



## Frequência e Multiresistência a Antimicrobianos de *Staphylococcus* sp Isolados em Rebanhos Leiteiros do Norte de Minas Gerais

Lívia Mara Vitorino da Silva<sup>1</sup>, Anna Christina de Almeida<sup>2</sup>, Cintya Neves de Souza<sup>3</sup>, Suely de Jesus Oliveira<sup>4</sup>, Adriana Xavier Alberico Ruas<sup>4</sup>, Samuel Ferreira Gonçalves<sup>5</sup>, Paulo Henrique Batista Bicalho Maia<sup>5</sup>, José Wilker Gomes de Lima<sup>5</sup>, Idael Matheus Góes Lopes<sup>5</sup>, Lis Lorena Melúcio Guedes<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Bolsita de Iniciação Científica PROBIC/PRPq- Instituto de Ciências Agrárias UFMG [lviavitorino@yahoo.com.br](mailto:lviavitorino@yahoo.com.br)

<sup>2</sup> Docente Instituto de Ciências Agrárias- UFMG

<sup>3</sup> Técnica Laboratório Sanidade Animal- Instituto de Ciências Agrárias- UFMG

<sup>4</sup> Mestrado em Produção Animal Instituto de Ciências Agrárias- UFMG

<sup>5</sup> Graduandos em Zootecnia Instituto de Ciências Agrárias- UFMG

### Resumo

A mastite bovina é uma inflamação da glândula mamária e sua disseminação depende da interação entre o homem, animal, ambientes e agentes patogênicos que desencadeiam o processo inflamatório. A doença causa grandes perdas econômicas nos setores da indústria de laticínios. Um dos microrganismos mais encontrados em leite contaminado é o *S.aureus*, patógeno produtor de várias toxinas e estáveis ao calor. O tratamento para as infecções intra mamária é através da utilização de antibióticos, porém, na maioria das vezes é utilizado de forma errônea e abusiva o que contribuí para aumento da resistência dos patógenos e cria dificuldades para o tratamento das infecções. O objetivo deste estudo foi avaliar a multiresistência de cepas de *S.aureus* presente em leite contaminado com mastite subclínica frente aos antimicrobianos. Foram avaliadas dez propriedades localizadas nas regiões do Norte de Minas Gerais, totalizando quinhentos tetos coletados, analisados e identificados quanto ao tipo de bactéria presente. Realizou-se o antibiograma através da técnica de difusão em disco. Dos quinhentos tetos analisados cento 33,4% apresentaram isolados *Staphylococcus*.sp. Na propriedade dez foi apresentou 43,75% de isolados *Staphylococcus*.sp. Das 167 amostras analisadas 92 totalizou ser SCN e 75 SCP. Houve diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre os isolados de SCN e SCP, no qual as propriedades 6 e 9 apresentaram 100% das amostras coletadas foram SCP. O antibiograma observou-se que as bases amoxicilina, penicilina e ampilicina obtiveram maior resistência antimicrobiana, sendo as fazendas 8 e 10 com maior resistência a esses antibióticos. Na análise de correlação de Pearson  $r$  ( $p < 0,05$ ) foram observados maior e significativa de MAR para as propriedades 1 e 3, 1 e 10, 2 e 6 e 3 e 10. Conclui-se que o número de *S.aureus* foi significativo e apresentou maior resistência aos antibióticos convencionais a base de amoxicilina, penicilina e ampilicina.

**Palavras-chave:** doença infecciosa; mastite; resistência antimicrobiana; *Staphylococcus* sp



## Introdução

A mastite subclínica é um dos principais fatores prejudiciais na saúde dos bovinos leiteiros, o que acarreta em grandes perdas econômicas nas indústrias de laticínios em todo o mundo (GANDA *et al*, 2016).

A doença é manifestada de duas maneiras; mastite clínica e subclínica. A primeira possui característica evidente da sua manifestação, mas a segunda é necessários exames complementares para a detecção. A mastite também é subdividida e acordo com o patógeno encontrado, são classificados como mastite contagiosa e mastite ambiental (SILVA *et al*, 2010).

A infecção da glândula mamária é provocada por vários agentes patogênicos (VAZQUEZ *et al*, 2013).

Os patógenos com maior incidência de mastite clínica estão incluídos os grupos, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, coliforms como *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter* spp, *Citrobacter* spp e *Pseudomonas* spp. Esses agentes bacterianos causam maior impacto na saúde dos bovinos leiteiros, na qualidade e produtividade do leite (ZADOKS, FITZPATRICK, 2009).

Sendo um dos principais o agente patogênico, *Staphylococcus aureus* são causadores da mastite clínica e subclínica em vacas leiteiras. O contágio é feito através de animal para animal no momento da ordenha, pelo ambiente e outros fômites (JAMALI *et al*, 2014).

A alta prevalência de *Staphylococcus* sp no rebanho leiteiro é um desafio para a criação de programas de controle. Além disso, esse gênero bacteriano possui a capacidade de desenvolver resistência aos antibióticos o que acarreta em um alta disseminação infecciosa na glândula mamária (SILVA *et al*, 2012).

O uso indiscriminado de antibióticos, seja para controle de mastite ou para outras doenças infecciosas, contribuiu para o aumento da taxa de resistência antimicrobiana em diversos tipos de bactérias (AMÁBILE- CUEVAS, 2010).

O objetivo deste estudo foi avaliar a frequência e a multiresistência de cepas de *Staphylococcus* sp presente em leite contaminado com mastite subclínica frente a antimicrobianos em propriedades localizadas no Norte de Minas Gerais.



## Metodologia

### Coleta das amostras de leite e informações sobre o rebanho

O trabalho foi conduzido em dez propriedades no Norte de Minas Gerais, com rebanhos leiteiros de raças mestiças em diferentes períodos de lactação e manejo nutricional atendidas pelo Programa de Apoio a Agricultores Familiares (PROAF). A pesquisa foi realizada através de visitas técnicas situadas nas cidades em Mathias Cardoso (01), São João da Lagoa (01), Janaúba (03), Icarai (03), Francisco Sá (01) e Porteirinha (01). Cada uma das propriedades em estudo e coletaram-se dados obtendo-se o manejo de ordenha, tratamento e controle de casos de mastite e auxílio e capacitação dos produtores para o controle de mastite subclínica.

Em cada animal, antes da ordenha, realizou-se caneca telada (*Tamis Test*) para diagnóstico de mastite clínica e *California Mastitis Test* (CMT) para diagnóstico da mastite subclínica. Para o teste de caneca telada, os resultados foram classificados apenas em negativo (-) ou positivo (+) (FONSECA; SANTOS, 2001). O teste de CMT foi realizado em todas as matrizes em lactação, a partir do 15º dia pós-parto utilizou-se um produto comercial, específico para o teste e os tetos foram classificados em: negativo (-), reação leve (+), moderada (++) e intensa (+++), de acordo com a intensidade do gel (SCHALM; NOORLANDER, 1957). Foram analisados quinhentos tetos.

Coletaram-se amostras de leite de todos os tetos positivos ao teste de caneca telada ou ao CMT, totalizando cento e sessenta e sete amostras coletadas. Para a coleta do leite, os tetos eram previamente limpos com algodão embebidos em álcool na concentração de 70% e os primeiros jatos Os tetos mais distantes do ordenhador eram primeiramente higienizados evitando a recontaminação. Os frascos com as amostras foram acondicionados em caixas térmicas com gelo e temperatura de aproximadamente 4 a 5°C (Simões *et al.* 2013) sendo mantidas até a entrega ao laboratório de Sanidade Animal do Instituto de Ciências Agrárias da UFMG.



## Isolamento e Identificação de *Staphylococcus* sp

As análises microbiológicas foram conduzidas conforme recomendações de Quinn *et al.* (2005) e KONEMAN *et al.*, (2001) As amostras de leite foram inoculadas em meio Agar sangue ovino a 5,00% (v/v), com incubação na estufa entre 35 e 37 °C, por 24 a 48 horas, em aerobiose As colônias que cresceram foram observadas quanto à morfologia, tamanho, pigmentação e presença de hemólise.

Para a avaliação das características microscópicas das colônias, procederam-se à análise de coloração de Gram. Os isolados que apresentaram morfologia microscópica típica (cocos Gram-positivos, agrupados em cachos). Foram realizadas provas bioquímicas para identificação de *Staphylococcus* sp, as amostras pesquisadas quanto à produção de catalase. Através de uma alçada da colônia em lâmina de vidro foram adicionados 0,2 ml de peróxido de hidrogênio a 3,00%(v/v). Foi classificada como gênero *Staphylococcus* sp, quando ocorreu à produção de bolhas de oxigênio a partir da enzima catalase. Por meio do teste da coagulase lenta em tubos, diferenciaram-se *Staphylococcus* coagulase positiva ou negativa. Em tubos de 10 x 100 mm esterilizados adicionados 0,2 ml da cultura teste e 0,5 ml de plasma de coelho liofilizado; após homogeneização, as amostras foram incubadas em estufa, sob temperatura de 35 a 37 °C. A leitura foi realizada às 24 horas, para verificar a formação de coágulos. Após esse período, avaliou-se macroscopicamente a reação, pela intensidade da formação de malha de fibrina, em: uma cruz, coágulos pequenos e desorganizados; duas cruzes, coágulos pequenos e organizados; três cruzes, coagulação grande e organizada, e quatro cruzes, coagulação completa. A caracterização da espécie *S.aureus* realizou-se através de provas bioquímicas com teste da desoxiribonuclease (DNase) e crescimento em Agar sal manitol (Prodimol®) conforme Simões *et al.*, (2013).



## Antibiograma

As cepas de *Staphylococcus* sp encontradas nas amostras de leite foram submetidas ao método sensibilidade *in vitro* a antimicrobianos utilizando a técnica de disco difusão (NCCLS, 2003). Utilizou-se os principais antimicrobianos indicados para a terapia intramamária e/ou parenteral contra mastite bovina e recomendada para testes de sensibilidade para *Staphylococcus* sp (CLSI 2105). As bases utilizadas foram gentamicina, ampicilina, amoxicilina, ciprofloxacina, cefalotina, penicilina, cefoxitina, oxacilina, nitrofurantoína e amicacina.

Com o auxílio de *swab* estéril, uma suspensão da cultura, padronizada em 0,5 pela escala de Mac Farland foi semeada em placas de Agar Muller-Hinton® (MH) por toda a superfície do meio.

Com pinça estéril, discos impregnados com os antimicrobianos foram depositados e levemente pressionados sobre o meio na placa de Petri, mantendo-se entre eles a distância de aproximadamente três centímetros. Após a incubação em estufa, à temperatura de 35 a 37 °C, por 18 a 24 horas, o diâmetro dos halos de inibição foram medidos com régua milimetrada e os resultados médios foram interpretados de acordo com CLSI (2015).

## Análise Estatística

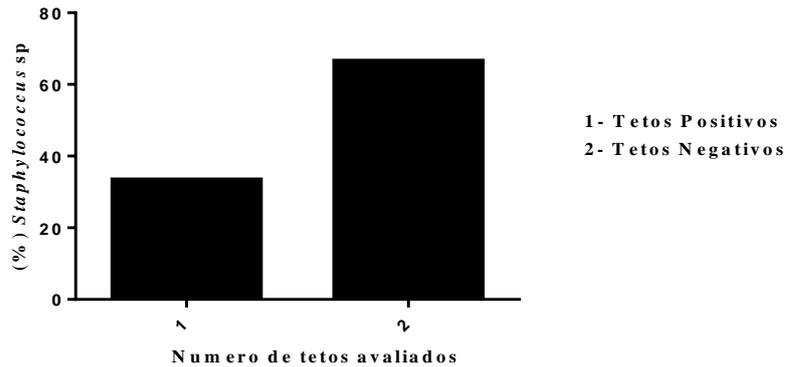
Os resultados foram interpretados através da análise descritiva e comparação de médias de resultados obtidos entre as propriedades, bem como avaliação da associação de resultados microbiológicos com as práticas de manejo adotadas. Os índices de resistência para cada antimicrobiano e o índice de múltipla resistência aos antimicrobianos (MAR) foram obtidos para todos os isolados de acordo com Krumpferman (1983).



## Resultados e Discussão

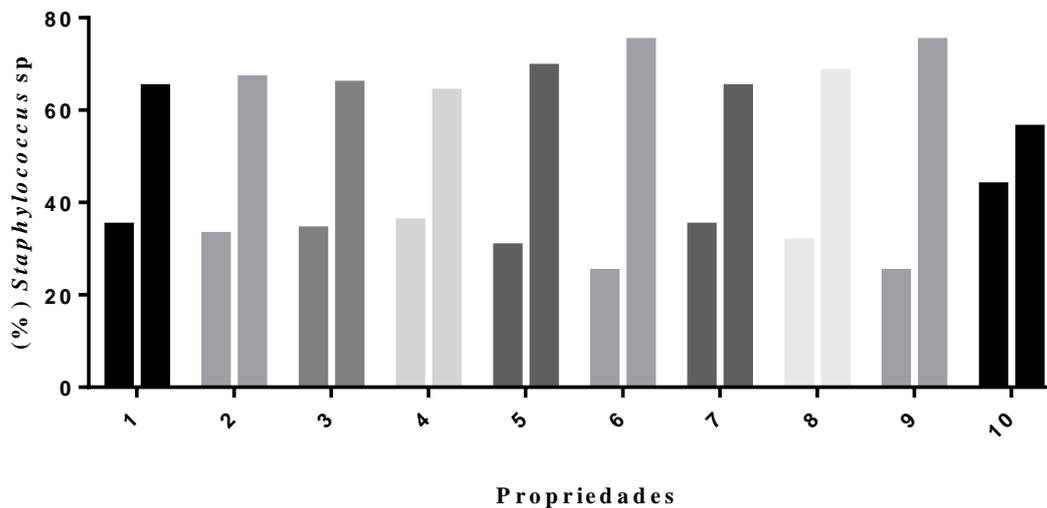
A frequência de *Staphylococcus* sp isolados do leite de vacas leiteiras das dez propriedades em estudo, foi de 33,4% (n= 167/500) (FIGURA 1).

**Figura 1:** Frequência de isolados de *Staphylococcus* sp em tetos bovinos de propriedades do Norte de Minas Gerais



Ao avaliar a frequência de *Staphylococcus* sp (FIGURA 2) entre as propriedades não houve diferença estatística ( $p > 0,05$ ), indicando que a frequência é alta em todas as propriedades estudadas.

**Figura 2:** Distribuição de frequência de *Staphylococcus* sp em propriedades rurais nas regiões do Norte de Minas Gerais, no período de janeiro a abril

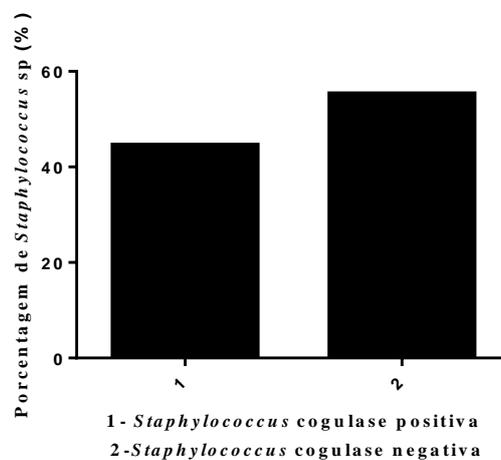




Relatos de isolamentos de *Staphylococcus* sp na literatura são resultados variados, no entanto menores que os aqui obtidos. Das duzentas e trinta e cinco amostras analisadas por Metz *et al*, (2010), 29,36% (n=69/235) apresentaram isolados de *Staphylococcus* sp.

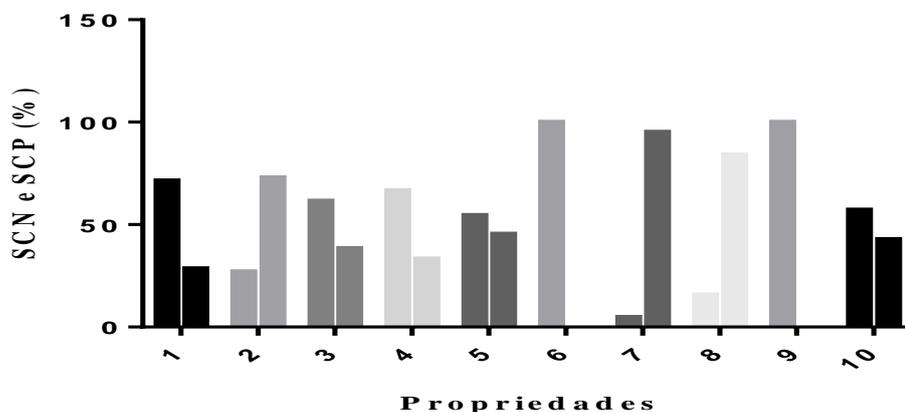
A frequência de identificação de *Staphylococcus* coagulase positiva foi de 44,91% (n=75/167) entre os *Staphylococcus* sp e os demais foram agrupadas *Staphylococcus* sp coagulase negativa, que correspondeu a 55,09% (92/167) (FIGURA3).

**Figura 3:** Frequência de isolamento de *Staphylococcus* sp em tetos bovinos de propriedades no Norte de Minas Gerais



Observou-se (FIGURA 4) que entre isolados, a frequência de cepas identificadas como *Staphylococcus* sp coagulase positiva e de agrupamentos *Staphylococcus* sp coagulase negativa foi diferente ( $p < 0,05$ ) entre as propriedades analisadas. As fazendas seis e nove apresentaram 100% de isolados de *Staphylococcus* sp coagulase positiva.

**Figura 4:** Frequência pelo Teste Qui- quadrado de *Staphylococcus* sp coagulase positiva e *Staphylococcus* sp coagulase negativa em rebanhos leiteiros no Norte de Minas Gerais



Os dados aqui obtidos são preocupantes, visto que *Staphylococcus* sp é um agente de alta patogenicidade para a glândula mamária e traz prejuízos consideráveis para a cadeia leiteira e deve-se considerar ainda que a frequência aqui relatada refere-se a tetos com mastite subclínica.

Identificação de *Staphylococcus* sp estão presentes na literatura e são condizentes com a frequência aqui obtida.

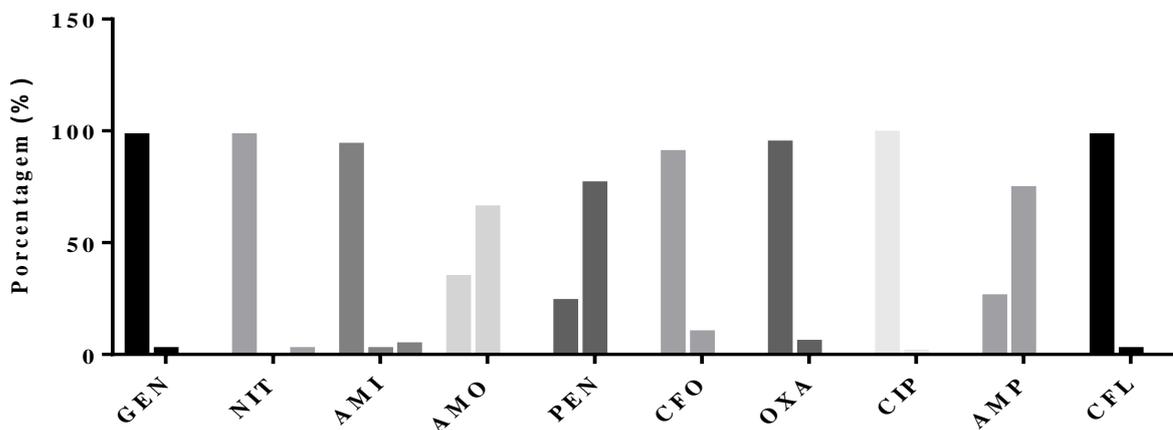
Entre 191 vacas com mastite clínica 27% (n=51/191) apresentaram isolados de *Staphylococcus* sp o que correspondeu a 11% de tetos (n=82/757) em que foi identificado *S. aureus* (Capurro *et al*, 2010).

Na região do Estado de São Paulo, em 245 amostras analisadas, foram identificados 18 isolados como *Staphylococcus* sp o que representa 7,3% (n=18/245) e apresentou 22,2% (n=4/245) eram produtoras de toxinas (Fagundes *et al*, 2009).

Guimarães *et al*, (2013) observaram frequência de 51% de isolados agrupados como *Staphylococcus* coagulase positiva 49% agrupados em *Staphylococcus* coagulase negativa. Dos isolados identificados 68% (n=90) foram *Staphylococcus aureus*, 15% (n=21) para *S.intermedius*, 13% (n=19) *S. hyicus* e 4% (n=21) foram *S. chleiferi*, indicando também alta frequência de *Staphylococcus aureus*, bem como de outros *Staphylococcus* sp tanto coagulase negativa quanto positiva.

Quanto ao perfil fenotípico de sensibilidade de *Staphylococcus* sp, observou-se que as bases antimicrobianas amoxicilina (65,59%), penicilina (76,34%) e ampicilina (74,19%) apresentaram maior resistência antimicrobiana (FIGURA 5), indicando alta resistência a antimicrobianos do grupo de  $\beta$ -etalactâmicos.

**Figura 5:** Sensibilidade a antimicrobianos observada em *Staphylococcus* sp em rebanhos leiteiros do Norte de Minas Gerais.



**Nota:** Gentamicina (GEN); nitrofurantoina (NIT); amicacina (AMI); amoxicilina (AMO); penicilina (PEN); cefoxitina (CFO); oxacilina (OXA); ciprofloxacina (CIP); ampicilina (AMP); e cefaloxitina (CFL).



Na Tabela 1, foram apresentados dados de perfil fenotípico observado em cada propriedade. As propriedades oito e dez apresentaram maior resistência aos antibióticos amoxicilina, penicilina e ampicilina. Essa avaliação foi semelhante com que outros autores relataram, pois, também apresentaram resistência aos antibióticos testados.

**Tabela 1-** Perfil de sensibilidade antimicrobianos por propriedades no Norte de Minas Gerais

Antibiótico	Perfil	Distribuição de frequência									
		P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
GEN	Sensível	100	100	100	100	85,71	83,33	100	100	100	100
	Resistente	-	-	-	-	14,29	16,67	-	-	-	-
	Intermediário	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NIT	Sensível	100	100	100	100	85,71	100	100	87,5	100	100
	Resistente	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Intermediário	-	-	-	-	14,29	-	-	12,5	-	-
AMI	Sensível	100	100	100	100	42,86	100	100	100	66,67	50
	Resistente	-	-	-	-	28,57	-	-	-	-	-
	Intermediário	-	-	-	-	28,57	-	-	-	33,33	50
AMO	Sensível	87,5	-	10	10,53	42,86	66,67	100	50	33,33	50
	Resistente	12,5	100	90	89,47	57,14	33,33	-	50	66,67	50
	Intermediário	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PEN	Sensível	93,75	-	5	5,26	-	33,33	-	37,5	-	-
	Resistente	6,25	100	95	94,74	100	66,67	100	62,5	100	100
	Intermediário	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CFO	Sensível	100	100	100	100	100	66,67	-	50	100	-
	Resistente	-	-	-	-	-	33,33	100	50	-	100
	Intermediário	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OXA	Sensível	100	100	100	100	100	100	100	50	66,67	100
	Resistente	-	-	-	-	-	-	-	50	33,33	-
	Intermediário	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-



Distribuição de frequência

Antibiótico	Perfil	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
	Sensível	93,75	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	Resistente	6,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CIP	Intermediário	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Sensível	87,5	-	5	5,26	14,29	50	-	37,5	33,33	-
	Resistente	12,5	100	95	94,74	85,71	50	100	62,5	66,67	100
AMP	Intermediário	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Sensível	100	100	100	100	100	100	100	75	100	100
	Resistente	-	-	-	-	-	-	-	25	-	-
CFL	Intermediário	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Nota:** Gentamicina (GEN); nitrofurantoina (NIT); amicacina (AMI); amoxicilina (AMO); penicilina (PEN); cefoxitina (CFO); oxacilina (OXA); ciprofloxacina (CIP); ampicilina (AMP); e cefaloxitina (CFL).

Dos 93 isolados de *Staphylococcus* sp a partir de leite de tanque de 42 propriedades em Minnesota, USA, 29% foram resistentes a oxacilina, 17% a ampicilina, 16% penicilina e tetraciclina, 7% eritromicina, 5% a pirlimicina, 4% a novobiocina, 3% de estreptomicina e 1% ao ceftiofur, cefalotina indicando alta resistência e Haran *et al*, (2011), classificam os isolados com MRSA- *Staphylococcus* sp metilina resistente.

Ao estudarem 13 rebanhos em Wisconsin, USA, Oliveira *et al*, (2012) obtiveram isolados de *Staphylococcus* sp (n=116), sendo 58 de tetos com mastite clínica e 58 com mastite subclínica e observaram que 75% (n=87) não apresentaram resistência a nenhuma base antimicrobiana estudada, 24,1% (n=8) apresentaram resistência a pelo menos uma base (n=2) ou 2 bases (n=7) classes de antimicrobianos, e 0,9% (n=1) foram multiresistentes.

O índice de múltipla resistência aos antimicrobianos (MAR) está apresentado na Tabela 2. O MAR variou de 0 a 0,6 com média de 0,23 para as propriedades analisadas. Em 100% das propriedades observaram-se cepas MAR. Menor média foi observada na fazenda seis, porém 100% das cepas foi MAR e maior média foi observada na fazenda quatro com 18, 75% das cepas MAR.

**Tabela 2.** Índices de múltipla resistência à antimicrobianos (MAR) observados em *Staphylococcus* sp. isolados de leite de tetos com mastite subclínica no Norte de Minas Gerais

Fazenda	Frequência MAR* %	MAR		
		máximo	Mínimo	Média
1	100 (2/2)	0,4	0,3	0,35
2	85,71 (6/7)	0,4	0,1	0,271
3	100 (1/1)	0,3	0,3	0,3
4	18,75 (3/16)	0,3	0	0,375
5	100 (11/11)	0,3	0,3	0,3
6	100 (6/6)	0,4	0	0,2
7	62,5 (5/8)	0,6	0	0,3
8	95 (19/20)	0,3	0,1	0,28
9	94,73 (18/19)	0,3	0	0,27
10	66,66 (2/3)	0,3	0,1	0,266

\*Índices de múltipla resistência à antimicrobianos

Na análise de correlação de Pearson  $r$  ( $p < 0,05$ ) foi observado conforme a Tabela 3, correlação positiva de MAR para as propriedades um e três, um e dez, dois e seis e três e dez.

Quanto ao índice de resistência antibiótica múltipla os dados obtidos neste estudo foram semelhantes dos autores Costa *et al*, (2013). Eles relataram que foram observadas variações de 0 a 0,26 com a média de 0,13, das 65 amostras testadas o que correspondeu a 18,15% dos *Staphylococcus* sp testados.



**Tabela 3.** Correlação de Pearson ( $p < 0,05$ ) – relação entre as propriedades MAR

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
P1	-									
P2	0,373504 0,052386	-								
P3	0,788602 <0,0001	0,3286738 0,07854911	-							
P4	-0,12661 0,297396	-0,0760575 0,374977	-0,08812 0,355902	-						
P5	0,29815 0,100838	0,6005326 0,00255654	0,207514 0,190002	0,090077 0,352838	-					
P6	0,306073 0,094688	0,8910421 <0,0001	0,458832 0,020931	-0,03201 0,446715	0,452267 0,022635	-				
P7	0,33321 0,075555	0,6213353 0,001726861	0,499512 0,012466	-0,20908 0,188165	0,492366 0,013713	0,616153 0,001909	-			
P8	-0,2401 0,153947	-0,4934054 0,01352621	-0,35994 0,059519	0,150661 0,263032	-0,15768 0,253362	-0,70275 0,000275	-0,58714 0,003247	-		
P9	-0,64964 0,000967	-0,1670949 0,240676	-0,66832 0,000639	0,147788 0,267036	-0,01657 0,472357	-0,21986 0,175823	-0,23935 0,154727	0,495858 0,013092	-	
P10	0,915326 <0,0001	0,364229 0,0571918	0,969458 <0,0001	-0,10821 0,324874	0,254824 0,139126	0,422577 0,031713	0,460044 0,020627	-0,3315 0,076677	-0,69681 0,00032	-



## Conclusão

A frequência de identificação de *Staphylococcus* sp foi elevada nas propriedades e houve uma correlação positiva com multiresistência a antibióticos convencionais aos  $\beta$ -lactâmicos, o que evidenciou alta resistência bacteriana nos rebanhos leiteiros avaliados.

Os resultados provaram que é necessário um acompanhamento mais rigoroso nos rebanhos leiteiros e programas de conscientização dos produtores para evitar o uso indiscriminado de antibióticos.



## Referências

AMÁBILE-CUEVAS, C.F. Antibiotic resistance in México: brief overview of the current status and its causes. **Journal of Infection in Developin Countries**, v. 4, n. 3, p. 126-131, jan. 2010.

CAPURRO, A; ASPÁN, A; ERICSSON UNNERSTAD, H; PERSSON WALTER, K; ARTURSSON, K. Identification of potencial sources of *Stapylococcus aureus* in herds with mastitis problems. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 1, p. 180-191, out. 2009.

CLSL. Clinical Laboratory Standar Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standard – Ano 90, n M07- A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015. Disponível em <&lt;http://shop.clsi.org/c.1253739/site/Sample\_pdf/M100S25\_sample.pdf&gt;> Acesso em: 28 maio. 2016.

COSTA, G.M; BARROS, R.A; CUSTÓDIO, D.A.C; PEREIRA, V.P; FIGUEIREDO. D, J; SILVA, N. Resistência a antimicrobianos em bovinos leiteiros de Minas Gerais, Brasil. **Arquivo Instituto de Biologia**, v. 80, n. 3, p. 297-302, 2013.

FAGUNDES, H; BARCHESI, L; FILHO, A.N; FERREIRA, L.M; OLIVEIRA, C.A.F. Ocurrence of *Stapylococcus aureus* in raw milk produced in dairy farms in São Paulo State, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 346-380, nov. 2009.

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

GANDA, E.K; BISINOTTO, R.S, DECTER, D.H; BICALHO, R.C. Evolution of an on-farm culture system (accumast) for fast identification of milk pathogenes associated with clinical mastitis in dairy cows, maio. 2016. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4866694/pdf/pone.0155314.pdf>. Acesso em: 27. maio. 2016.

GUIMARÃES, F.F; NÓBREGA, D.B; PEREIRA, V.B.R; MARSON, P.M; PANTOJA, J.C.F; LANGONI, H. Enterotoxin genes in coagulase negative and coagulase positive stapylococi isolated from bovine milk. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 5, p. 2866-2872, jan. 2013.

HARAN, K.P; GODDEN, S.M; BOXRUD, D; JAWAHIR, S; BENDER, J.B; SREEVATSAN; S. Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus*, including methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*, isolated form bulk thank milk from Minnesota dairy farms. **Journal of Clinical Microbiology**, v.50, p. 688-695. dec.2011.



JAMALI, H; RADMEHR, B; ISMAIL, S. Short communication: Prevalence and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis. **Journal Dairy Science**, v. 93, n. 4, p. 2226-2230, dez. 2013.

KONEMAM, E.W; ALLEN, S.D; JANDA. Diagnóstico microbiológico. 5ª ed, Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica, p.1465, 2001.

KRUMPEMAN, P.H. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. **Applied and Environmental Microbiology**. n.46, v.1, p. 165-170. jul, 1983.

METZ, I, V; GAGNE, G; BORNES, S; MONSALLIER, F; VEISSEIRE, P; DELBES-PAUS, C; MONTEL, M.C. Cow teat skin, a potential source of diverse microbial populations for cheese production. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 326-333, nov. 2011.

OLIVEIRA, L; LANGONI, H; HULLAND, C; RUEGG, P. L. Minimum inhibitory concentrations of *Staphylococcus aureus* recovered from clinical and subclinical cases of bovine mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 4, p.1913-1920, out. 2011.

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

SCHALM, O.W.; NOORLANDER, D.O. Experiments and observations leading to development of the California mastitis test.J.. **American Veterinary Medical Association**, v.130, n.5, p.199, 1957

SILVA, E.R.; PEREIRA, A.M.G.; MORAES, W.S.; SANTORO, K.R.; SILVA, T.R.M. Perfil de sensibilidade antimicrobiano in vitro de *Staphylococcus aureus* isolado de mastite subclínica bovina. **Revista Brasileira Saúde Produção Animal**, Salvador, v.13, n.3, p. 701-711, jul/set. 2012.

SILVA, M.V.M.; NOGUEIRA, J.L. Mastite: controle e profilaxia no rebanho bovino. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, São Paulo, n.15, jul. 2010.

SIMOES, T.V.M.D; OLIVEIRA, TEIXEIRA, K.M; RODRIGUES, A.S; FREITAS, I.M. **Identificação laboratorial de Staphylococcus aureus em leite bovino**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, p. 11, 2013.

VAZQUEZ, H.C; JAGER, S; WALTER, W; ZSCHOCK, M; VAZQUEZ, M.A.C; EL-SAYED, A. Isolation and identification of main mastitis pathogens in Mexico. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**, v. 65, n. 2, p. 377-382, set. 2012.

ZADOKS, R.N.; FITZPATRICK, J.L. Focus on bovine mastitis: knowledge into practice. **Irish Veterinary Journal**. v.62, n.4, p. 59-70, Escócia, abr. 2009.