiene da ordenha, bem como a utilização de substâncias antimicrobianas, têm reduzido a ocorrência de mastite, mas ainda é necessário o aprimoramento destes métodos para a obtenção de resultados mais efetivos (PHILPOT, 1984; COSTA, 1991).

Praticamente todos os casos de importância econômica são causados por microrganismos, tanto que a mastite infecciosa, além de ocorrer em maior quantidade em relação às demais, constitui problema de saúde pública, pois muito dos microrganismos presentes no leite de vacas acometidas são patogênicos ou podem produzir toxinas prejudiciais ao homem (COSTA, 1991).

As principais alterações no leite devido à mastite incluem a presença de grumos, alteração da cor e aumento da quantidade de leucócitos. Embora possam ocorrer alterações visíveis relacionadas à glândula mamária, como aumento de volume, dor, calor e rubor, em vários casos os processos de mastite não são detectados por inspeção e palpação do úbere ou por inspeção do leite, sendo considerados como casos de mastite

subclínica, que são diagnosticados somente por meio de provas indiretas do leite. Desta forma, a mastite pode manifestar-se sob as formas clínica ou subclínica (RADOSTITS et al., 2002).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Panorama atual da produção leiteira no Brasil e no Estado de São Paulo

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de leite, com mais de 34 bilhões de litros por ano, produção em 98% dos municípios brasileiros e com predominância de pequenas e médias propriedades, com mais de um milhão de estabelecimentos produtores de leite (BRASIL, 2021). Dados da pesquisa do leite do IBGE para o terceiro trimestre de 2022, apontam volume total de leite captado de aproximadamente 6 bilhões de litros, queda de 3,4% na captação de leite cru resfriado, em relação ao mesmo período de 2021, que registrou volume total de 6,2 bilhões, como mostra a Figura 1 (MILKPOINT, 2022). Essa diminuição da produção de leite nos anos de 2021 e 2022 pode ter sido agravada devido à pandemia, onde houve aumento do desemprego e diminuição do pagamento do auxílio emergencial pelo governo federal às famílias mais necessitadas. Esse agravante mostra que a situação econômica do país, afetada não só pela pandemia, mas também por má condução na política socioeconômica do país, que levou à inesperada redução do consumo, não só de derivados lácteos, como iogurte e queijo, como normalmente acontece nos momentos de queda de poder aquisitivo, mas também de leite fluido. Há estimativa de queda de renda das famílias de 20%, o que pode afetar ainda mais o mercado (SILVA, 2022).



Figura 1- Dados da produção de leite tabulado no período de 2016 a 2022 (Milkpoint, 2022)

Segundo o Censo Agropecuário, de 2017, quase 4 milhões de estabelecimentos, 77% das propriedades agropecuárias brasileiras são de grupos familiares. Dado que confirma a importância dessa economia para o abastecimento interno do Brasil. A relação especial que o agricultor mantém com a terra, sendo seu local de moradia e trabalho, faz com que a agricultura familiar tenha características diferentes em relação à agricultura não familiar. Normalmente, os cuidados com a propriedade e a atividade produtiva é compartilhada entre os membros da família e se torna a principal fonte de renda (SEAD, 2016).

A região noroeste do Estado de São Paulo

Segundo dados do Instituto de Economia Agrícola, em 2021, a produção leiteira no Estado de SP foi de 1.537.947.180 litros de leite, tendo seu valor estimado em R\$ 3.275.827.493,40. A Região Administrativa (RA) de Bauru, a qual pertence o município de Promissão, foi responsável, neste mesmo período, pela produção de mais de 33 milhões de litros de leite, no valor de mais de R\$ 71 milhões

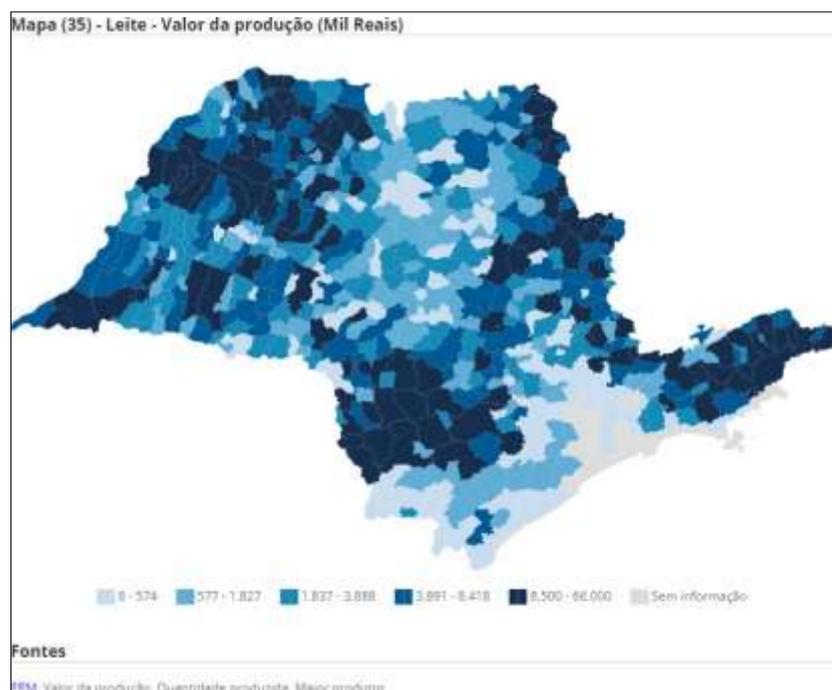


Figura 2. Mapa do Estado de São Paulo – Valor da Produção Leiteira (mil reais) em: <http://ciagri.iea.sp.gov.br/bancodedados/>

2.2 Fatores de risco que afetam a produção de leite

Considerado alimento completo, o leite de boa qualidade deve seguir padrões sensoriais, nutricionais, físico-químicos e microbiológicos, além de possuir sabor agradável, ausência de agentes patogênicos, baixa carga microbiana, alto valor nutritivo, assim como reduzida contagem de células somáticas (ZOCCHÉ et al., 2002).

As instruções normativas (INs) mais recentes, IN 76 e IN 77 de 26 de novembro de 2018 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), referem-se a otimizar e facilitar a produção, bem como aumentar a qualidade do leite oferecido e, com isso, trazer benefícios para o produtor e o consumidor (BRASIL, 2018).

No Brasil, a baixa qualidade do leite é reconhecida em todo território nacional; a comercialização do leite cru é proibida, pois a presença de bactérias no leite *in natura* é alta e sua ingestão, nesta condição, pode acarretar risco à saúde humana. A falta de informação e questões culturais, principalmente em regiões subdesenvolvidas, fazem o seu consumo persistir (OLIVEIRA et al., 2020).

A produção e a composição do leite de vaca são influenciadas por vários fatores ligados ao indivíduo, como raça, genética, estágio de lactação, número de lactações, idade e fatores ambientais, como temperatura, umidade, radiação solar. Fatores fisiológicos e patológicos também podem influenciar na qualidade do leite como má higiene na ordenha, presença de mastite, fatores zootécnicos relacionados ao mau manejo nutricional, potencial genético dos rebanhos e fatores relacionados à obtenção e armazenagem do leite (KITCHEN, 1981).

2.3. Ordenha e transporte

A ordenha do animal pode ser manual, sistema de baixo custo, porém bastante demorado e trabalhoso, com maiores riscos de contaminação microbiológica devido, principalmente, à falta de higienização do ordenhador. O sistema de ordenha mecanizado é realizado por ordenhadeiras e requer investimento maior, porém o risco de contaminação é menor e a velocidade de extração é maior. O sistema robotizado, com alta tecnologia empregada, tem risco de contaminação diminuído e a velocidade de extração também é alta, há pouca influência do homem no processo, mas não é indicado para propriedades pequenas devido ao seu alto custo de instalação e manutenção (DRECHSLER, 2013).

O ambiente da ordenha deve ser uma estrutura adequada para que o ordenhador possa realizar todos os procedimentos necessários e garantir o bem-estar animal, sua segurança, além da qualidade do produto, com a desinfecção dos tetos dos animais, verificação de mastite por meio de testes de fundo de caneca ou *California Mastitis Tests* (CMT) no do início da ordenha.

A qualidade do leite necessita de bom manejo de ordenha para que possa reduzir o risco de contaminação microbiana; dessa forma é uma das tarefas mais importantes numa fazenda leiteira (SANTOS; FONSECA, 2007).

O transporte do produto para o tanque de resfriamento não deve ter contato com meio externo, além da limpeza e desinfecção das instalações pós-ordenha (ROSA et al., 2012). A temperatura ideal nos tanques resfriados das propriedades, deve ser de 4°C. No transporte até o laticínio também deve ser respeitada a temperatura de até 7°C admitindo-se excepcionalmente até 9°C (BRASIL, 2019a).

2.4 Parâmetros da composição físico-química do leite

O leite cru deve atender aos parâmetros sensoriais, sendo um líquido branco opalescente, homogêneo, de odor característico e ter, no mínimo, 3,0g/100g de gordura; 2,9/100g de proteína total; 4,3/100g de lactose anidra; 8,4/100g de sólidos não gordurosos; 11,4g/100g de sólidos totais e acidez titulável entre 0,14 - 0,18, entre outros (BRASIL, 2018)

De acordo com Noro et al. (2006), o conhecimento da composição do leite é essencial para a determinação de sua qualidade, pois define diversas propriedades organolépticas e industriais. Conforme Glantz et al. (2009), a composição do leite determina as suas propriedades tecnológicas de processamento de seus subprodutos como queijo, manteiga, iogurte, entre outros produtos lácteos.

Um dos fatores que podem influenciar as características físico-químicas do leite é a mastite que, frequentemente, é acompanhada por aumento da contagem de células somáticas (CCS), influenciando negativamente a composição do leite, a atividade enzimática, tempo de coagulação, a produtividade e a qualidade dos derivados lácteos. (KITCHEN, 1981)

São chamadas células somáticas todas as células que estão presentes no leite, desde as originárias da corrente sanguínea, como leucócitos, até as células de descamação do epitélio glandular secretor. Quando há alteração na permeabilidade capilar, os

leucócitos migram da corrente sanguínea para o tecido mamário. Desta forma, ocorre o aumento da contagem do CCS no leite, possibilitando o diagnóstico da mastite subclínica e, conseqüentemente, definindo a qualidade do leite vendido a granel.

As indústrias de laticínios realizam testes de rotina no tanque das propriedades e assim, informam ao produtor sobre a qualidade do leite e a possibilidade da presença de vacas com mastite subclínica no rebanho, pois se trata de indicador confiável da sanidade da glândula mamária (SANTOS; FONSECA, 2007). Os métodos de identificação das células somáticas podem ser o CMT e os contadores eletrônicos industriais (MEGID et al, 2020). A CCS, realizada mensalmente no rebanho leiteiro, é procedimento indispensável para estimar índices epidemiológicos que possibilitem estudar a dinâmica da mastite no plantel (MEGID et al., 2020).

Segundo a IN 76 de 26 de novembro de 2018, o leite cru refrigerado de tanque individual ou de tanque coletivo, deve apresentar médias geométricas trimestrais, de contagem de células somáticas de, no máximo 500.000 CS/mL (BRASIL, 2018), sendo que, no leite normal, a CCS é menor do que 200.000 CS/mL (MEGID et al, 2020).

2.5 Mastite

O maior dos problemas causados pela má higiene antes, durante e pós-ordenha e que compromete a produção e a qualidade do leite é a mastite bovina (MENEZES et al., 2015). Define-se mastite como a inflamação da glândula mamária, de etiologia complexa, múltipla, que resulta da interação entre o animal, o meio ambiente e os microrganismos. É caracterizada por alterações físico-químicas, organolépticas, na celularidade do leite e patológicas no parênquima mamário de animais domésticos (MEGID et al., 2020).

A mastite pode ter origem fisiológica, traumática, hormonal, alérgica e infecciosa, sendo esta última a mais preocupante, visto que há mais de 140 microrganismos envolvidos que podem ser classificados, de acordo com sua forma de transmissão, como contagiosos ou ambientais (REBHUN, 1995; MEGID et al, 2020).

A mastite pode ser classificada como clínica ou subclínica, com base na presença de alterações no aspecto do leite, glândula mamária e/ou animais, sendo que os sinais clínicos são microrganismo-dependentes (MEGID et al., 2020). Na forma clínica, o animal apresenta sinais clássicos da doença, como dor, edema, endurecimento e temperatura aumentada da glândula mamária, podendo haver secreção, grumos e outras alterações físicas no leite. O animal pode apresentar inapetência, perda de peso e conseqüente diminuição da produção de leite (SIMÕES; OLIVEIRA, 2012). Já a mastite

subclínica acontece quando a inflamação não causa sinais clínicos evidentes, mas há diminuição da produção leiteira e pode ser diagnosticada pelo aumento de células somáticas (por meio do CMT), e por isolamento e identificação bacteriana (SANTOS, 2006). Segundo Radostits et al. (2007), o exame microbiológico do leite é o método padrão para o diagnóstico da mastite bovina e é através dele que se pode conhecer o estado do rebanho com relação à enfermidade, além de possibilitar a coleta de dados importantes para que se possa tomar decisões estratégicas no manejo e tratamento, além da prevenção de novos casos. (BRITO, 2009). Além do cultivo microbiológico, a ferramenta de diagnóstico por espectrometria de massa (MALDI-TOF), auxilia, com concordância de 95,4 a 99,3% em comparação a caracterização fenotípica convencional ou métodos de identificação genotípica, na identificação bacteriana (WILSON, et al. 2019).

Os microrganismos contagiosos são aqueles que colonizam o úbere, podendo ser transmitidos entre as vacas através do equipamento de ordenha ou das mãos do ordenhador, citando-se como exemplos mais importantes : *Staphylococcus aureus* e outros estafilococos, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Corynebacterium bovis* e *Mycoplasma* sp. Os agentes ambientais podem colonizar o úbere da vaca por via ascendente ou por equipamentos não-higienizados, que invadem a glândula e multiplicam-se, causando a infecção. Estes agentes ambientais incluem membros da família *Enterobacteriaceae* e outros Gram negativos (como *Pseudomonas aeruginosa*), além de *Streptococcus* ambientais, fungos, algas do gênero *Prototheca* e *Actinomyces pyogenes*, originários do solo, fezes, urina, equipamento de ordenha e água (REBHUN 1995; CUNHA et al., 2016).

2.5.1 *Staphylococcus* spp.

Destacam-se as espécies de estafilococos como causadoras frequentes da mastite em animais de produção (LANGONI et al., 2006). Estão presentes no ambiente, na microbiota das mucosas e na pele do úbere e tetos dos animais, o que predispõe à infecção no momento da ordenha (MEGID, 2020).

O gênero *Staphylococcus* é formado por 52 espécies e 28 subespécies, são cocos Gram positivos, imóveis, pertencentes à família Micrococcaceae, não formadores de esporos e catalase positiva. Esses microrganismos ocorrem na forma de células isoladas, em pares, tétrades e em cadeias curtas, porém, aparecem predominantemente em grupos semelhantes a cachos de uva (WINN et al., 2008). No cultivo microbiológico, em ágar

sangue, são observadas colônias de 1 mm de diâmetro, circulares, convexas, pigmentadas, podendo ser amarelas, brancas ou douradas e produtoras de hemólise, total ou parcial, ao redor das colônias. Bioquimicamente, *S. aureus* são produtores de hemólise, catalase, coagulase em tubo, não produtores de oxidase e resistentes a discos de bacitracina. (QUINN, 2005)

Estes organismos são causadores, geralmente, da mastite subclínica, onde não há alterações macroscópicas no leite, na glândula mamária ou comprometimento sistêmico do animal (BERGONIER et al., 2003; MURICY, 2003; MOTA et al., 2012). Além disso, há o risco de contaminação dos equipamentos e utensílios, e possibilidade de veiculação do patógeno pelo leite e derivados para os seres humanos, podendo desencadear casos de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar, as DTHAs (ADAMS; MOSS, 2008).

Cerca de 75% das novas doenças que têm afetado os seres humanos ao longo dos últimos 10 anos foram causadas por patógenos provenientes de um animal ou produtos de origem animal e, todos os anos, milhões de pessoas adoecem em razão das zoonoses de origem alimentar. A análise microbiológica de um alimento visa investigar a presença de um determinado micro-organismo em um produto, assim como identificar e caracterizar as diferentes espécies a fim de rastrear as condições de higiene em que o alimento foi processado e os prováveis riscos à saúde do consumidor (GERMANO, 1993; OMS, 2009).

Staphylococcus spp. são micro-organismos largamente distribuídos na natureza, sendo transmitidos aos alimentos por manipuladores (que na maioria dos casos são portadores assintomáticos), pois fazem parte da microbiota transitória e residente do homem, e também por animais, principalmente o gado leiteiro com mastite, apresentando alto número de micro-organismos no leite (STAMFORD et al., 2006). *S. aureus*, espécie coagulase-positiva, é o mais comumente associado a casos de surtos de intoxicação alimentar devido à habilidade de muitas de suas cepas produzirem vários tipos de enterotoxinas (SE) (OMOE et al., 2005), porém existem trabalhos disponíveis na literatura (CARDOSO, 1999; SENA, 2000; CARMO, 2001; PIMENTEL et al., 2002) comprovando a toxigenicidade das espécies coagulase-negativas e por este motivo tais estafilococos não devem ser ignorados, especialmente se forem encontrados em grande número no alimento indicando, principalmente, precárias práticas de higiene por parte dos manipuladores (JAY, 2000).

O consumo de leite e derivados com a presença de estafilococos produtores de enterotoxinas, podem desencadear intoxicações alimentares. (FETSCH; JOHLER, 2018)

Atualmente, órgãos internacionais como WHO (World Health Organization), ICMSF (International Committee on Microbiological Specification for Foods) e APHA (American Public Health Association) recomendam padrões e métodos de análise microbiológica, tanto clínica quanto de alimentos, para a rotina laboratorial, testes bioquímicos mínimos para diferenciação na área clínica de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. saprophyticus* e em análise de alimentos o *S. aureus* e *S. epidermidis*, entre outros (BRASIL, 2001; SILVA, et al., 2010).

Relata-se que *S. aureus* são responsáveis por 50% dos casos de mastites, e somente de 10% a 30% dos casos são resolvidos com o uso de antibióticos (GOMES; HENRIQUES, 2016; MELLA et al., 2017).

Além dos estafilococos, é importante salientar a participação de outros agentes patógenos na mastite.

2.5.2 – *Streptococcus* spp.

São considerados patógenos de grande importância na medicina veterinária e humana, considerados comensais de trato respiratórios e pele. Se apresentam como cocos Gram positivos, catalase e oxidase negativos, exigentes, anaeróbios facultativos, imóveis, não esporulados, fastidiosos e que requerem adição de sangue de carneiro no meio de cultivo (QUINN et al., 2005; WINN et al., 2008).

S. agalactiae, *S. dysgalactiae* e *S. uberis* são os principais envolvidos na mastite estreptocócica; em todos os casos estão relacionados a mastite subclínica, de evolução aguda e/ou crônica, dependendo do agente envolvido (MEGID, 2020).

2.5.3 *Corynebacterium* spp.

São bactérias Gram positivas pleomórficas, pequenas, em forma cocóide de clava ou bacilos, e em esfregaços corados lembram letras chinesas pela disposição em pares. A maioria é catalase positiva, oxidase negativa, não esporulada, anaeróbia facultativa e imóvel. As colônias, em crescimento em meio de ágar, assumem uma coloração

esbranquiçada e seca, podendo apresentar hemólise quando cultivadas em ágar acrescido de sangue de carneiro a 5% (QUINN et al., 2005; WINN et al., 2008).

Causador da mastite subclínica, *Corynebacterium bovis*, apresenta colônias pequenas, brancas e secas, sem formação de hemólise quando cultivado em ágar sangue a 5%. Apresenta alta taxa de infecção, extremamente contagioso durante a lactação, colonizando o úbere por longos períodos. Uma característica importante está relacionada a sua baixa virulência, com acometimento do canal e cisterna do teto, elevando o aumento de células somáticas dos tetos afetados, porém, sem comprometimento de outros sistemas do animal, em geral, *Corynebacterium* spp. é considerado um patógeno secundário que infecta principalmente vacas durante a lactação (MEGID, 2020).

2.5.4 *Campylobacter* spp.

O gênero *Campylobacter* pertence à família Campylobacteraceae da classe Proteobacteria. Constitui-se de bacilos Gram-negativos curvos em forma de “S”, asa de gaivota ou espiral, medindo entre 0,2 a 0,9 µm de largura por 0,5 a 5 µm de comprimento, que se movem por flagelação. Não formam esporos e em culturas antigas assumem formas cocóides ou esféricas. Apresentam metabolismo do tipo respiratório, são oxidase e catalase positivo e não utilizam carboidratos como fonte de carbono (CALIL et al., 2008)

Campylobacter spp. exige baixa tensão de oxigênio para se multiplicar devido ao fato de ser microaerófilo, sendo a atmosfera ideal, a que contém aproximadamente 5% a 10% de oxigênio e 3% a 5% de gás carbônico. Apresenta sensibilidade ao pH ácido, abaixo de 4,9 e à desidratação; sendo a aw ideal de 0,997 (CALIL et al., 2008). O gênero *Campylobacter* é constituído por 30 espécies, onde *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. fetus* subsp. *fetus*, *C. hyointestinalis* e *C. fennelliae* são consideradas as espécies mais envolvidas em doenças nos humanos. Todas as espécies de *Campylobacter* se desenvolvem a 37°C, ressaltando o *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari*, consideradas espécies termofílicas, cuja temperatura ótima de multiplicação oscila entre 42°C e 43°C. Não são capazes de se multiplicar abaixo de 28°C, resistem mal à temperatura ambiente e, as temperaturas de cocção e de pasteurização são letais para as células bacterianas.

Campylobacter jejuni e *C. coli* são as mais frequentes espécies de *Campylobacter* isoladas em humanos com gastroenterite. Essas espécies podem colonizar o trato intestinal de muitos animais, principalmente das aves domésticas e silvestres, e dos mamíferos, em particular os utilizados para a alimentação do homem, como bovinos, caprinos, ovinos e suínos (OMSA – antiga OIE, 2008). Atribui-se como fonte de transmissão para o ser humano, o contato direto com animais portadores, o consumo de água e alimentos de origem vegetal e animal contaminados, carnes de aves mal processadas e a ingestão de leite não pasteurizado. *Campylobacter jejuni* já foi isolado de casos de mastite bovina (CALIL et al., 2008, OMSA – antiga OIE, 2008).

2.5.5 *Mycoplasma* spp.

Microrganismos do gênero *Mycoplasma* são considerados causadores de patologias reprodutivas em várias espécies animais economicamente explorados e entre elas estão as mastites. São enfermidades que afetam diretamente a economia de uma propriedade, resultando em queda progressiva da produção e alteração na qualidade do leite. Assim sendo, animais acometidos por esta patologia podem resultar em prejuízos econômicos para os produtores (AYLING, 2008).

Um dos desafios no combate às mastites bovinas por *Mycoplasma* é a resistência a antibióticos comumente utilizados no tratamento. Essa resistência compromete a eficácia dos protocolos terapêuticos convencionais, tornando o controle da infecção mais complexo. Além disso, os micoplasmas, associados à casos de mastite, possuem a capacidade de persistir no ambiente, aumentando o risco de reinfecções. A doença pode levar a complicações graves, como a mastite crônica, que pode resultar na perda de produção leiteira e até mesmo no descarte precoce de animais infectados (PARKER, 2018).

2.5.6 - *Pasteurella* spp.

As espécies de *Pasteurella* spp. são cocos bacilos Gram negativos exigentes, imóveis, oxidase positiva e anaeróbios facultativos e a maioria é catalase positiva. O microrganismo é isolado em ágar suplementado com sangue ovino a 5% entre 24-48 horas, em aerobiose a temperatura de 37°C. As colônias são pequenas, translúcidas ou acinzentadas, com odor cítrico ou adocicado (QUINN et al., 2005; WINN et al., 2008).

A maioria das espécies é comensal de mucosas do trato respiratório superior de animais e geralmente tem a infecção relacionada a fatores imunossupressores, incluindo deficiências nutricionais, extremos ou variações de temperaturas, condições estressantes no transporte dos animais e participações em feiras, exposições ou outros eventos de aglomerações. Em bezerros é responsável pelos casos de pneumonia enzoótica (SALERMO, et al. 2008). Na literatura são escassos os relatos de mastite por pasteurelose. Ribeiro et al. (2010) relataram que a presença de *Pasteurella* como causador de mastite pode estar associado a microbiota oral dos bezerros no momento da amamentação ou por transmissão do patógeno das vias respiratórias das vacas. Menos frequente, a contaminação pode ser ascendente, por contaminação de ambientes ou utensílios contaminados (SALERNO et al, 2008). Geralmente a presença de mastite por *Pasteurella* está relacionada a presença do bezerro ao pé. Maroney et al. (2003) reportaram que a mastite pode ser causada também por via hematogena ou linfática.

A presença da *Pasteurella* pode causar mastite clínica grave, aguda, podendo levar à agalaxia nos tetos, fibrose e atrofia do parênquima mamário. Os animais podem ainda apresentar febre, taquicardia e dificuldade respiratória. O leite pode apresentar coloração anormal, com presença de grumos, flocos e aspecto aquoso. (RADOSTITIS et al. 2007).

2.6 Genes de resistência bacteriana aos antimicrobianos

A resistência antimicrobiana é a capacidade de um microrganismo crescer ou sobreviver na presença de um antimicrobiano, numa concentração que geralmente é suficiente para inibir e inativar microrganismos da mesma espécie. Quando bactérias são expostas ao antimicrobianos, as sem resistência natural serão mortas e aquelas com resistência irão prosperar em um ambiente de competição reduzida. O mal-uso de antimicrobianos tem aumentado e acelerado o processo de resistência, tornando-a ameaça grave à saúde pública (ALMEIDA, 2021).

A resistência à penicilina foi detectada logo após o início de seu uso na década de 40, na medicina humana. Tal resistência era mediada pela aquisição de genes que codificavam enzimas, inicialmente conhecidas como penicilinases, agora chamadas β -lactamases. Na década de 1950, a produção de penicilinases pelos *S. aureus* passou a predominar nas cepas isoladas de pacientes hospitalizados.

Em 1960, a meticilina foi lançada no mercado como alternativa terapêutica para cepas produtoras de penicilinase, uma vez que esse fármaco não sofre ação dessa enzima. Porém, já em 1961, relatos de cepas também resistentes à meticilina passaram a ser descritos e foram identificados os denominados *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) (ANVISA, 2001).

Na medicina veterinária, os principais antimicrobianos usados em tratamentos de mastites no Brasil, pertencem ao grupo as penicilinas, cefalosporinas, aminoglicosídeos, fluorquinolonas, tetraciclina e sulfonamidas. A penicilina e seus derivados pertencem ao grupo de antimicrobianos cuja presença de resíduos pode causar reação de hipersensibilidade em humanos (MEGID et al., 2020). Os antibióticos β -lactâmicos são amplamente utilizados há várias décadas em tratamentos das mastites, porém, sua eficácia está reduzida devido à síntese de β -lactamase, codificada pelo gene *blaZ* (OLSEN et al.; 2006). Outros mecanismos de resistência aos β -lactâmicos, resistência à meticilina/oxacilina, são mediados pela proteína ligadora de penicilina de baixa afinidade, codificada pelo gene *mecA* (SAWANT et al.; 2009).

A resistência do *S. aureus* à meticilina foi inicialmente reportada em vacas em 1972, ao que se seguiram diversos relatos associadas ao uso indiscriminado da meticilina em produtos de origem animal e sua capacidade de transferência de seus genes de resistência aos seres humanos, como por exemplo a meticilina (MRSA) (KWON et al., 2005; SILVA et al., 2018).

A resistência de cepas ocorre devido aos tratamentos das mastites subclínicas durante a lactação, utilizados para encurtar a duração da infecção intramamária, considerados como importante componente dos programas de controle de mastites (REIS; SILVA; BRESCIA, 2003). Em geral, dentre as medidas recomendadas para o controle das mastites produzidas pela maioria dos organismos, incluem-se as medidas higiênicas, no entanto, esses procedimentos não são eficazes contra as infecções intramamárias produzidas por microrganismos de origem ambiental ou oportunistas como *Streptococcus uberis*, *S. dysgalactiae* ou coliformes.

Assim, a utilização de antimicrobianos no tratamento da mastite bovina é recomendada em casos agudos, subagudos, recorrentes e em programas de controle de mastite. No tratamento e controle desta afecção, uma ampla variedade de medicamentos tem sido empregada, muitas vezes de forma indiscriminada e inadequada, impedindo em alguns casos, a resolução do problema ou conduzindo ao agravamento do quadro, além da já mencionada resistência microbiana (FERREIRO, 1978; SCHOCKEN-ITURRINO; NADER FILHO, 1984; COSTA et al., 1995; COSTA, 1996). O efeito terapêuticodepende da escolha do fármaco, do uso e dosagem adequados, deixando a antibioticoterapia como assunto de debate (DU PREEZ, 2000).

3. JUSTIFICATIVA

A produção leiteira sofre grandes entraves econômicos, tanto da porteira para dentro, quanto da porteira para fora, o que reflete a dificuldade do produtor em alcançar a qualidade e sanidade no leite e valorizar o produto na comercialização. As legislações vigentes impõem parâmetros na produção e armazenamento do leite que podem trazer dificuldades aos pequenos produtores para competir no mercado, que acabam por recorrer à clandestinidade para obter destino rápido ao seu produto perecível, evitando maiores perdas financeiras.

Dessa forma, o presente projeto pretende auxiliar os produtores de assentamento com o diagnóstico microbiológico, o antibiograma e detecção dos genes de resistência aos antimicrobianos como do *S. aureus*, com intuito de levar melhores ferramentas e esclarecimentos para que o pequeno produtor possa concorrer no mercado do leite, além de promover a transferência de conhecimento, como ferramenta de educação sanitária.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar a condição sanitária de pequenas propriedades leiteiras com problemas na produção, em assentamento da região noroeste do Estado de São Paulo, a fim de implementar melhorias na sanidade do rebanho, na qualidade do leite e produtividade, visando agregar valor comercial ao produto final, promovendo transferência do conhecimento e educação sanitária.

4.2 Objetivos específicos

- Selecionar propriedades do local de estudo e realizar visitas técnicas, a fim conhecer a problemática da produção leiteira, em relação à mastite,
 - Realizar Califórnia Mastites Test (CMT) para selecionar os animais com mastite subclínica,
 - Realizar o cultivo bacteriológico para o isolamento de bactérias aeróbias;
 - Realizar a identificação bioquímica por métodos convencionais e por Maldi-tof das bactérias isoladas das amostras de leite de animais com mastite;
 - Realizar isolamento de *Campylobacter* spp;
 - Realizar o antibiograma pelo método de difusão em disco (Kirky-Bauer) das cepas de *S. aureus*;
 - Detectar por PCR o DNA bacteriano do gênero *Mycoplasma* spp.;
 - Detectar por método de genotipagem das cepas de *S. Aureus*: o gene do *S. aureus* (*nuc*); os genes da resistência bacteriana: metilina(*mecA*), β lactamases (*blaZ*) e realizar o sequenciamento pelo método de Sanger;
 - Comparar, através da análise estatística com testes não-paramétricos de qui-quadrado e teste G, a proporção de positividade para os diferentes isolados e genes de resistência entre as propriedades e o isolamento microbiológico x Maldi-tof.

.....

5. MATERIAL E MÉTODOS

“Projeto Saber dá Leite”

O Programa de Sanidade em Agricultura Familiar (PROSAF) é desenvolvido pelo Instituto Biológico, desde 2009, atendendo às mais variadas necessidades sanitárias, de pequenos produtores do Estado de São Paulo.

Em 2018 foi firmada uma parceria, sem fins lucrativos e conflitos de interesse, entre o IB, através dos pesquisadores científicos e empresa farmacêutica multinacional, a fim de buscar soluções para os casos de mastite na região do Vale do Paraíba (SP).

A partir desse projeto bem sucedido, fomos convidados a atuar em um assentamento rural, na região NO do Estado, com o intuito de auxiliar os proprietários, identificando as principais causas da perda na produção de leite.

Assim, o projeto “Saber dá Leite” foi criado, e foram realizadas visitas técnicas para entendimento da realidade das propriedades, em relação à produção leiteira, com o intuito de auxiliar na resolução de problemas e promovidos “Dias de Campo”, com esclarecimento das dúvidas.

5.1 Local e instalações

5.1.1 Assentamento no município de Promissão, SP.

No município de Promissão, localizado na região noroeste do Estado de São Paulo, existe o Assentamento Reunidas, com ocupação das áreas há 26 anos, onde produtores de leite mantêm sistemas produtivos simples em áreas de seis alqueires, aproximadamente (Figura 3). A mão de obra é basicamente familiar, de segunda e terceira geração e que apresenta forte presença das mulheres nas atividades. As instalações das propriedades são, em sua grande maioria, simples e a raça bovina predominante é de gado girolanda, com sistema de criação extensivo e a ordenha mecânica realizada duas vezes ao dia.

O regime hídrico da região se caracteriza por períodos de secas severas, com solo arenoso. A produtividade é considerada média, basicamente de subsistência, onde as plantações de milho e quiabo se destacam.

Os proprietários foram consultados pelo Médico Veterinário responsável pelo assentamento e, as propriedades dos que aceitaram participar do estudo, foram visitadas.

Selecionaram-se cinco propriedades (denominadas A, B, C, D e E), com cerca de 50 animais cada, que apresentavam problemática em relação à contagem bacteriana total dos leites produzidos e comercializados, e consequentemente, recusa pelos laticínios

devido à baixa qualidade do produto.

Em uma primeira visita, foram observados fatores que poderiam ser significantes na qualidade do leite ordenhado, como a estrutura e limpeza do local, da sala de ordenha, do tanque de armazenamento, além da presença de outras espécies animais no ambiente. Por meio de conversas informais, as dificuldades encontradas na atividade foram relatadas. Nas demais visitas, o teste do CMT e a ordenha foram acompanhados e amostras de leite foram coletadas.



Figura 3 – Mapa da região de Promissão – SP e os assentamentos (Prefeitura Municipal de Promissão, 2022).

5.2. Obtenção das amostras

A seleção dos animais com mastite foi realizada por meio do California Mastitis Test (CMT - Tadabras®), no momento anterior à ordenha do leite. Todos os animais que apresentassem no leite, características de “distintamente positiva” a “forte positiva” (Quadro 1), tiveram amostras coletadas (Figura 4). Para a coletas das amostras foi realizada a limpeza do teto com solução antisséptica e secagem com papel toalha, desprezando-se o primeiro jato de leite antes da coleta. Os leites (5 mL) foram coletados em frascos estéreis identificados com o nome e teto coletado de cada animal. As amostras de leite foram encaminhadas em caixa térmica, com gelo reciclável, ao Laboratório de Bacteriologia Geral do Instituto Biológico de São Paulo para processamento das análises microbiológicas.

Quadro 1. Metodologia de interpretação do teste de CMT, conforme a bula do fabricante do kit, utilizado no presente estudo, São Paulo, 2023.

Símbolo	Significado Sugerido	Descrição da reação visível	Interpretação
-	Negativo	A mistura fica líquida	0-200.000 cells/mL 0-25% PMN
T	Traços	Leve aglutinação se forma, havendo tendência de reação de traços a desaparecer com o movimento do fluido.	150.000-500.000 cells/mL 30-40% PMN
1	Fraca	Há leve aglutinação, mas não forma gel. Com o movimento contínuo da bandeja, a reação pode desaparecer.	400.000-1.500.000 cells/mL 40-60% PMN
2	Distintamente positiva	A mistura aglutina-se rapidamente com a formação de gel. A mistura tende a ficar na periferia do copo quando o movimento para.	800.000-5.000.000 cells/mL 60-70% PMN
3	Forte Positiva	A aglutinação da mistura é forte, tomando forma convexa. Tende a formar um pico no centro da mistura após a parada de movimento. A viscosidade é intensa, ficando fortemente aderida no fundo do copo.	Acima de 5.000.000 cells/mL 70-80% PMN
+	Leite Alcalino	Este símbolo deve ser adicionado ao resultado do CMT quando a reação é alcalina, ou seja, fortemente roxa.	Uma reação alcalina reflete depressão da atividade secretória. Isto pode ocorrer por causa de inflamação ou pela glândula seca.
Y	Leite Ácido	Violeta de Bromocresol é distintamente amarela no pH=5,2. Este símbolo deve ser adicionado quando a mistura é amarela.	Leite ácido no úbere é raro. Quando encontrado, é indicativo de fermentação da Lactose por ação de bactérias.

Fonte: Tadabras, São Paulo, 2023.

5.3. Análises Microbiológicas

5.3.1 Isolamento bacteriológico

Para o isolamento bacteriano, os leites foram semeados em ágar Mueller Hinton acrescido de sangue de carneiro 5% e incubados por 48-72 horas a 37°C, em estufa de aerobiose. Após o período de incubação, havendo proliferação bacteriana neste meio, foram observadas as características morfológicas das colônias como tamanho, forma, coloração, presença e tipo de hemólise (Figura 4). A seguir, foi realizada a identificação bacteriana, corando-se o esfregaço de diferentes colônias pelo método de Gram onde, ao microscópio, foram observadas a morfologia, disposição das células e as características tintoriais ao Gram (QUINN et al., 2005) As espécies bacterianas foram identificadas de acordo com Quinn, et al. (2005) e Winn et al. (2008) por meio das provas de catalase, oxidase, crescimento em ágar Mac Conkey, indol, citrato, urease, Voges Proskauer, fermentação de carboidratos (glicose, maltose, lactose e maltose) e motilidade.



Figura 4: Cultivo bacteriológico dos leites em ágar Mueller Hinton acrescido de sangue de carneiro 5%, São Paulo, 2023.

5.3.2 Identificação Bacteriana por MALDI-TOF

De acordo com a identificação microbiológica preliminar, com base na morfologia e no bioquimismo das colônias, foi realizada a leitura no equipamento. Perfis de massas foram adquiridos com espectrômetro - MALDI-TOFMTB - Smart (Brucker®) (Figura 5) e os espectros brutos foram processados utilizando o programa MaldiBiotyper (Brukers Daltonics).



Figura 5: Equipamento Maldi – Tof BD®, São Paulo, 2023.

Foram obtidos os perfis proteicos das colônias bacterianas com o protocolo de extração com ácido fórmico, descrito por Freiwald & Sauer (2009). As colônias foram identificadas utilizando uma ou duas unidades formadoras de colônias, aplicadas diretamente sobre a placa do MALDI–TOF (Figura 6) e acrescido 1 μ L de ácido fórmico 80%, deixando secar ao ar ambiente. Cada amostra foi coberta com 1 μ L de matriz para MALDI -TOF, o ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (Sigma -Aldrich), na concentração de 5 mg/mL em solução, contendo 50% de acetonitrila e 2,5% de ácido trifluoracético (v/v), e subsequente secagem ao ar.



Figura 6: Placa para leitura no equipamento Maldi – Tof BD®, São Paulo, 2023.

A metodologia utilizada para a identificação bacteriana foi a mesma de Bier et al. (2017). O programa realiza normalização, suavização, subtração da linha de base e colheita de picos, criando uma lista de picos mais significativos do espectro bruto. Para identificar as bactérias desconhecidas, cada lista de picos geradas foi comparada com a lista de picos de espectros de referência, que estão presentes na biblioteca IVD (*In Vitro Diagnostic System Bruker Daltonics*). Nesse processamento, realiza-se a correspondência de padrões de pico, utilizando a posição, as distribuições de intensidade e as frequências de picos, atribuindo-se os escores de classificação, sem intervenção do utilizador

As análises por Biotyper são classificadas utilizando valores de escore proposto pelo fabricante: uma pontuação entre 2,3 e 3,0 indica identificação confiável de espécie; a pontuação entre 2,0 e 2,29 indica a identificação confiável de gênero e provável identificação de espécie, e uma pontuação ente 1,7 e 1,99 indica provável identificação de gênero e abaixo de 1,7 indica que não há identificação confiável.

5.3.3 Isolamento de *Campylobacter* spp.

As amostras de leite foram submetidas ao procedimento bacteriológico para isolamento e identificação bioquímica de *Campylobacter* spp.: 50µL de leite foram semeados em meio ágar Brucella (Difco-BBL - USA), adicionado de 5% de sangue desfibrinado de carneiro e suplemento antibiótico (Laborclin - Brasil) seletivo para *Campylobacter* spp., composto por polimixina B (1.000UI/L), cicloheximida (20mg/L), novobiocina (5mg/L) e bacitracina (15.000UI/L). As placas foram incubadaspor 48-72 horas, em estufa de microaerofilia (5% CO₂, 10% O₂), a 37°C (SCARCELLI

et al., 1998; OIE, 2021). Após o período de incubação, as colônias suspeitas foram classificadas por meio de métodos presuntivos para o gênero *Campylobacter* (coloração de Gram, observação de mobilidade em microscópio de campo escuro e teste de oxidase), e a identificação complementar espécie-específica foi realizada pelas provas bioquímicas: catalase, formação de H₂S em meio de tríplice açúcar ferro (TSI), hidrólise do hipurato, sensibilidade ao ácido nalidíxico (30µg) e à cefalotina (30µg) (OIE, 2012).

5.3.4 Antibiograma - Impregnação de discos com antibióticos – método kirky-bauer

A sensibilidade antimicrobiana por fenotipagem foi realizada pelo método de Kirby-Bauer, com a utilização dos seguintes discos antibióticos: azitromicina (15 µg), tetraciclina (30µg), cloranfenicol (30 µg), eritromicina (15 µg), ampicilina (10 µg), polimixina B (300 unid), sulfazotrim (25 µg), ceftiofur (30 µg), gentamicina (10 mgc), ciprofloxacina (5 µg), penicilina (10 unid), cefalotina (30 µg), estreptomina (10 µg) e neomicina (30 µg) (Figura 7) (BAUER et al., 1966). Os isolados bacterianos foram classificados como: suscetível, intermediário ou resistente, de acordo com a recomendação do fabricante.



Figura 7: Antibiograma das cepas isoladas dos leites através da técnica de Kirby-Bauer, São Paulo, 2023.

5.4. PCR

5.4.1 Detecção de *Mycoplasma* spp. (*Mollicutes*)

O DNA genômico das amostras de leite foi extraído e purificado empregando-se o kit reagente DNAzol® (INVITROGEN), padronizado por Chomkzynski, 1993, seguindo as instruções do fabricante, conforme protocolo abaixo:

- Adicionar 100 µL da amostra em 1 mL de DNAzol
- Homogeneizar por inversão e centrifugar a 10 000 rpm / 10 min.
- Descartar o sobrenadante (RNA, polissacarídeos...) com auxílio de micropipeta
- Adicionar ao pellet, 500 µL de etanol puro gelado
- Homogeneizar por inversão até formar os grumos brancos (DNA) ~6x
- Centrifugar a 4000 rpm/ 2min.
- Descartar o sobrenadante por inversão
- Adicionar ao pellet, 850 µL de etanol 75% gelado
- Centrifugar a 4000 rpm/ 2min.
- Descartar o sobrenadante por inversão
- Adicionar ao pellet, 850 µL de etanol 75% gelado
- Centrifugar a 4000 rpm/ 2min.
- Retirar todo o etanol com a pipeta e aguardar ~1 minuto com o tubo aberto para evaporar o restante de etanol
- Ressuspender o pellet em 100 µL de NaOH 8 mM, passando-o pelo tip
- Neutralizar o pH com ~40 µL de Hepes 0,1 M para ajustar a solução de DNA para pH neutro.

Foi utilizado sistema PCR de triagem (Sistema MGSO/GPO-3) nas amostras clínicas, sistema este que detecta espécies dos gêneros *Mycoplasma*, *Ureaplasma* e *Acholeplasma* (Kuppeveld et al., 1994), tornando assim o resultado mais rápido e econômico.

Para a execução da PCR foi utilizado o protocolo de Kuppeveld et al., 1994. A amplificação foi realizada com um volume final de 50 µl. Para a mistura de reação foram adicionados 50 mM de KCl, 10 mM Tris HCl, 2,5 mM de MgCl₂, 100 pmol de cada primer, 0,2 mM de cada dNTP e 1 unidade (U) de Taq polimerase. O ciclo de temperaturas

utilizados foi: 1 ciclo de 95°C por 15 min.; 30 ciclos de 95°C por 30 seg.; 60°C por 1 minuto; 72°C por 1:30 min e 1 ciclo de 72°C por 10 minutos.

Como controles positivos de reação foram utilizadas estirpes padrão ATCC (American Type Culture Collection) de *Mycoplasma* spp.; o controle negativo foi realizado com uma alíquota da mistura de reação sem aplicação de amostra clínica ou estirpe padrão.

Alíquotas de 10 µl das amostras amplificadas foram analisadas por eletroforese em gel de agarose à 1,3% corado com brometo de etídeo para visualização em transiluminador.

5.4.2 Detecção do gene *nuc* do *S. aureus* e dos genes de resistência (*mecA* e *blaZ*) aos antimicrobianos

A PCR para confirmação de *S. aureus* foi realizada pela detecção do gene *nuc*, que produz termonuclease capaz de degradar DNA e RNA presente em todos os *S. aureus* (HADMAN-PARTIDA et al., 2015; BARBOSA et al., 2019).

Para a detecção do gene de resistência, foram utilizados dois primers, sendo eles: o gene *mecA* - gene da resistência a meticilina do *S. aureus* (MRSA) e para genes do β-lactâmicos, *blaZ*. Dessa forma, os primers utilizados nesse estudo encontram-se no quadro 2, abaixo.

Quadro 2: Primers para confirmação do *S. aureus* (*nuc*) e para detecção dos genes (*mecA* e *blaZ*) de resistência para antimicrobianos, segundo Oliveira et. al. (2016).

Genes	Sequência de oligonucleotídeos (5' – 3')	Produto (pb)
<i>nuc</i>	F: GCGATTGATGGTGATACGGTT R: AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC	270
<i>mecA</i>	F: TCCAGATTACAACCTCACCAGG R: CCACTTCATATCTTGTAACG	162
<i>blaZ</i>	F: TACAACGTGAATATCGGAGGG R: CATTACACTCTTGGCGGTTTC	861

As colônias identificadas no isolamento foram ressuspendidas em solução salina 0,85%, aquecidas em banho seco, a 99° C, por 10 minutos para inativação e liberação do material genético.

Após a extração (fervura), foi realizada a PCR dos genes de resistência utilizando os primers descrito por Oliveira et al. (2016). A amplificação das colônias foi realizada com a utilização de 10 µL de DNA extraído acrescido de 40 µL da mistura de reagentes da multiplex PCR contendo 1,25 U taq DNA polimerase, 200 µM de cada desoxinucleotídeo, tampão (10mM Tris-HCl, pH 8,0; 50mM KCl); 2 mM MgCl₂ e 10 pmol de cada primer. Nessas condições, foi empregado o ciclo de temperaturas da amplificação: desnaturação inicial de 94°C por 5 min., seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 seg., anelamento a 54°C por 1 min., extensão a 72°C por 1 min., e extensão final por 72°C por 7 minutos. Alíquotas de 10µL das amostras amplificadas foram homogeneizadas com 1 µL corante glicerinado (Blue juice – Invitrogen ®) e submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1,0%, adicionado de TBE 0,5X (0,0045 M TRIS-Borato e 1mM de EDTA ph 8,0), 1,0% acrescido de Gel red 10.000X (Uniscence ®) na concentração de 1:125. A visualização das bandas foi realizada em transluminador de luz ultravioleta.

5.4.3 Sequenciamento pelo método de SANGER

O sequenciamento das colônias isoladas de *Staphylococcus aureus* foi realizado com a utilização dos primers forward D1 - 5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3' e reverse P1 - 5'ACGGTTACCTTGTTACGACTT 3' (WEISBURG, et al., 1991).

Após a realização da amplificação, os produtos de PCR foram mantidos a 4°C. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1× (10,8 g de base tris, 5,5 g de ácido bórico, 4 ml de EDTA 0,5 M e 4 ml de água destilada), corados com gel red (Biotum, USA) 10.000X a 1:125 e visualizados sob luz ultravioleta. Posteriormente os produtos de PCR foram purificados utilizando o reagente polyethylene glycol (PEG 6000) de acordo com Schmitz e Riesner (2006).

Os amplicons foram sequenciados pela metodologia de Sanger em sequenciador capilar Genetic Analyzer 3500xL (Applied Biosystems®). Os fragmentos sequenciados foram analisados usando o programa BioEdit (HALL, 2007). As sequências de nucleotídeos obtidas foram comparadas com aquelas depositadas no banco de dados do GenBank e as que apresentaram as maiores pontuações foram selecionadas e alinhadas juntamente com as sequências obtidas usando o algoritmo ClustalW.

5.5 Análises estatísticas

Foram analisadas as frequências de detecção de bactérias associadas com a mastite bovina. Para a comparação das proporções de positivities para os diferentes isolados microbianos e genes entre as propriedades (A, B, C, D e E) foram utilizados os testes não paramétricos de qui-quadrado e teste G, com nível de significância de 5% ($P \leq 0,05$). As análises foram efetuadas no ambiente R (R Core Team, 2021), interface Rstudio.

6. RESULTADOS

6.1 Locais e Instalações

A propriedade **A** (Figura 8) apresentava a sala de ordenha e a do tanque sem pavimentação, o chão era de terra batida. As vacas dividiam o espaço nas baias com outras espécies animais, como aves e cães. A ordenha era mecânica, com higienização das teteiras antes das ordenhas e ao final, porém, entre um animal e outro não era realizada a limpeza do equipamento. O proprietário nos relatou que tal prática não era realizada pois acreditava que a limpeza dos dutos faria com que aumentasse a quantidade de água no leite.



Figura 8: Propriedade “A” - Fonte: Cardoso, D. (2021)

A propriedade **B** (Figura 9) possuía instalação da sala de ordenha com pavimentação de cimento, o que propiciava melhor higiene do local. Também haviam muitas aves (galináceas) no espaço de ordenha. Das propriedades visitadas, era a única que possuía revestimento em azulejo na sala de tanque, o que facilitava a limpeza do local.



Figura 9: Propriedade “B”. Fonte: Cardoso, D. (2021).

A propriedade **C** (figura 10) possuía características semelhantes à propriedade **A** (terra batida, sem pavimentação do piso da sala de ordenha), com menor número de animais e infraestrutura simples. Foram coletadas amostras de leite apenas na primeira coleta, após isso, a propriedade fora excluída do estudo.



Figura 10: Propriedade “C”. Fonte: Cardoso, D. (2021)

Os proprietários da propriedade denominada **D** (Figura 11), no início do projeto, dividiam seus afazeres entre a agricultura, para a venda em feira local e a ordenha das vacas. Mas o plantio foi deixado de lado e todos os investimentos estavam direcionados à produção leiteira. No começo, a sala de ordenha tinha terra batida e o teto muito baixo, o que dificultava a ordenha, deixava o ambiente muito quente e, conseqüentemente, os animais sem o bem-estar necessário. Na última colheita, foi observado que fora feita uma reforma, aumentando a altura do teto e elevando o piso dos corredores onde as vacas eram preparadas para receber a ordenhadeira, facilitando e, muito, o trabalho da família, proporcionando maior ventilação e, conseqüentemente o bem-estar dos animais.



Figura 11: Propriedade “D”. Fonte: Cardoso, D. (2023)

A propriedade **E** (Figura 12) apresentava a sala de ordenha também de terra batida e, o que mais chamava atenção era que, em períodos de chuva, os animais saíam do momento da ordenha diretamente em uma grande poça de água e lama (figura 14), com o canal da glândula mamária ainda aberto.



Figura 12: Propriedade “E”. Fonte: Arquivo pessoal (2023)

Em todas as propriedades os tanques eram refrigerados e possuíam agitadores, porém, sem gerador de energia. Em algumas visitas, pudemos presenciar a falta de energia elétrica o que, seguramente, comprometia a estabilidade da temperatura dos tanques. Diariamente, chegavam caminhões vindos de cidades próximas como Lins, Marília, São José do Rio Preto, Bauru, entre outras, para levar a produção do leite do assentamento.

Os animais eram, em sua maioria, da raça girolando, de manejo extensivo e a base

de alimentação consistia de pasto e ração durante e após a ordenha, além de água à vontade.

6.2 Obtenção da Amostras

Anteriormente à coleta das amostras, foi realizado em todos os animais, o CMT. Todos os animais que apresentavam resultado igual ou superior “distintamente positiva” a “forte positiva”, conforme figura 13, tiveram amostras do leite colhidas e encaminhadas ao Laboratório de Bacteriologia Geral para processamento e análise.



Figura 13: Aumento da celularidade em amostras de leite de animais com mastite. California Mastitis Test (CMT)- “forte positivo” - São Paulo, 2023

No total, foram coletadas 228 amostras, de cinco propriedades, 78 da propriedade A, 65 da B e 40 da propriedade C, 16 da D e 29 da E.

6.3. Análise microbiológica

6.3.1 Isolamento bacteriológico

Das 228 amostras semeadas em ágar sangue acrescido a 5% de sangue de carneiro desfibrinado, 85,6% (195/228), apresentaram crescimento bacteriano nas amostras de leite, sendo: 59,5% (116/195) colônias de *S. aureus*, *S. intermedius* 7,2% (14/195); *S. chromogenes* 5,6% (11/195); *Staphylococcus* spp. 1,5% (3/195); *Pasteurella multocida* 1,0% (2/195); *S. sciuri* 0,5% (1/195); *S. agalactiae* 0,5% (1/195); *Corynebacterium bovis* 2,0% (4/195);

Klebsiela variicola , 1/195 (0,5%); *Ochrobacter intermedium*, 1,0% (2/195); *Bacillus* sp., 5,6% (11/195); GNNF , 1,5% (3/195); *Enterobacter* sp. , 1,5% (3/195) e *Escherichia coli*, 1,5% (3/195). Os demais microrganismos, isolados em associação com o *Staphylococcus* e/ou outros gêneros bacterianos. Do total de amostras, 14,5% (33/228) apresentou ausência de crescimento bacteriano, como descritos na tabela 1.

6.4 Identificação por MALDI- TOF

Foi realizada a técnica para a confirmação bacteriana dos isolados de leite em algumas espécies de *Staphylococcus* e *Streptococcus*. A utilização da técnica de espectrometria de massa permitiu a identificação de *S. chromogenes*, *S. intermedius*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticum*, *S. sciuri*; *S borealis* e confirmação *S. aureus*.; para o gênero *Streptococcus* foi possível caracterizá-lo em: *S. dysgalactiae*, *S. agalactiae* e *S. uberis*. Ainda foi possível confirmar as colônias positivas para os gêneros *Corynebacterium* e *Pasteurella*, como *C. bovis* e *P. multocida*, respectivamente.

Houve ainda a identificação, pelo Maldi Tof, de duas colônias do gênero *Ochrobactrum intermedium*, que não foi possível concluir por testes fenotípicos.

Todas as leituras para identificação bacteriana obtiveram escores acima de 2,09, o que significa confiabilidade nos resultados de gênero e espécie. Não foi possível a identificação da espécie de duas colônias de *Staphylococcus*, pois os escores foram abaixo de 1,7, classificando-as como *Staphylococcus* sp.

Tabela 1 – Descrição dos isolados bacterianos das amostras de leite coletadas nas propriedades (A, B, C, D e E), São Paulo, 2023.

Isolados bacterianos	Total de isolados bacterianos nas propriedades					Total % (n/N) [IC95%]
	A	B	C	D	E	
<i>S. aureus</i>	76,3 % (45/59)	91,1% (51/56)	17,5 % (7/40)	15,4% (2/13)	40,7% (11/27)	59,5% (116/195)[20,534-25,866]
<i>S.chromogenes</i>	1,7% (1/59)	7,1% (4/56)	0% (0/40)	15,4% (2/13)	14,9% (4/27)	5,6% (11/195)[1,992- 2,408]
<i>Staphylococcus</i> spp.	0% (0/59)	0% (0/56)	5% (2/40)	0% (0/13)	3,7% (1/27)	1,5% (3/195)[0,496- 0,704]
<i>S. intermedius</i>	5,1% (3/59)	7,1% (4/56)	17,5% (7/40)	0% (0/13)	0% (0/27)	7,2% (14/195)[2,458- 3,142]
<i>S. sciuri</i>	0% (0/59)	0% (0/56)	0% (0/40)	7,7% (1/13)	0% (0/27)	0,5% (1/195)[0,148- 0,252]
<i>Streptococcus</i> sp	1,7% (1/59)	0% (0/56)	0% (0/40)	7,7% (1/13)	0% (0/27)	1,0% (2/195)[0,336- 0,464]
<i>S. agalactiae</i>	0% (0/59)	0% (0/56)	0% (0/40)	7,7% (1/13)	0% (0/27)	0,5% (1/195)[0,148- 0,252]
<i>C. bovis</i>	1,7% (1/59)	1,8% (1/56)	0% (0/40)	7,7% (1/13)	3,7% (1/27)	2,0% (4/195)[0,748- 0,852]
<i>Klebsiela variicola</i>	0% (0/59)	0% (0/56)	0% (0/40)	7,7% (1/13)	0% (0/27)	0,5% (1/195)[0,148- 0,252]
<i>Ochrobactrum intermedium</i>	0% (0/59)	0% (0/56)	0% (0/40)	0% (0/13)	7,4% (2/27)	1,0% (2/195)[0,296- 0,504]
<i>Pasteurella multocida</i>	0% (0/59)	0% (0/56)	0% (0/40)	0% (0/13)	7,4% (2/27)	1,0% (2/195)[0,296- 0,504]
<i>Bacillus</i> sp	6,8% (4/59)	10,7% (6/56)	2,5% (1/40)	0% (0/13)	0% (0/27)	5,6% (11/195)[1,888- 2,512]
<i>GNNF</i>	0% (0/59)	0% (0/56)	7,5% (3/40)	0% (0/13)	0% (0/27)	1,5% (3/195)[0,444- 0,756]
<i>Enterobacter</i> sp	0% (0/59)	0% (0/56)	2,5% (1/40)	7,7% (1/13)	3,7% (1/27)	1,5% (3/195)[0,536- 0,664]
<i>E coli</i>	0% (0/59)	0% (0/56)	2,5% (1/40)	7,7% (1/13)	3,7% (1/27)	1,5% (3/195)[0,536- 0,664]
<i>S intermedius</i> + <i>GNNF</i>	0% (0/59)	0% (0/56)	7,5% (3/40)	0% (0/13)	0% (0/27)	1,5% (3/195)
<i>S intermedius</i> + <i>Enter</i>	0% (0/59)	0% (0/56)	10% (4/40)	0% (0/13)	0% (0/27)	2,0% (4/195)
<i>S intermedius</i> + <i>Staphylococcus</i> sp	0% (0/59)	0% (0/56)	5% (2/40)	0% (0/13)	0% (0/27)	1,0% (2/195)
<i>S intermedius</i> + <i>E coli</i>	0% (0/59)	0% (0/56)	2,5% (1/40)	0% (0/13)	0% (0/27)	0,5% (1/195)
<i>S aureus</i> + <i>Bacillus</i> sp + <i>Staphylococcus</i> sp	0% (0/59)	0% (0/56)	2,5% (1/40)	0% (0/13)	0% (0/27)	0,5% (1/195)
<i>S intermedius</i> + <i>Staphylococcus</i> sp+ <i>GNNF</i>	0% (0/59)	0% (0/56)	2,5% (1/40)	0% (0/13)	0% (0/27)	0,5% (1/195)
<i>S.intermedius</i> + <i>Streptococcus</i> sp	0% (0/59)	0% (0/56)	2,5% (1/40)	0% (0/13)	0% (0/27)	0,5% (1/195)
<i>GNNF</i> + <i>Staphylococcus</i> spp.	0% (0/59)	0% (0/56)	5% (2/40)	0% (0/13)	0% (0/27)	1,0% (2/195)
<i>Staphylococcus</i> spp.+ <i>Enterobactéria</i>	0% (0/59)	0% (0/56)	5% (2/40)	0% (0/13)	0% (0/27)	1,0% (2/195)
<i>Staphylococcus</i> spp.+ <i>Pseudomonasp</i>	0% (0/59)	0% (0/56)	2,5% (1/40)	0% (0/13)	0% (0/27)	0,5% (1/195)
<i>Staphylococcus</i> spp.+ <i>Bacillus</i> sp	0% (0/59)	0% (0/56)	2,5% (1/40)	0% (0/13)	0% (0/27)	0,5% (1/195)
<i>S.aureus</i> + <i>Staphylococcus</i> spp.	0% (0/59)	0% (0/56)	2,5% (1/40)	0% (0/13)	0% (0/27)	0,5% (1/195)
<i>S.chromogenes</i> + <i>S. aureus</i>	5,1% (3/59)	0% (0/56)	0% (0/40)	0% (0/13)	3,7% (1/27)	2,0% (4/195)
<i>S.aureus</i> + <i>Bacillus</i> sp	1,7% (1/59)	1,8% (1/56)	0% (0/40)	0% (0/13)	0% (0/27)	1,0% (2/195)
<i>S. intermedius</i> + <i>S. aureus</i>	0% (0/59)	5,3% (3/56)	2,5% (1/40)	0% (0/13)	0% (0/27)	2,0% (4/195)
<i>S. aureus</i> + <i>S. agalactiae</i>	0% (0/59)	1,8% (1/56)	0% (0/40)	0% (0/13)	3,7% (1/27)	1,0% (2/195)
<i>Pseudomonas</i> sp + <i>fungo</i>	0% (0/59)	0% (0/56)	2,5% (1/40)	0% (0/13)	0% (0/27)	0,5% (1/195)
<i>S. agalactiae</i> + <i>K. variicola</i>	0% (0/59)	0% (0/56)	0% (0/40)	7,7% (1/13)	0% (0/27)	0,5% (1/195)
<i>E. coli</i> + <i>C.bovis</i> + <i>S. chromogenes</i>	0% (0/59)	0% (0/56)	0% (0/40)	7,7% (1/13)	0% (0/27)	0,5% (1/195)
<i>C. bovis</i> + <i>P.multocida</i> + <i>S. chromogenes</i>	0% (0/59)	0% (0/56)	0% (0/40)	0% (0/13)	3,7% (1/27)	0,5% (1/195)
<i>E.cloacae</i> + <i>S.agalactiae</i>	0% (0/59)	0% (0/56)	0% (0/40)	0% (0/13)	3,7% (1/27)	0,5% (1/195)
<i>S.chromogenes</i> + <i>Streptococcus</i> sp	0% (0/59)	0% (0/56)	0% (0/40)	0% (0/13)	3,7% (1/27)	0,5% (1/195)
<i>S. aureus</i> + <i>S. dysgalactiae</i>	0% (0/59)	0% (0/56)	0% (0/40)	0% (0/13)	3,7% (1/27)	0,5% (1/195)
<i>Aeromonas</i> sp + <i>Streptococcus</i> sp	0% (0/59)	0% (0/56)	0% (0/40)	0% (0/13)	3,7% (1/27)	0,5% (1/195)
Total de coinfeções	4	5	22	2	7	20,5% (40/195)[7,07- 8,93]
Total de amostras isoladas	59	56	40	13	27	195

IC95%: Intervalo de confiança para a média da população

6.5 - Isolamento de *Campylobacter* spp.

Todas as 228 amostras foram semeadas em meio específico para o isolamento de *Campylobacter* spp. Nenhuma delas (0/228), apresentou crescimento de colônias sugestivas do gênero.

6.6 Antibiograma- Impregnação em discos com antibióticos – Método Kirby-Bauer

Para o gênero *Staphylococcus* spp., mais prevalente no estudo, foram utilizados os seguintes discos de antibióticos: azitromicina (30 µg), cefalotina (30 µg), ceftiofur (30 µg), cloranfenicol (30 µg), tetraciclina (30 µg), gentamicina (10 µg), penicilina (10 UI), eritromicina (15µg), amoxicilina (25µg) e sulfazotrim (25 µg). Das 116 colônias, 28(24,2%) foram sensíveis a todos os antibióticos; 23 (19,8%) foram resistentes à amoxicilina, 19 (16,4%) foram resistentes à eritromicina, uma (0,9%) à azitromicina e uma (0,9%) à penicilina. (Figura 14) ´

Em associações dos antibióticos, obtivemos os seguintes resultados: seis colônias (5,2%) à amoxicilina e sulfazotrin; dez (8,6%) colônias à amoxicilina, azitromicina e eritromicina; uma (0,9%) à amoxicilina, ampicilina, azitromicina , eritromicina e penicilina; quatro (3,5%) à amoxicilina, ampicilina e penicilina; três (2,5%) à amoxicilina, azitromicina, eritromicina e penicilina; uma (0,9%) à amoxicilina e eritromicina e mais uma (0,9%) na associação da amoxicilina com a ampicilina e eritromicina. (Tabela 2).



Figura 14 – Antibiograma da cepa de *Streptococcus* sp pelo método de Kirky-Bauer, evidenciado os halos de sensibilidade aos discos de antibióticos empregados no estudo. Fonte: Arquivo pessoal.

TABELA 2: Correlação dos resultados de resistência e sensibilidade bacteriana dos *S. aureus* realizado pelo antibiograma (método de Kirky-Bauer).

Antibióticos	Resistência n° cepas resistentes/ n° total de isolados (%)	Sensibilidade n° cepas sensíveis/ n° total de isolados (%)
Amoxicilina	23/116 (19,8)	93/116 (80,2)
Eritromicina	19/116 (16,4)	97/116 (83,6)
Azitromicina	1/116 (0,9)	115/116 (99,1)
Penicilina	1/116 (0,9)	115/116 (99,1)
Ceftiofur	0/116 (0)	116/116 (100)
Amoxicilina/sulfazotrim	6/116 (5,2)	110/116 (94,8)
Cefalexina/eritromicina	17/116 (14,7)	99/116 (85,3)
Amoxicilina/ampicilina	1/116 (0,9)	115/116 (99,1)
Amoxicilina/azitromicina/ eritromicina	10/116 (8,6)	106/116 (91,4)
Amoxicilina/ ampicilina/azitromicina/ eritromicina/penicilina	1/116 (0,9)	115/116 (99,1)
Amoxicilina/ampicilina/ penicilina	4/116 (3,5)	112/116 (96,5)
Amoxicilina/azitromicina/ eritromicina/penicilina	3/116 (2,5)	113/116 (97,4)
Amoxicilina/eritromicina	1/116 (0,9)	115/116 (99,1)
Amoxicilina/ampicilina/eritromicina	1/116 (0,9)	115/116 (99,1)

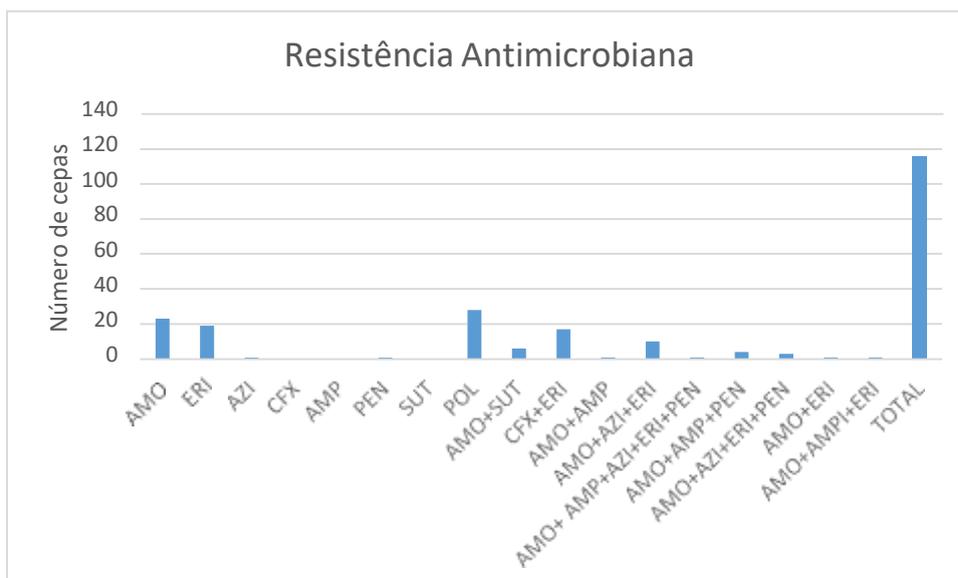


Figura 15: Correlação do número de cepas *S. aureus* resistentes aos antibióticos do estudo realizado pelo antibiograma (método de Kirky-Bauer).

6.7 PCR

6.7.1 – Detecção de *Mycoplasma* spp.

Das 228 amostras, 5/228 (2,2%) foram positivas na detecção do gene para *Mycoplasma* spp., sendo uma da propriedade **C** e as outras quatro da propriedade **E**.

6.7.2 Detecção do gene *nuc* do *S. aureus* e dos genes de resistência (*mecA* e *blaZ*) aos antimicrobianos

Das 116 colônias de *S. aureus* 108/116 (93,10 %) foram positivas para o gene *nuc*. De 8/116 (6,9%) amostras, apesar de serem caracterizadas pelo isolamento e MALDI-TOF como *S. aureus*, não foi possível detectar o gene *nuc*.

Foram detectados 29/116 (25%) do gene de resistência a *blaZ*, enquanto que em nenhuma amostra (0/116), foi detectada o gene *mecA*. (Figura 16)

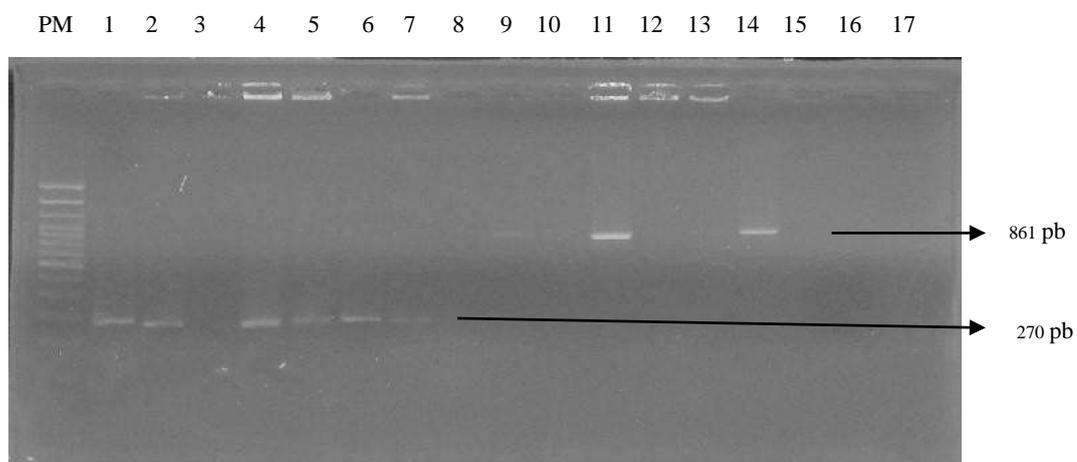


Figura 16: Eletroforese utilizando os primers do gene *nuc* do *S. aureus* e dos genes de resistência (*mecA* e *blaZ*) aos antimicrobianos, São Paulo, 2023.

PM: Marcador de peso molecular (100bp DNA ladder - Invitrogen®) Amostras **1 – 8 – gene *nuc***: **1** - colônia SC; **2** – colônia 1; **3** - colônia 88; **4** - colônia 26, **5** - colônia 95; **6** - colônia 116; **7** – controle positivo *S. aureus* ATCC, **8** – controle negativo, **9 – 17**: PCR gene *blaZ* e *mecA*: **9** – colônia 4, **10** – colônia 134, - **11** – colônia 126; **12** – colônia 87; **13** – colônia 6; **14** – colônia 120; **15** – colônia SH; **16** – colônia 27; **17** – controle negativo.

Tabela 3: Resultados do cultivo, Maldi-tof e PCR para o gene *nuc* e os genes de resistência *BlaZ* e *MecA* dos *S. aureus* isolados das amostras de leite e suas propriedades, São Paulo, 2023.

Propriedade	Colônia	Cultivo	Maldi-Tof	<i>nuc</i>	<i>blaZ</i>	<i>MecA</i>	Propriedade	Colônia	Cultivo	Maldi-Tof	<i>nuc</i>	<i>blaZ</i>	<i>MecA</i>
A	SB	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	POS	NEG	A	78	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG
A	SC	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	POS	NEG	A	80	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG
A	SD	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG	A	81	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG
A	SE	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG	A	82	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG
A	SG	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG	A	84	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG
A	SH	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG	A	86	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG
A	SI	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG	A	87	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG
A	SK	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG	A	88	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG
A	SS	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG	A	91	<i>S. aureus</i>	NOIP	POS	NEG	NEG
A	ST	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG	B	95	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	POS	NEG
A	SV	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG	B	99	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG
A	SX	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	POS	NEG	B	100	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	POS	NEG
B	T1	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG	B	101	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	POS	NEG
B	T2	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG	B	103	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG
B	T4	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG	B	106	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG
B	T7	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG	B	109	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	POS	NEG
B	T8	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG	B	112	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG
B	T12	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG	B	113	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	NEG	NEG	NEG
B	T22	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	POS	NEG	B	116	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	POS	NEG
B	T23	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	POS	NEG	B	117	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG
B	T29	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	POS	NEG	B	120	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	POS	NEG
B	T30	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG	B	121	<i>S. aureus</i>	<i>S. chromogenes</i>	POS	NEG	NEG
C	1F	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG	B	124	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG
C	2F	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG	B	126	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	POS	NEG
C	6F	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG	B	129	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	POS	NEG
B	1	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG	B	134	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG
B	2	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG	B	139	<i>S. aureus</i>	NOIP	NEG	NEG	NEG
B	3	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG	B	140	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG
B	4	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	POS	NEG	B	142	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG
B	5	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	POS	NEG	B	143	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	NEG	NEG	NEG
B	6	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG	B	148	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	POS	NEG
B	16	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG	B	153	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG
B	19	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG	B	157	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG
B	21	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG	B	158	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG
B	24	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	POS	NEG	B	159	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG
B	26	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	POS	NEG	B	162	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG
B	27	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG	B	163	<i>S. aureus</i>	<i>S. chromogenes</i>	POS	NEG	NEG
B	34	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	POS	NEG	B	167	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG
B	35	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	POS	NEG	B	168	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	NEG	NEG	NEG
B	41	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	POS	NEG	B	139 2	<i>S. aureus</i>	NOIP	NEG	NEG	NEG
B	42	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	POS	NEG	B	169	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG
B	43	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG	B	170	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	NEG	NEG	NEG
B	44	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG	E	174	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG
A	46	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	POS	NEG	E	176	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG
A	47	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG	E	177	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG
A	48	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG	E	179	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG
A	53	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	POS	NEG	D	192	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG
A	54	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG	D	196	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	POS	NEG
A	55	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG	E	201	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG
A	58	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG	E	203	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	POS	NEG
A	60	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG	E	206	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG
A	62	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG	E	210	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	POS	NEG
A	66	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG	E	211	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG
A	69	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG	E	212	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG
A	70	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG	E	213	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG
A	73	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG	E	216	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG
A	75	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG	E	217	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	POS	NEG
A	76	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG	E	226	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	POS	NEG	NEG

Legenda: NOIP: Não foi possível identificar; NEG: negativo; Pos: positivo

6.7.3 Sequenciamento pelo método de SANGER

Das 116 amostras de *S. aureus*, 8 foram positivas no cultivo microbiológico e Maldi-Tof, porém negativas na PCR para o gene *nuc*. Dessa forma, foi realizado o sequenciamento pelo método de SANGER com a utilização de *primers* que amplificam a região 16S ribossomal, como descritos por Weisburg et al. (1991).

Foram sequenciadas e confirmadas as espécies: 75% (6/8) *S. chromogenes*, 12,5% (1/8) *S. haemolyticus/S. taiwanensis* e 12,5% (1/8) confirmada como *S. aureus*, conforme tabela abaixo.

Tabela 4: Comparação dos resultados dos diagnósticos microbiológicos, Maldi Tof, presença do gene *nuc* e *blaZ* com o sequenciamento pelo método Sanger.

Propriedade/Colônia	Cultivo	Maldi Tof	Gene <i>nuc</i>	Gene <i>blaZ</i>	Sequenciamento Sanger
B/113	<i>S.aureus</i>	<i>S.aureus</i>	NEG	NEG	<i>S. chromogenes</i> *
A/143	<i>S.aureus</i>	<i>S.aureus</i>	NEG	NEG	<i>S.aureus</i>
B/159	<i>S.aureus</i>	<i>S.aureus</i>	NEG	NEG	<i>S. chromogenes</i> *
B/168	<i>S.aureus</i>	<i>S.aureus</i>	NEG	NEG	<i>S. chromogenes</i>
B/170	<i>S.aureus</i>	<i>S.aureus</i>	NEG	NEG	<i>S. haemolyticus</i> (ou <i>S.taiwanensis</i>)
E/179	<i>S.aureus</i>	<i>S.aureus</i>	NEG	NEG	<i>S. chromogenes</i> *
A/139 -1	<i>S.aureus</i>	NOIP	NEG	NEG	<i>S. chromogenes</i> *
A/139 -2	<i>S.aureus</i>	NOIP	NEG	NEG	<i>S. chromogenes</i>

*Amostras em reteste.

6.8 Análise estatística

Analisando os resultados do cultivo microbiológico entre as cinco propriedades estudadas, foi verificado que houve diferença estatística, conforme demonstrado na tabela 5.

Em relação a comparação entre o isolamento microbiológico e o Maldi-tof pode-se concluir que não houve diferença estatística entre as propriedades (tabela 6).

Também não foi verificada a diferença em relação a presença dos genes *Nuc* e *BlaZ* entre as propriedades do estudo (tabela 7).

Tabela 5 – Número de amostras positivas e frequência (%) de acordo com o isolamento microbiológico e a propriedade.

Isolamento	Propriedades					Valor de P
	A ¹	B ²	C ³	D ⁴	E ⁵	
<i>S. aureus</i>	46 (59%)	35 (46,7%)	8 (20%)	2 (12,5%)	12 (40%)	< 0,001*
<i>S. chromogenes</i>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (18,8%)	4 (13,3%)	< 0,001*
<i>Staphylococcus</i> sp.	15 (19,2%)	15 (20%)	11 (27,5%)	0 (0%)	2 (6,7%)	0,019*
<i>S. intermedius</i>	3 (3,8%)	0 (0%)	17 (42,5%)	0 (0%)	0 (0%)	< 0,001*
<i>C. bovis</i>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (12,5%)	3 (10%)	0,002*
<i>Bacillus</i> sp.	5 (6,4%)	3 (4%)	2 (5%)	0 (0%)	0 (0%)	0,376
GNNF	0 (0%)	0 (0%)	9 (22,5%)	0 (0%)	0 (0%)	< 0,001*
<i>Enterobacter</i> sp.	0 (0%)	0 (0%)	6 (15%)	1 (6,2%)	2 (6,7%)	< 0,001*
<i>A. faecalis</i>	4 (5,1%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0,152
Fungos	0 (0%)	1 (1,3%)	1 (2,5%)	0 (0%)	0 (0%)	0,766
<i>Streptococcus</i> sp.	0 (0%)	3 (4%)	1 (2,5%)	1 (6,2%)	0 (0%)	0,278
<i>E. coli</i>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (12,5%)	0 (0%)	0,167
<i>S. agalactiae</i>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (12,5%)	7 (23,3%)	< 0,001*
<i>K. variicola</i>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (12,5%)	0 (0%)	0,167
<i>S. sciuri</i>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (6,2%)	0 (0%)	0,689
<i>P. multocida</i>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	4 (13,3%)	0,013*
<i>P. aeruginosa</i>	0 (0%)	0 (0%)	2 (5%)	0 (0%)	0 (0%)	0,376
Total de isolados	69 (88,5%)	50 (66,7%)	38 (95%)	13 (81,2%)	29 (96,7%)	< 0,001*

¹Total de 78 amostras; ²Total de 75 amostras; ³Total de 40 amostras; ⁴Total de 16 amostras; ⁵Total de 30 amostras; *Diferença estatística ($P \leq 0,05$).

Tabela 6 – Número de amostras positivas e frequência (%) de acordo com o agente biológico isolado (identificação por Maldi-Tof) e a propriedade.

Maldi-Tof	Propriedades					Valor de P
	A ¹	B ²	C ³	D ⁴	E ⁵	
NOIP	1 (2,8%)	2 (3,3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0,979
<i>S. aureus</i>	35 (97,2%)	57 (93,4%)	3 (100%)	2 (100%)	14 (100%)	0,855
<i>S. chromogenes</i>	0 (0%)	2 (3,3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0,939

¹Total de 36 amostras; ²Total de 61 amostras; ³Total de três amostras; ⁴Total de duas amostras; ⁵Total de 14 amostras

Tabela 7 – Número de amostras positivas e frequência (%) de acordo com o gene identificado e a propriedade.

Gene	Propriedades					Valor de P
	A ¹	B ²	C ³	D ⁴	E ⁵	
<i>Nuc</i>	36 (100%)	55 (90,2%)	3 (100%)	2 (100%)	14 (100%)	0,337
<i>blaZ</i>	5 (13,9%)	20 (32,8%)	0 (0%)	1 (50%)	3 (21,4%)	0,204

¹Total de 36 amostras; ²Total de 61 amostras; ³Total de três amostras; ⁴Total de duas amostras; ⁵Total de 14 amostras

7. DISCUSSÃO

O Assentamento Reunidas tem 26 anos de implantação e, no presente estudo, participaram das coletas de leites cinco propriedades, definidas como A, B, C, D e E que, apesar de suas limitações, foram importantes no projeto. No decorrer do trabalho, os proprietários da propriedade C desistiram da pesquisa, interromperam a produção leiteira, para focar somente na produção agrícola, situação contrária à dos proprietários da propriedade D, que fizeram o caminho inverso, dedicando-se, agora, somente à produção de leite.

Os animais desse assentamento são basicamente da raça girolanda, que apresenta maior aptidão leiteira aliada à criação extensiva. Essa raça suporta maiores interferências ambientais, como o calor, maior resistência a enfermidades relacionadas à glândula mamária e apresentam boa produção leiteira (MACMANUS et al., 2008; CANAZA-CAYO et al, 2018).

As amostras de leite foram obtidas após a realização do CMT com a comprovação de mastite subclínica, conforme descrito na IN 76 (BRASIL, 2018). Durante a coleta das amostras, em algumas propriedades, a precariedade do local dificultou a higienização dos tetos para a coleta, mas mesmo assim foi possível a realização do CMT. Aleman (2022), relatou em seu estudo que a limpeza da glândula com pano é prática muito utilizada nos assentamentos, sem troca entre os animais e sem a devida higiene.

A lavagem dos tetos com água visa reduzir a sujidade e, conseqüentemente, diminuir o número de microrganismos que eventualmente poderiam penetrar no canal do teto durante a ordenha através do esfíncter e desencadear um processo inflamatório (OLIVEIRA et al., 2012). Aleman (2022) observou diminuição na produção de leite em locais que não faziam a lavagem dos tetos com água. A não secagem dos tetos antes da ordenha e a utilização de panos comuns para secagem de um grande número de tetos, assim como a não higienização da mão do ordenhador, poderiam ter atuado como meio ou fonte ambiental para disseminação de bactérias causadoras da mastite (LANGE et al., 2017).

Outro fator importante nas propriedades deste estudo foi que, entre as trocas das ordenhadeiras, não era realizada a higiene com solução de hipoclorito de sódio a 2%, por acreditarem que esse procedimento traria diluição maior do leite e, conseqüentemente, perda na comercialização/renda.

A correta higienização das teteiras contribui para a saúde da glândula mamária das vacas, reduz a contaminação bacteriana durante a linha de ordenha e o risco de

transmissão de animal para animal, garantido melhor qualidade do leite (MAIA et al., 2016). A higiene da mão do ordenhador, do úbere do animal e instalações, assim como do material de ordenha, seja manual ou mecânica, são de fundamental importância para garantir a qualidade do leite obtido (SIMÕES, 2012).

Na análise estatística relacionada às instalações, foi possível verificar que a propriedade B, foi a que teve a maior presença de isolamento de *S. aureus* e, portanto, podemos afirmar que essa propriedade apesar de possuir pisos azulejados, não tinha higienização adequada, mesmo com a infraestrutura superior às demais do estudo.

No presente estudo, das 228 amostras de leite, 14,5% não apresentaram crescimento bacteriano, porcentagem baixa se comparada a outros relatos, tais como o de Lima et al. (2020), que encontraram 26,31% de ausência de crescimento bacteriano e no de Aleman (2022), que encontrou 46% deste padrão.

A maior incidência de isolados foi para o gênero *Staphylococcus*, sendo *S. aureus* em 59,5% das amostras de leite, seguido de 7,2 % de *S. intermedius*, 5,6% *S. chromogenes*, 1,5% *Staphylococcus* spp. Esses microrganismos são frequentemente isolados em casos de mastite bovina e são considerados contagiosos.

S. aureus é considerado um dos maiores responsáveis pela mastite segundo Pinheiro de Sá et al. (2004) e a frequência de isolamento mostra resultados variáveis desde 9,1% a 85%, de acordo com a região estudada, podendo variar entre estados e países, inclusive (COSTA, 1986; BELOTI, 1997; GARCIA et al., 1980). Lima et al. (2020) encontraram: 24,6% de colônias de *Staphylococcus aureus*, 14% para *Staphylococcus* coagulase-negativo; em outro estudo realizado por Souza et al. (2016) encontraram 50,98% *Staphylococcus* sp. Já Zimmermann e Araújo (2017), observaram que em 44 amostras de leite, foram isoladas 52,3% colônias de *Staphylococcus* sp. Em estudo realizado por Oliveira et al. (2020) foram colhidas amostras de leite daqueles animais que apresentaram 3 (+) no CMT e, nas amostras colhidas, 100% cresceram colônias de *Staphylococcus* sp., não caracterizado como *S. aureus*. Em nosso estudo somente duas cepas foram identificadas como *Staphylococcus* sp, pois na leitura do MALDI-TOF, a interpretação não foi confiável, com pontuação menor a 1,7 (BARCELOS et al., 2019).

Fato interessante nesse trabalho foi detectar a presença de 3,2% *S. chromogenes*, caracterizado pelo MALDI-TOF. O estudo de Israel e colaboradores (2018) encontrou 60% dos isolados de *S. chromogenes*, ressaltando a importância desse patógeno como causador de mastite e, apesar da sua identificação por métodos bioquímicos ser difícil, a utilização do MALDI-TOF permite tal análise. Em compensação, os mesmos autores

encontraram apenas 0,74% de *S. aureus*, contrapondo nossos resultados, que mostraram incidência de 59,5%.

Atualmente, a espécie de *Staphylococcus* coagulase negativo (SCN) mais isolada de animais com mastite no Brasil é *S. chromogenes* (SANTOS, et al., 2008; LANGE et al., 2011; TOMAZI et al., 2014). Bochniarz et al, (2014) referem a presença de *S. chromogenes* e também de *S. xylosus* como agentes causadores de mastite subclínica, corroborando nosso estudo, pois só foram realizadas coletas das amostras de leites com aumento de CMT, que permite estimar casos de mastite subclínica nos plantéis, e dessa forma, garantir a qualidade do leite (MEGID, 2020; SANTOS, 2006).

Ainda nesse estudo, foram encontrados outros microrganismos considerados importantes na mastite, sendo: *Bacillus* sp (5,6%), GNFF (1,5%), *Corynebacterium bovis* (2%), *Enterobacter* sp (1,5%), *Pasteurella multocida* (1%), *Ochrobactrum intermedium* (1%), e *Escherichia coli* (1,5%).

Interessante notar que alguns microrganismos importantes como causadores de mastite foram isolados somente em associação como, por exemplo, *Streptococcus* (*S. dysgalactiae*, *S. agalactiae*, *S. uberis*) e, por fim, ainda foi possível isolar em uma amostra associação com *Pseudomonas aeruginosa* com fungo.

Aleman (2022) identificou em 12,6% das amostras o gênero *Bacillus* sp e 3,8% de *Corynebacterium* sp, 0,20% *Streptococcus* sp e Enterobactérias, 3,16%, os demais microrganismos foram encontrados em associação, assim como foi observado no presente estudo. O que difere o trabalho acima citado e o presente é que, no primeiro, todos os microrganismos foram identificados em gênero bacteriano, enquanto neste foram identificados em gênero e espécie.

No presente estudo foi possível identificar, em duas amostras de leite da propriedade E, cultura pura de *P. multocida*, fato reportado também por Ribeiro et al. (2010) e Maroney et al. (2003). A pasteurelose é uma importante doença respiratórias em bovinos confinados. Ribeiro e colaboradores (2010) reportaram em 4188 amostras de leite, nove (0,21%) amostras positivas para *P. multocida* e os autores correlacionaram nesse achado que seis vacas que mantinham os bezerras ao pé. No presente estudo não foi possível verificar essa situação, mas as condições de higiene e manejo eram precárias e alguns animais apresentavam tosse no momento da ordenha, indicando talvez, que a transmissão tenha sido via linfática ou hematogena, conforme relatado por Maroney et al. (2003). Outro patógeno identificado na propriedade E, foi *O. intermedium*, bactéria recentemente classificada como pertencente à família Brucellaceae. Foi um achado no

presente estudo, mas que pode ter correlação com a mastite. Silva, (2020) reportou a presença de 1,4% *O. intermedium* e 0,8% *Ochrobactrum* spp. em queijos frescal fabricados a partir de leite cru.

Ainda em relação às associações, alguns achados importantes podem ser encontrados na literatura. Zimmermann e Araújo (2017), observaram em 44 amostras de leite, 52,27% *Staphylococcus* sp, 29,54% *Streptococcus* sp, 11,36% *Enterococcus* sp, 9,09% *Bacillus* sp, 9,09% *Corynebacterium* sp e 2,27% de *Klebsiella* sp. Oliveira et al. (2020) identificaram bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. em 85%, além do *Bacillus* spp., e ainda fungos do gênero *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Trichoderma* spp. e levedura.

No cultivo microbiológico, não foi possível verificar a presença de *Campylobacter* spp., no presente estudo. Medeiros et al. (2008) também não isolaram este patógeno nas amostras de leite cru no Canadá. Já Kobayashi et al. (2017), detectaram *Campylobacter* spp. pela técnica de PCR, em 6,7% amostras de leite cru, em amostras do Estado de São Paulo, Brasil.

Foram analisadas 116 colônias de *S. aureus* para susceptibilidade aos antibióticos pelo método de disco-difusão e também os genes responsáveis pela resistência. Do total de isolados, 23 (19,8%) foram resistentes somente à amoxicilina e 19 (16,4%) foram resistentes à eritromicina e somente uma (0,9%) cepa à azitromicina e uma (0,9%) à penicilina, em contrapartida obtivemos 100% de sensibilidade ao ceftiofur. Corroborando a multirresistência encontrada por Zafalon et al. (2008), obtivemos os seguintes resultados em associações antibióticas: seis colônias (5,2%) à amoxicilina e sulfazotrin; dez (8,6%) colônias à amoxicilina, azitromicina e eritromicina; uma (0,9%) à amoxicilina, ampicilina, azitromicina, eritromicina e penicilina; quatro (3,5%) à amoxicilina, ampicilina e penicilina; três à amoxicilina, azitromicina, eritromicina e penicilina; uma (0,9%) à amoxicilina e eritromicina e mais uma (0,9%) na associação da amoxicilina com a ampicilina e eritromicina. Silva et al. (2012) encontraram 95% e 79% de resistência para penicilina e ampicilina, respectivamente, em 83 cepas de *S. aureus*, demonstrando a resistência às penicilinas em Garanhuns (PE, Brasil), nos casos de mastite subclínica. Oliveira et al. (2016) reportaram a presença de resistência aos β -lactâmicos em 43% para a penicilina, 38% para ampicilina e 27% para a oxacilina em 552 amostras de leite de vacas de 15 propriedades com mastites no estado da Paraíba, Brasil.

Neelam et al. (2022) reportaram alta resistência de oxitetraciclina (tetraciclina – 98,18%), seguido de amoxicilina 89,09% nos isolados de *S. aureus*, em casos de mastite clínicas em rebanhos na Índia, já com relação a sensibilidade foi reportado para os

antibióticos da família cefalosporinas (cefuroxime 60%). Esse trabalho corrobora com os nossos dados de resistência à amoxicilina e também com os resultados da sensibilidade aos antibióticos pertencente à família das cefalosporinas (ceftiofur).

Mettifogo et al. (1996), citaram pela primeira vez no Brasil, um surto de mastite bovina por *M. bovis* em vacas leiteiras da raça holandesa, de um rebanho de propriedade localizada no Estado do Paraná, região de Londrina, evidenciando desta forma, a presença do agente em rebanhos leiteiros brasileiros. Posteriormente, Pretto et al. (2001), descreveram uma taxa de 5,84% (8/137) de positividade para *M. bovis* em animais que apresentavam mastite clínica ou subclínica, em animais de rebanhos da mesma região no Paraná. Em nosso estudo na região noroeste do Estado de São Paulo, diagnosticamos uma taxa de 2,2% de positividade para o gênero *Mycoplasma* spp. Estes relatos, sinalizam que a doença está presente em nosso país, sendo importante investir em programas de monitoramento e diagnóstico, a fim de identificar precocemente a presença do *Mycoplasma* para adoção de medidas de controle adequadas, o que inclui a busca por alternativas terapêuticas, como novos antibióticos eficazes e/ou o desenvolvimento de vacinas específicas contra estes agentes.

A presença do gene *nuc* indica que as cepas são *S. aureus* e, no presente estudo, 93,1 % (108/116) foram positivas para o gene *nuc*, gene que caracteriza a espécie. Abdeen et al. (2020) detectaram sete cepas produtoras do gene *nuc*, dos dez isolados de *S. aureus* em amostras de leite, dados similares aos detectados no presente estudo.

As oito amostras que não foram positivas para o gene *nuc*, foram sequenciadas pelo método de Sanger, e somente uma amostra foi confirmada *S. aureus*, o que podemos inferir que alguns *Staphylococcus* não possuem o gene *nuc*. Em contrapartida, foram detectados sete outros *Staphylococcus* não *aureus* pelo sequenciamento, o que sugere que tanto o cultivo microbiológico quanto o Maldi-tof identificaram em concordância, seis das oito colônias de *S. aureus*, o que pode ser devido a fatores fenotípicos e ribossomais que diferem no sequenciamento genético, esses dados corroboram com a análise estatística do estudo, onde verificamos uma especificidade superior do PCR em relação ao Maldi-Tof, apesar da sensibilidade de ambos ser de 95,7%.

A presença do gene *blaZ* de resistência às penicilinas foi encontrado em 25% (29/116) das colônias de *Staphylococcus aureus*, diferentemente de Aslantas e Demir (2016) que encontraram o gene resistência do *blaZ* em 100% dos isolados de *Staphylococcus aureus*. Jamali et al. (2014) detectaram o gene *blaZ* em 86% das amostras de *S. aureus*. Oliveira et al. (2016) reportaram a presença do gene *mecA* em 3% das

colônias de *S. aureus* isolados em amostras de leite e da mão dos ordenhadores; a presença do gene *blaZ* foi detectada em 23%, desses, sete foram detectados os genes *mecA* e *blaZ*, dez com o gene *mecA* e não o *blaZ*, e dois carregavam o gene *blaZ* e não o *mecA* e em quatro isolados não foi detectado nenhum gene.

Neelam e colaboradores (2022) isolaram 69 cepas de *S. aureus* em amostras de leite de vacas com mastite clínica, e 92,73% apresentaram o gene *blaZ*, e o gene *mecA*, 23,6%.

No presente estudo, não foi detectado em nenhuma cepa de *S. aureus* o gene *mecA*, porém foi encontrado resistência fenotípica aos antibióticos pertencentes a mesma classe, como as amoxicilinas (19,8%), penicilinas (1%) e ampicilina, em associação com outros antibióticos.

O uso indiscriminado e empírico dos fármacos para tratamento ou profilaxia é um dos principais fatores etiológicos associados à mastite, tendo em vista que pode favorecer a multirresistência bacteriana (OLIVEIRA et al., 2012; FREITAS, et al. 2018).

Zafalon et al. (2008) reforça que o tratamento para as mastites bovinas deve ser realizado somente após o conhecimento da susceptibilidade/resistência dos microrganismos aos antibióticos.

O presente trabalho demonstra a importância dos exames laboratoriais para a correta aplicação dos fármacos, garantindo a eficácia da terapia aplicada ao rebanho. As propriedades do estudo utilizavam como tratamento para a mastite o ceftiofur, antibiótico que não promoveu resistência frente às estirpes de *Staphylococcus* encontradas neste trabalho. Esse antimicrobiano apresenta grandes vantagens para a produção leiteira sobre os demais por ser de aplicação em dose única e apresentar pouca eliminação de resíduos, o que não acarreta o descarte do leite dos animais tratados e, conseqüentemente, prejuízo ao produtor.

8. CONCLUSÕES

- As propriedades apresentavam baixa condição de higiene das instalações e de seus equipamentos de ordenha, o que prejudicou a qualidade e produtividade leiteira na região;
- O teste de CMT evidenciou os casos de mastite subclínicas no estudo;
- Foi possível isolar e identificar os principais patógenos causadores de mastite subclínica na região;
- No antibiograma, 24% das colônias de *S. aureus* apresentou sensibilidade a todos os antibióticos testados e 19,8% delas, apresentou resistência para a amoxicilina;
- Não foi possível isolar *Campylobacter* spp. nas amostras de leite;
- Foi possível detectar, através da PCR, o DNA bacteriano do gênero *Mycoplasma* em 2,2% das amostras;
- Foi possível detectar em 93,10 % das colônias de *S. aureus*, a presença do gene *nuc* e em 25% delas, o gene *blaZ*, enquanto nenhuma amostra foi positiva para o gene *mecA*;
- Os dados obtidos no projeto foram relatados para os proprietários, o que auxiliou na compreensão da situação da mastite nas propriedades e para possíveis tomadas de decisão para o controle.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEEN, E.E. et al. Antibigram and phylogenetic diversity of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains from milk products and public health implications. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v.27, p. 1968-1974, 2020.

ADAM, M.R. & MOSS, M.O. 2008. **Food Microbiology**. 3rd.ed. Royal Society of Chemistry, UK.

ALEMAN, A.M. R. **Avaliação da Cadeia Produtiva do Leite no Pontal do Paranapanema e seus Impactos no Desenvolvimento Territorial**. 2022. Tese (Doutorado em Clínica Médica) Departamento de Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina e Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, 2022

ALMEIDA, T.V.; et al. Resistência antimicrobiana em patógenos causadores de mastite. **Revista Científica Multidisciplinar Núcleo de Conhecimento**, v.01, p. 230-244, 2021.

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a47bab8047458b909541d53fbc4c6735/DC_12_2001.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em 27 jan. 2022.
https://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo3/gramp_staphylo2.htm

ASLANTAS, Ö.; DEMIR, C. Investigation of antibiotics resistance and biofilm-forming ability of *Staphylococcus aureus* from subclinical bovine mastitis cases. **Journal of Dairy Science**, v.99, n.11, p. 8607-8613, 2016.

AYLING, N. R., R, MCAULIFFE L. **Mycoplasma diseases of ruminants**. Cambridge, MA; Wallingford, UK: CABI; 2008

BARBOSA, M. M.O; et al. Genotypic characterization of methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* in a University hospital. **Brazilian Journal of Review**, v.2, n.4, p. 3575-3584, 2019.

BARCELOS, M.M. et al. Comparison of standard and n-plate extraction protocols or identification of mastitis-causing bacteria by MALDI-TOFMS. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.50, p. 849-857, 2019.

BAUER, A.W., et al. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. **Am J Clin Pathol.**, 1966; 45:493-6

BELOTI, V.; et al. Estudo da mastite subclínica em rebanhos leiteiros no norte do Paraná. **Semina. Ciências Agrárias**, Londrina, v.18, n.1, p.45-53, 1997.

BERGONIER, D, et al. Mastitis of dairy small ruminants. **Veterinary. Research**, v.34, n.5, p. 689-716, 2003.

BIER, D; et al. Identificação por espectrometria de massa MALDI-TOF de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* isolados de carcaças bovinas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.37, n.12, p. 1373-1379, 2017.

BOCHNIARZ, M.; WAWRON, W.; SZCZUBIAL, M. Production of slime by coagulase-negative-staphylococci (CNS) isolated from clinical and subclinical mastites in cows. **Polish Journal Veterinary Science** v. 17, p.447-452, 2014.

BRASIL, Instrução Normativa n. 76 de 26 de novembro de 2018. **Regulamentos Técnicos que fixam a identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A**. Diário Oficial DA União, Brasília, 26 nov. 2018. Disponível em: <www.in.gov.br>. Acesso em: 30 de setembro de 2022.

BRASIL. 2019a. Ministério da Saúde - MS / Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Instrução Normativa nº 51, de 19 de dezembro de 2019. Disponível em:<<https://www.in.gov.br/web/dou/-/instrucao-normativa-n-51-de-19-de-dezembro-de-2019-235414514>>. Acesso em 26 maio 2022.

BRASIL – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Mapa do leite: Políticas públicas e privadas para o leite**. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/producao-animal/mapa-do-leite>. Acesso em 22 de novembro de 2022.

BRITO, M. A. V. P. e. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DA MASTITE BOVINA. *Ciência Animal Brasileira / Brazilian Animal Science*, v. 1, 2009. Disponível em: <https://revistas.ufg.br/vet/article/view/7670>. Acesso em: 1 fev. 2023.

CALIL, R. M.; SCARCELLI, E.; MODELLI, K. D.; CALIL, E. M. B. **Campilobacterioses: o agente, a doença e a transmissão por alimentos**. São Paulo: R. M. CALIL, 2008. 130 p.

CANAZA-CAYO, A.W. et al. Genetic parameters of milk production and reproduction traits of girolando cattle in Brazil. **Italian Journal of Animal Science**, v.17, n.1, p.22-30, 2018.

CARDOSO, F.H.T. **Identificação de fatores de virulência e susceptibilidade a antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite bovino em Minas Gerais**. 1999. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1999

CARMO, L.S. **Produção e purificação em grande escala das enterotoxinas estafilocócicas SEA, SEB, SEC2, SED e TSST-1 para uso em ensaios imunoenzimáticos**. 2001. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001

CARVALHO, G.; ROCHA, D. T.; CARNEIRO, A. **INDICADORES: LEITE E DERIVADOS**, v. 9, n. 79, 2018. Embrapa Gado de Leite-Fôlder/Folheto/Cartilha (INFOTECA-E).

CHOMCZYNSKI, P.A. Reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. **Biotechniques**, v.15, n.3, p. 532-537, 1993.

COSTA, E.O. Etiologia bacteriana da mastite bovina no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de microbiologia**, v.17, p.107-112, 1986.

COSTA, E. O. D. Importância econômica da mastite infecciosa bovina. **Comunicações Científicas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v.15, n.1, p.21-26, 1991.

COSTA, et al. Estudo etiológico da mastite clínica bovina. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.17, n4, p.156-158, 1995.

COSTA, E.O. Resíduos de antibióticos no leite: um risco à saúde do consumidor. **Higiene Alimentar**, v.10, n.44, p.15-7, 1996.

CUNHA, A.F.; et al. Prevalência, etiologia, e fatores de risco de mastite clínica em rebanhos leiteiros de Viçosa – MG. **Acta Veterinária Brasílica**, v.10, n.1; p. 48-54, 2016.

DRECHSLER, C. I. Análises de controle de qualidade no recebimento do leite na indústria de laticínios Lac Lelo. 2013. 64 f. TCC (Graduação) - Curso de Tecnologia em Alimentos, FAI - Faculdade de Itapiranga, Itapiranga, 2013.

DU PREEZ J.H. Bovine mastitis therapy and why it fails: continuing education, **J. S. Afr. Vet. Assoc.** 71: 201-8, 2000

FAO Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Producción de alimentos de origen animal: código de prácticas de higiene para la leche y los productos lácteos – CAC/RCP 57-2004. 2ª ed. Roma: FAO/OMS; 2009.

FERREIRO, L. Agentes etiológicos e terapêutica da mastite bovina no Brasil. **Arquivo Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, v.06, p.77-88, 1978.

FETSCH, A., JOHLER, S. *Staphylococcus aureus* as a foodborne pathogen. **Curr. Clinical Microbiological**, v.5, n. 2, p.88-96, 2018.

FREITAS, C. H. et al., Identification and antimicrobial susceptibility profile of bacteria causing bovine mastitis from dairy farms in Pelotas, Rio Grande do Sul. **Braz. J. Biol. V.** 78, n.4, p. 3274-3281, 2018

FREIWALD, A. AND SAUER, S. Phylogenetic Classification and Identification of Bacteria by Mass Spectrometry. **Nature Protocols**, v.4, p.732-742, 2009.

GARCIA, M.L. MORENO, B. BERGDOLL, M.S. Characterization of Staphylococci isolated from mastitis cows in Spain. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 39, p.584-593, 1980.

GERMANO, P.M.L. Prevenção e controle das toxinfecções de origem alimentar. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.7, n.27, p.6-11, 1993

GLANTZ, M. **Efeitos da seleção de animais na composição e processabilidade do leite**. Vol. 92, nº 9, p. 4589-4603. 2009.

GOMES F, HENRIQUES M. Control of Bovine Mastitis: Old and Recent Therapeutic Approaches. **Current Microbiological**, v.72, n.4, p.377-82, 2016.

GUIMARÃES, G.; LANA, R.P. Análise de fatores que afetam a produção de leite em nível de propriedade e por estado brasileiro. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v.1, n.2, p.91-95, 2011.

HALL, G.L.; et al. Respiratory function in healthy young children using forced oscillations. **Thorax**. v. 62, p. 521–526, 2007.

HAMDAN-PARTIDA, A.; GARCIA, S.G.; BUSTOS-MARTÍNEZ, J. Identificación de *Staphylococcus aureus* utilizando como marcadores los genes nucA y femB. **Revista de Ciências Clínicas**, v.16, n.2, p.37- 41, 2015.

HOSMER JR., D. W.; LEMESHOW, S; STURDIVANT, R.X. **Applied logistic regression**. New York: Wiley, 2013. 510 p.

ISRAEL, L.F.S.; et al. Produção de biofilme por *Staphylococcus chromogenes* isolados de amostras de leite provenientes de rebanhos bovinos com mastite. **Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.70, n.6, p. 1946-1949, 2018.

JAMALI, H. RADMEHR, B. ISMAIL, S. Short communication: Prevalence and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis. **Journal Dairy Science**, v.97, n.4, p.2226-2230, 2014.

JAY, J. M. Staphylococcal Gastroenteritis. **Modern Food Microbiology**. Aspen Publishers Inc. Gaithersburg Maryland: 2000. p.441-459.

KITCHEN, B.J. Review of the progress of dairy science: Bovine mastitis: Milk compositional changes and related diagnosis tests. **Journal of Dairy Research**, v.48, p.167-188, 1981.

KOBAYASHI, P.F et al. Detection of *Brucella* spp, *Campylobacter* spp. And *Listeria monocytogenes* in raw milk and cheese of uninspected production in the metropolitan area of São Paulo. **Semina: Ciências Agrárias**, v.38, n.4, p 1897-1904, 2017.

KUPPEVELD, V.F.J.M.; et al. Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by a Mycoplasma Group-Specific PCR. **Applied Environment Microbiology**, v.60, p.149-152, 1994.

KWON et al. Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) characterization and molecular analysis for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and novel SCC mec subtype IVg isolated from bovine milk in Korea. **Journal Antimicrobiology Chemother**, v.56, p.624-632, 2005.

LANGE, C.C. et al. Uso de PCR e sequenciamento do rDNA 16S para identificação de bactérias do gênero *Staphylococcus* isoladas de mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, p. 36-40, 2011.

LANGE, M. J. et al. Tipologia de manejo de ordenha: análise de fatores de risco para a mastite subclínica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.37, n.11, p. 1205-1212, 2017.

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

LIMA, A. L. A. et al. Perfil de sensibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de leite de vacas com mastite em propriedades de agricultura familiar. **Research, Society and Development**, v.9, n.11, p. 1-17, 2020.

MAIA, K.M. et al. Métodos de higienizações de teteiras e incidência de bactérias causadoras de mastite. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v.10, n.2, p.2096-2109, 2016.

MARONEY, M.J.; RUEGG, P.L. Case report –herd investigation into the role of *Pasteurella multocida* in a outbreak of mastites. **The bovine practitioner** v. 37, n.2, 2003

MCMANUS, C. et.al. Características produtivas e reprodutivas de vacas holandesas e mestiças Holandês x Gir no Planalto Central. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.5, p.819-823, 2008.

MEDEIROS, D.T., et al, Occurrence of *Campylobacter* spp. in raw and ready-to-eat foods and in a Canadian Food Service Operation. **Journal of Food Protection**, Desz Moines, v.71, nb.10, p. 2087-2093, 2008

MELLA, A. et al., Evaluation of a new vaccine against *Staphylococcus aureus* mastitis in a dairy herds of southern Chile. I. Challenge trial, **Austral Journal of veterinary Sciences**, 49, 149-160, 2017.

MEGID, J.; RIBEIRO, M.G.; PAES, A.C. **Doenças infecciosas em animais de produção e companhia**. In: Mastites em animais domésticos 1^a. Ed. Rio de Janeiro: Roca, p. 1154 a 1205, 2020.

MENEZES, I.R et al. Qualidade microbiológica do leite cru produzido no norte de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.22, n.1, p.58-63, 2015.

METTIFOGO, E.; NASCIMENTO, E. R.; MULLER, E. E.; NASCIMENTO, M. G. E.; FREITAS, J. C. Mastite bovina por *Mycoplasma bovis*. **Rev. Bras. Med. Vet.**, n. 18, p. 22-25, 1996.

MILKPOINT, 2022. **Panorama de Mercado**. Disponível em: <https://www.milkpoint.com.br/noticias-e-mercado/panorama-mercado/queda-recorde-na-captacao-de-leite-no-primeiro-semester-segundo-previa-do-ibge-231060/> Acesso em: 22 de dezembro de 2022.

MOTA R.A., et al. Participação dos *Staphylococcus* spp. na etiologia das mastites em bovinos leiteiros no Estado de Pernambuco (Brasil). **Ciência Animal Brasileira**, v.13, n.91, p.124-130, 2012.

MURICY, R.F. **Ocorrência de mastite subclínica em caprinos e qualidade higiênico-sanitária do leite produzido em propriedades associadas à Cooperativa Languirú, Teotônia, RS.2003**. Dissertação de mestrado em Ciência Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003

NORO et al. Fatores ambientais que afetam a produção e a composição do leite em rebanhos assistidos por cooperativas no Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.1, p.1-, 2006.

NOVAES, S. F. D.; SCHREINER, L. L.; SILVA, I. P.; FRANCO, R. M. Residues of veterinary drugs in milk in Brazil. **Ciência Rural**, v.47, n.8, 2017.

OIE, In: BCG Manual of Diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. 2021. P.1185-1191 Disponível em: https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.04.04_BCG.pdf. Acessado em: 17 de setembro de 2021.

OLIVEIRA, J.M.B. et al. Fatores de risco associados à mastite bovina na microrregião Garanhuns, Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n.5, p.391-395, 2012.

OLIVEIRA, C.J.B. et al. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from Brazilian dairy farms and identification of novel sequence types. **Zoonoses and Public Health**, v. 63, p.97-105, 2016.

OLIVEIRA, P. V. C. et al. Avaliação da qualidade do leite cru e prevalência de mastite no município de Mossoró-RN. **Brazilian Journal of Development**, v.6, n.8, p.1-16, 2020.

OLSEN, J. E., CHRISTENSEN, H., AARESTRUP, F.M., Diversity and evolution of *blaZ* from *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. **Journal Antimicrobiological Chemother**, 57, n.3, p.450-460,2006

OMS. Organização Mundial da Saúde. **Zoonoses and veterinary public health. Fact sheets.** ProGrammes and projects, 2009. Disponível em: <<http://www.who.int/entity/en/>>. Acesso em: 13 nov. 2022.

OMOE, K. et al. Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates. **FEMS Microbiology Letters**, v.246, n.2, p.191-198, 2005.

PARKER A.M., et al A review of mycoplasma diagnostics in cattle. **J Vet Intern Med**, n. 32, 9. 1241-1252, 2018

PRETTO, L. G.; MÜLLER, E.; FREITAS, J. C.; METTIFOGO, E.; BUZINHANI, M.; YAMAGUTI, M.; SALVADOR, R. Mastite bovina por *Mycoplasma bovis* em rebanhos leiteiros. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 21, n. 4, p. 143-145, 2001.

PIMENTEL, F.E.; DIAS, R.S.; CARMO, L.S. et al. Presença de *Staphylococcus* sp. enterotoxigênicos e de enterotoxinas em queijo ralado. **Rev. Inst. Lat. Cândido Tostes**, v.57, p.227-229, 2002.

PHILPOT, W.N. **Mastitis Management.** (2ª edição). Ed: Babson Bros. Co., Illinois, U.S.A., 1984

QUINN, P.J., et al., 2005. eds **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas.** 1st ed. Porto Alegre: Artmed, 131-134 pp.

RADOSTITS et al. **Clínica Veterinária: Um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos.** 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 1772p.

RAIA JUNIOR, R.B. **Influência da mastite na ocorrência de resíduos antimicrobianos no leite.** Dissertação de mestrado em farmácia da Universidade de São Paulo, SP, 2001.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; HINCHCLIFF, K.W; CONSTABLE, P.D. **Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats.** 10nd ed.. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2007. 2156 p.

R CORE TEAM (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

REBHUN, W. C.; GUARD, C.; RICHARDS, C. M. **Diseases of dairy cattle.** Baltimore: Lea & Febiger, 1995. 530 p.

REIS, S.R.; SILVA, N.; BRESCIA, M.V. Antibioticoterapia para controle da mastite subclínica de vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**, v. 55, n. 6, p. 651-658, 2003.

RIBEIRO, M.G.; et al. Mastite bovina por *Pasteurella multocida*: estudo de nove casos
Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.62, n. 4, p. 985-988, 2010

ROSA, D.C. et al. Qualidade do leite em amostras individuais e de tanque de vacas leiteiras. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.79, n.4, p.485-493, 2012.

PINHEIRO DE SÁ, M. E.; et al. Importância do *Staphylococcus aureus* nas mastites subclínicas: pesquisa de enterotoxinas e toxina do choque tóxico, e a relação com a contagem de células somáticas. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v.41, n.5, p.321-326, 2004.

SALERNO, T.; SIQUEIRA, A.K.; FLAMINIO, A.P. et al. Pasteurelose bovina e ovina: Revisão de literatura. **Ver. Med. Vet.** P.6-13, 2008

SANTOS, M.V. O uso da CCS em diferentes países in: Mesquita, A.J.W., COELHO, K.O. Perspectivas e avanços da qualidade do leite no Brasil. Goiânia: Editora Talento, p.181-197, 2006.

SANTOS, M.V; FONSECA L.F.L. Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite. São Paulo: **Manole**, 2007.314p.

SANTOS, O.C.S. et al. Identification of coagulase negative staphylococci from bovine mastites using RFLP-PCR of the groEL gene. **Veterinary Microbiology**, v.130, p.134-140, 2008.

SENA, M.J. **Perfil epidemiológico, resistência a antibióticos e aos conservantes nisina e sistema lactoperoxidase de *Staphylococcus* sp isolados de queijos coalho comercializados em Recife - PE.** 2000. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000

SILVA, N.et al.. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água.** 5. ed, São Paulo: Blucher, 2010c. p. 560.

SILVA, E.R. et al. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus aureus* isolado de mastite subclínica bovina. **Revista Brasileira de Saúde Animal**, v.13, n,3, p.701-711, 2012

SILVA J. G., ALCÂNTARA A. M., MOTA R.A. Mastite bovina causada por *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina: revisão de literatura. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n.2, p. 223-228, 2018

SILVA, R. O. P. Comportamento do mercado de leite em 2021 e expectativa para 2022. **Análises e Indicadores do Agronegócio**, São Paulo, v. 17, n. 1, p. 1-8, jan. 2022. Disponível em: <http://www.iea.sp.gov.br/out/TerTexto.php?codTexto=16001>. Acesso em: 22 de novembro de 2022.

SCARCELLI, E.; et al. Avaliação do potencial de disseminação de *Campylobacter* spp. por diferentes espécies animais. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.65, p. 55-61,1998.

SAWANT A.A., GILLESPIE, B., OLIVER, S.P. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative *Staphylococcus* species isolated from bovine milk. **Veterinary Microbiology**, 134, n.1-2, p. 73-81, 2009.

SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; NADER FILHO, A. Ação de Antibióticos e Quimioterápicos Sobre Alguns Agentes Bacterianos de Mastite Bovina. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 39, n.233, p. 29-33, 1984.

SEAD -Secretaria Especial de Agricultura Familiar e do Desenvolvimento Agrário, 2016 Disponível em :<http://ruralpecuaria.com.br/tecnologia-e-manejo/agricultura-familiar/o-que-e-a-agricultura-familiar>. Acesso em : 10 de outubro de 2022

SIMÕES, T.V.M.D.; OLIVEIRA, A.A. **Mastite bovina: Considerações e impactos econômicos**. Aracajú: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2012. 25p. Disponível em: http://www.cpatc.embrapa.br/publicacoes_2012/doc_170.pdf. Acesso em: 18 de agosto de 2022.

SCHMITZ, A.; RIESNER, D. Purification of nucleic acids by selective precipitation with polyethylene glycol 6000. **Anal Biochem**, v.15, p. 354-311, 2006.

SOUZA, K. S. S. et al. Resistência a antimicrobianos de bactérias isoladas de vacas leiteiras com mastite subclínica. **Caderno de Ciências Agrárias**, v.8, n.2, p.83-89, 2016.

STAMFORD, T.L.M. et al. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus spp.* isolados de leite *in natura*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.26, p.41-45, 2006.

TOMAZI, T. et al. Identification of coagulase-negative staphylococci from bovine intramammary infection by matrix-assisted-laser-desorption-ionization-time of flight mass spectrometry. **Journal Clinical Microbiological**. V.52, p.1658-1663, 2014.

WEISBURG, W.G.; BARNS, S.M.; PELLETIER, D.A.; LANE, D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, v.173, n.2, p. 697-703, 1991.

WILSON, D.J.; et al, Test agreement among biochemical methods, matrix- assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and 16 S rRNA sequencing for identification of microorganisms isolated from bovine milk. **Journal Clinical Microbiological**. V.57, n.3 p.1-8, 2019.

WINN, W.C., et al, **Estafilococos e Cocos-Gram-Positivos**. In: Koneman EW, Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido. 6th rev ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 618-637pp. 1565 p.

ZAFALON, L.F., et al. Aspectos epidemiológicos da mastite bovina causada por *Staphylococcus aureus*. **Veterinária e Zootecnia**. v.15, n,1, p. 56-65, 2008

ZIMERMANN, K. F.; ARAÚJO, M. E. M. Mastite bovina: agentes etiológicos e susceptibilidade a antimicrobianos. **Revista Ciências Exatas e da Terra e Ciências Agrárias**, v.12, n.1, p.1-7, 2017.

ZOCHE et al. Qualidade microbiológica e físico-química do leite pasteurizado produzido na região oeste do Paraná. **Archives of Veterinary Science**, v.7, n.2, p.1-4, 2002.