



INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DA PARAÍBA  
CAMPUS SOUSA  
BACHARELADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Mariely Pessoa de Brito

**DETECÇÃO DOS PRINCIPAIS MICRORGANISMOS CAUSADORES DE  
MASTITE NOS REBANHOS LEITEIROS DO SERTÃO PARAIBANO**

**SOUSA-PB**

**2022**



Mariely Pessoa de Brito

**DETECÇÃO DOS PRINCIPAIS MICRORGANISMOS CAUSADORES DE  
MASTITE NOS REBANHOS LEITEIROS DO SERTÃO PARAIBANO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado, como parte das exigências para a conclusão do Curso de Graduação de Bacharelado em Medicina Veterinária do Instituto Federal da Paraíba, Campus Sousa.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Suely Cristina Pereira de Lima Oliveira

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA CENTRAL DO IFPB CAMPUS SOUSA

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação**

Milena Beatriz Lira Dias da Silva – Bibliotecária CRB 4/2270

B862d

Brito, Mariely Pessoa de  
Detecção dos principais microrganismos causadores de  
mastite nos rebanhos leiteiros do sertão paraibano / Mariely  
Pessoa de Brito.  
31 p.

Orientador: Profa. Dra. Suely Cristina Pereira de Lima Oliveira.  
TCC (Bacharelado em Medicina Veterinária) - IFPB, 2022.

1. Pecuária. 2. Gado do leite. 3. Doenças bovinas. 4.  
Agropecuária paraibana. I. Oliveira, Suely Cristina Pereira de  
Lima. II. Título.

Mariely Pessoa de Brito

DETECÇÃO DOS PRINCIPAIS MICRORGANISMOS CAUSADORES DE MASTITE  
NOS REBANHOS LEITEIROS DO SERTÃO PARAIBANO

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em 17/08/2022 pela  
Comissão Examinadora.

Orientadora:

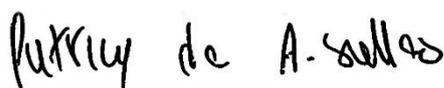


---

**Professora Dra. Suely Cristina Pereira de Lima Oliveira**

Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia da Paraíba – Campus Sousa  
Curso de Medicina Veterinária

Avaliadores (a):



---

**Professora Dra. Patrícia de Andrade Salles**

Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia da Paraíba – Campus Sousa  
Curso de Medicina Veterinária



---

**Professora Dra. Amélia Lizziane Leite Duarte**

Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia da Paraíba – Campus Sousa  
Curso de Medicina Veterinária

À minha querida avó Francisca Ferreira de Brito in memoriam e a  
toda minha família por todo apoio e amor  
durante a minha graduação.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, de uma forma muito especial, por não ter soltado a minha mão ao longo desses anos, por ter me guiado, guardado e proporcionado sabedoria para a conclusão desse sonho.

Aos meus pais e irmãos, por todo apoio, incentivo e amor, vocês são parte dessa conquista e com certeza ainda iremos comemorar juntos muitas outras.

A minha família e avós maternos, em especial a minha amada avó Francisca Ferreira de Brito (*in memoriam*), com certeza a senhora deve estar muito orgulhosa, pois este sonho também era seu.

A minha amiga Luana Lourenço Alves, por toda parceria e irmandade, obrigada por estar comigo nos altos e baixos da vida e da graduação.

Ao Médico Veterinário Dr. Anderson Lourenço Alves que abriu as portas de sua Assessoria Veterinária para que eu trabalhasse junto a ele, o qual me repassou muitos ensinamentos e que me colocou a frente de muitos desafios os quais contribuíram para meu crescimento profissional.

A minha querida orientadora Dr<sup>a</sup>. Suely Cristina Pereira de Lima Oliveira pelo suporte, orientação, paciência e dedicação na realização deste trabalho.

Aos meus colegas de graduação Hodias Filho e Caroline Gomes pelos anos de amizade compartilhados, por toda ajuda e companheirismo que tornaram a jornada mais leve e cheia de boas lembranças.

Deus abençoe cada um de vocês que de alguma maneira, contribuíram para a conclusão desta graduação, meus sinceros agradecimentos.

## RESUMO

A mastite consiste em um dos principais gargalos da produtividade leiteira atualmente, apresentando alta prevalência nos rebanhos e por se tratar de uma doença de caráter complexo e multifatorial a qual envolve diversos patógenos, o ambiente e fatores inerentes ao animal, quando não tratada de forma adequada implica em grandes prejuízos ao produtor. Portanto, com o objetivo de identificar os principais microrganismos causadores de mastite nos rebanhos do alto sertão paraibano e avaliar o perfil de resistência antimicrobiana foram avaliadas neste presente trabalho 170 amostras de leite de vacas com mastite clínica e subclínica nas fazendas das regiões de Sousa e cidades circunvizinhas. As amostras de leite foram submetidas a cultura e posteriormente antibiograma para avaliação do perfil de susceptibilidade dos agentes isolados frente aos antibióticos comumente usados pelos produtores na região. Constatou-se que o microrganismo com maior prevalência nos rebanhos foram o *Staphylococcus* spp. presente em 55,84% das amostras. Já com relação ao antibiograma, a gentamicina apresentou baixa sensibilidade, com resistência em 34,61% dos animais. Diante disso, o correto diagnóstico da mastite implica em redução nos gastos, uma vez que a identificação e avaliação da sensibilidade antimicrobiana permite a realização de tratamento adequados ao quadro clínico de cada animal, garantido a eficiência produtiva.

**Palavras-chave:** Infecção intramamária, Patógenos, Bovinos.

## ABSTRACT

Mastitis is one of the main problems of dairy productivity, currently, with a high prevalence in herds and because it is a complex and multifactorial disease that involves several pathogens, the environment and factors inherent to the animal, when not treated in an appropriate way. inadequate, implies in great losses to the producer. Therefore, with the objective of identifying the main microorganisms that cause mastitis in herds in the upper sertão of Paraíba and evaluating the antimicrobial resistance profile, in this present work, 170 milk samples from cows with clinical and subclinical mastitis on farms in the regions of Sousa-PB and surrounding cities. The milk samples were submitted to culture and subsequently antibiogram to evaluate the susceptibility profile of the isolated agents against antibiotics commonly used by producers in the region. Evaluating the results obtained from the analysis of the plaques, it was found that the microorganism with the highest prevalence in the herds was *Staphylococcus* spp. present in 34.28% of the samples. Regarding the antibiogram, gentamicin showed low sensitivity, with resistance in 34.61% of the animals. However, the practice of diagnosing mastitis implies a reduction in expenses, since the correct identification and evaluation of antimicrobial sensitivity allows the performance of appropriate treatment to the clinical condition of each animal, guaranteeing productive efficiency.

**Keywords:** Intramammary infection, Pathogens, Cattle

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação de espécies identificadas nos cultivos microbiológicos, subdivididas de acordo com o tipo de mastite no qual foram isolados ..... 18

Tabela 2 - Perfil de resistência dos microrganismos isolados aos antibióticos comumente utilizados nos rebanhos do alto sertão paraibano. .... 20

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

**%** Porcentagem

**° C** Graus Celsius

**BHI** Brain Heart Infusion Broth

**CCS** Células Somáticas

**CEUA** Comissão de Ética no Uso de Animais

**cm** Centímetro

**CMT** Califórnia Mastites Test

**DNA** Ácido Desoxirribonucleico

**HV-ASA** Hospital Veterinário Adílio Santos de Azevedo

**IFPB** Instituto de Educação, Ciência e Tecnologia da Paraíba

**mcg** Micrograma

**ml** Mililitros

**IN** Instrução Normativa

**n°** número

**PB** Paraíba

**RNA** Ácido Ribonucleico

**UI** Unidades Internacionais

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA. ....</b>	<b>12</b>
2.1. Bovinocultura leiteira na região de Sousa e impactos econômicos da mastite.....	12
2.2. Agentes etiológicos na mastite bovina .....	13
2.3. Antibioticoterapia e resistência bacteriana .....	15
2.4. Efeitos prejudiciais da mastite na indústria láctea .....	15
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>15</b>
3.1. Coleta das amostras de leite e triagem .....	15
3.2. Inoculação e antibiograma.....	16
3.3. Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) .....	17
3.4. Análise de dados .....	17
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>17</b>
4.1 Espécies isoladas nos cultivos microbiológicos .....	18
4.2 Antibiogramas.....	20
<b>5. CONCLUSÃO .....</b>	<b>19</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>20</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A bovinocultura brasileira tem destaque mundial na produção láctea, gerando alta lucratividade e renda de forma direta e indireta. No entanto, algumas patologias como a mastite, que consiste no processo inflamatório da glândula mamária, podendo ser de origem fisiológica, traumática, alérgica, metabólica e/ou infecciosa; podem gerar perdas na produtividade e provocar prejuízos diretos e indiretos para a cadeia produtiva do leite. É uma doença de caráter complexo e multifatorial a qual envolve diversos patógenos, o ambiente e fatores inerentes ao animal. Os principais microrganismos relacionados aos casos de mastite contagiosa são o *Streptococcus agalactiae* e *Staphylococcus aureus* (LOPES et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2016; COSER et al., 2012; NETO et al., 2011).

Esta enfermidade pode se manifestar na forma subclínica, onde normalmente os sintomas são imperceptíveis; na forma clínica ou crônica, podendo ainda comprometer severamente o estado geral do animal devido à infecção sistêmica (COSER et al., 2012; COSTA, 2013). Além de provocar alterações físico-químicas e na qualidade do leite produzido, a mastite também pode ocasionar alterações no parênquima da glândula mamária, levando à perda funcional e até mesmo a morte do animal. Outros prejuízos incluem descarte do leite por alterações e/ou pela presença de resíduos após tratamento, a elevação da mão de obra, custos altos com medicação e serviços veterinários e o descarte precoce dos animais (COSER et al., 2012; NETO et al., 2011).

Além disso, o uso imprudente de antimicrobianos para o tratamento da mastite pode desencadear resistência bacteriana e comprometer o tratamento com antibióticos nos animais e no homem. (SAINI et al., 2012). Diante disso, o conhecimento dos isolamentos microbiológicos da mastite são fundamentais para guiar a conduta dos profissionais de campo quanto a instituição da antibioticoterapia adequada e o correto tratamento dos animais.

Segundo Oliveira et al. (2016), outro ponto a se considerar é a questão de saúde pública, uma vez que muitos microrganismos encontrados no leite dos animais acometidos podem ocasionar infecções ou toxinfecções de origem alimentar, devido à produção de toxinas, que não são inativadas pelos processos de pasteurização e fervura.

Dessa maneira o presente trabalho visa detectar os principais microrganismos responsáveis pela mastite nos rebanhos leiteiros nas cidades de Sousa e microrregião, de forma a possibilitar a avaliação da sensibilidade destes agentes aos antimicrobianos frequentemente utilizados e a partir disso constatar o tratamento eficiente e específico que

garantam a saúde do rebanho, a produtividade, a qualidade final do leite e a saúde dos consumidores.

## **2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

### **2.1 Bovinocultura leiteira na região de Sousa e impactos econômicos da mastite**

O setor da bovinocultura leiteira é passível de diversificação, permitindo a produção tanto em pequena como grande escala e os produtos como o leite possibilitam e estimulam o beneficiamento e processamento no próprio entorno da região produzindo efeito de renda local e gerando empregos (GAZOLLA et al., 2013). A microrregião de Sousa-PB compreende uma bacia leiteira com um número significativo de produtores, possuindo cerca de 6.800 vacas destinadas a produção de leite, desenvolvendo a atividade pecuária para sustento e fornecimento diretamente as indústrias produtoras de derivados existentes no município como laticínios, fabricas de sorvetes e doces, constituindo a produção de leite uma fonte de renda considerável na região. Logo, a ocorrência de patologias as quais influenciem na produtividade do rebanho, como no caso da mastite, implicam diretamente em prejuízos ao produtor, pois contribuem na redução da qualidade do leite e do rendimento na fabricação de seus derivados na indústria (IBGE, 2020; ASHRAF et al., 2017).

A mastite ocasiona perdas econômicas e produtivas significativas sendo estas representadas por 70,0% devido à redução na produção do úbere com mastite subclínica; 14,0% pela desvalorização do animal devido a uma redução na função dos quartos mamários, morte ou eliminação precoce dos animais; 8,0% pela perda do leite que é descartado por alterações e ou pela presença de resíduos de antibióticos após o tratamento e 8,0% devido aos gastos no tratamento através da compra de medicamentos e com os serviços veterinários (PERES NETO; ZAPPA, 2011).

Os programas para controle devem ser a base de sustentação dos programas nacionais de qualidade do leite, devendo ser pautado em medidas preventivas, principalmente na identificação e tratamento adequado de animais infectados, sendo este um fator limitante e que apresenta uma grande dificuldade para ser atingido devido à complexidade da etiologia das mastites, ao momento em que se é diagnosticada e pelos aspectos de resistência microbiana (LANGONI et al., 2017).

Diante disso, pode-se dizer que a prevalência de mastite nos rebanhos está diretamente relacionada a qualidade do leite produzido, uma vez que a presença de resíduos de

antibióticos no leite acarreta riscos à saúde do consumidor e efeitos sobre o processamento industrial sendo assim de suma importância a instituição do tratamento correto com base na determinação do agente causador (BARBERIO et al.2002, CASSOL, 2010).

## 2.2 Agentes etiológicos na mastite bovina

Tem sido relatado que a mastite bovina pode ser causada por uma diversidade de microrganismos, incluindo bactérias, leveduras e fungos filamentosos, sendo esses últimos com menores incidência. Esta enfermidade pode ser causada por aproximadamente 137 espécies de microrganismos pertencentes a 35 gêneros, sendo as bactérias com maior prevalência (KEEFE, 2012).A classificação dos agentes etiológicos causadores de mastite infecciosa são de caráter contagioso, na qual vivem e se multiplicam sobre ou dentro da glândula mamária e sua transmissão ocorre de animal para animal ou de teto para teto durante a ordenha. E os ambientais, onde vivem no meio o qual os animais são criados e a infecção das glândulas ocorre no período entre as ordenhas. Essa última instala-se quando a imunidade do hospedeiro está comprometida ou quando as condições higiênicas sanitárias não são favoráveis (KULKARNI, KALIWAL 2013).

Segundo Acosta et al. (2016) os principais microrganismos frequentemente isoladas nos casos de mastite de origem infecciosa incluem *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulase negativa* (SCN), *Mycoplasma* spp., *Corynebacterium bovis*; já nas mastites por agente ambientais destacam-se a *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus* spp., *Pseudomonas* spp., *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus bovis*, *Enterococcus faecium*, *E. faecali*, leveduras, fungos e algas.

O *Staphylococcus aureus* consiste em um dos patógenos mais relevantes na mastite, levando muitas das vezes a necessidade de um controle mais intensificado em algumas regiões em virtude da sua alta contagiosidade e pelo número de animais que são descartados, principalmente vacas com histórico crônico da doença (HOGVEEN et al., 2011).

O *Streptococcus agalactiae* além de apresentar alta contagiosidade, os animais infectados são importantes reservatórios para o rebanho, cuja transmissão se dá durante o

processo de ordenha. Por estar mais presente no tipo de mastite subclínica, a antibioticoterapia é considerada eficaz para o controle e até mesmo a erradicação deste microrganismo no rebanho (RATO et al., 2013).

Em relação ao grupo das enterobactérias, a *E. coli*, a *Klebsiella* spp e a *Enterobacter* spp são consideradas as bactérias mais importantes nas mastites subclínicas (PANTOJA et al., 2009). Em casos de mastites com sintomatologia leve a moderada, pode haver casos septicêmicos fatais pela produção de endotoxinas que são absorvidas pela corrente sanguínea. O animal pode apresentar febre, desidratação, perda de peso, queda da produção láctea e até mesmo vir a óbito em função de infecção generalizada e toxemia (LANGONI et al., 2011).

O impacto causado por essa enfermidade deve-se ao descarte de fêmeas, à redução da produção de leite, à redução do valor comercial desses animais, às perdas na evolução genética do rebanho e aos gastos com medicamentos e mão de obra extra (DÜRR et al., 2004). Agregado a isso, causa prejuízos à indústria de laticínios devido a alterações na composição físico-química do leite, e ainda constitui ameaça à saúde dos consumidores devido à veiculação de patógenos e suas toxinas, ou pela presença de resíduos de antibióticos no leite (SANTOS et al., 2019).

### **2.3 Antibioticoterapia e resistência bacteriana**

Embora existam diversos métodos de controle e prevenção, a mastite ainda é apontada como a patologia com maior uso constante de antimicrobianos em bovinos leiteiros. O tratamento dessa enfermidade é considerado a principal causa de resíduos de antibiótico no leite em decorrência do uso indiscriminado e não cumprimento do período de carência indicado dos medicamentos (SANTOS et al., 2019).

De acordo com Barberio et al. (2002), o uso inadequado de antibióticos no tratamento da doença pode gerar o aparecimento de cepas resistentes e comprometer a eficiência do tratamento. Bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. são frequentemente resistentes aos antimicrobianos, em especial aos beta-lactâmicos, limitando assim, a escolha do antibiótico para o tratamento das infecções causadas por este agente (COELHO et al. 2009).

Pesquisas recentes demonstraram que houve um aumento acelerado da resistência a antibióticos em diversos países incluindo o Brasil o que tem ocasionado a presença de superbactérias em animais e nas carnes comercializadas tem significativas comprometimentos para a saúde humana, uma vez que pode ocorrer a transmissão destas através do consumo de carnes e derivados (VAN BOECKEL et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2016; SAINI et al., QUADROS et al., 2019).

Costa et al. (2013), observaram em amostras de leite oriundas de 35 rebanhos na região de Minas Gerais, variações nos perfis de resistência para alguns produtos que são rotineiramente utilizados no tratamento da mastite bovina, tais como tetraciclina, lincomicina, cefoperazona e sulfazotrim. Em alguns rebanhos, foram observados até cinco padrões distintos de resistência, o que resultou em 54 padrões de resistência diferentes para os 352 isolados testados.

#### **2.4 Efeitos prejudiciais da mastite na indústria láctea**

Com o passar dos anos, pode-se observar algumas mudanças em relação a implementação da legislação, na qual conseguiu-se preconizar padrões de qualidade do leite, a exemplo da Instrução Normativa IN nº 51 e a IN nº 62 e a mais recente IN nº 76 onde as indústrias passaram a remunerar os produtores por qualidade e a instituir padrões de produção. As questões de segurança e à inocuidade dos alimentos passaram a ser um dos principais desafios vinculados à cadeia produtiva (BRASIL,2018).

Dentre as diferentes problemáticas, a mastite bovina é considerada uma grande limitação mundial para a melhoria da qualidade do leite, devido ocasionar comprometimento tanto nas células alveolares quanto nas epiteliais mamárias, desencadeando alterações na composição do leite (PAIXÃO et al., 2014).

Essa patologia influencia de forma direta nas indústrias lácteas no que diz respeito ao rendimento e tempo de vida útil dos produtos nas prateleiras, uma vez que a elevação no número de células somáticas no leite com mastite compromete o rendimento na produção dos derivados devido ocasionar uma proteólise através da ação da plasmina e reduzir os níveis de caseína, lactose e dos teores de gordura, além de significativo aumento de elementos resultantes da resposta inflamatória como imunoglobulinas e albuminas. Na rotina de acompanhamento da qualidade do leite nas plataformas dos laticínios o leite que é proveniente de casos de mastite comumente apresenta alterações na acidez titulavel e no teste de redutase (DETILLEUX et al., 2015; MESQUITA et al 2018; QUADROS et al., 2019).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Coletas das amostras de leite e triagem**

As amostras de leite dos animais com mastite clínica e subclínica foram obtidas através de visitas a propriedades de produtores leiteiros na cidade de Sousa e região circunvizinha.

Nas propriedades, as coletas eram realizadas sempre na ordenha da manhã, sendo realizada a triagem de todos os animais com uso do Califórnia Mastites Test (CMT), que consiste em um método indireto no qual se baseia na atuação do reagente lauril sulfato de sódio a 3% com a membrana celular bacteriana, causando a ruptura da mesma e a formação de um gel e o resultado é avaliado em função do grau de gelatinização ou viscosidade da mistura de partes iguais de leite e reagente, uma vez que ao entrar em contato com o reagente a membrana das células somáticas se rompem liberando o DNA, que em contato com a água se hidrata ou torna-se viscoso. Os resultados são expressos em cinco escores: negativo (-) reação leve (+), moderada (++) e intensa (+++), os quais apresentam correlação relativamente boa com a contagem de células somáticas (PEIXOTO et al., 2009; DIAS et al. 2007).

Nos casos de mastite clínica, para a seleção dos animais foram considerados os seguintes critérios: presença de grumos no teste de caneca de fundo preto, leite ralo e de cor amarelado somados a presença ou não de alterações sistêmicas (hipertermia, inapetência) O leite dos animais que apresentaram resultado maior ou igual a 2 (++) e os que apresentaram alterações no teste da caneca de fundo preto foram reservados e destinados para as análises microbiológicas (BELOTI et al., 2015; GANDA et al., 2016).

Foram coletados assepticamente em tubos de ensaio, previamente esterilizados e identificados com nome/nº do animal, aproximadamente 50mL de leite, descartando-se sempre os três primeiros jatos e desinfetando os tetos com uso de álcool 70% para posteriormente serem encaminhadas sob refrigeração em caixas isotérmicas para o laboratório de Microbiologia do Hospital Veterinário do Instituto Federal da Paraíba, Campus Sousa e submetidos ao processo de análises em até no máximo 24 horas após a coleta.

#### **3.2 Inoculação e antibiograma**

O cultivo se deu inicialmente com a homogeneização das amostras e inoculação nas placas em meio Ágar Sangue, Ágar Sabouraud Dextrose, Ágar Macconkey e o Caldo BHI-Brain Heart Infusion Broth com auxílio da alça de platina, onde posteriormente foi incubada na estufa a temperatura de 37° C durante 24 horas e então realizada a leitura (ANVISA, 2010; GANDA et al., 2016).

A identificação das colônias foi realizada através do método coloração de Gram , onde após a preparação do esfregaço as lâminas foram coradas conforme a técnica e seguidas pela leitura no microscópio. Foram efetuados o teste de catalase em todas amostras retiradas das colônias que apresentaram crescimento nos meios de cultura para diferenciação dos microrganismos (CARDOSO, 2015).

A susceptibilidade dos agentes infecciosos isolados foi avaliada através do teste de sensibilidade *in vitro* também conhecido como antibiograma quanto aos antimicrobianos amoxicilina com clavulonato, neomicina, gentamicina, ciprofloxacina, tetraciclina e penicilina, que são os comumente utilizados no tratamento de vacas com quadros de mastite (MOTTA et al., 2011).

Conforme as normas da Clinical and Laboratory Standards Institute/CLSI (WAYNE,2016), foi realizada a suspensão bacteriana em solução fisiológica estéril e após observação de turvação, um swab foi submergido na suspensão para semeio em tapete das amostras em placas de Petri contendo Ágar Müeller-Hinton, adicionados os discos contendo os antibióticos e acondicionados a 37° na estufa, sendo avaliados após 24 horas. Os resultados foram classificados de acordo com o tamanho dos halos formados ao redor dos discos contendo os antibióticos em resistente (R), intermediário (I) ou sensível (S).

### **3.3 Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)**

O presente trabalho foi devidamente aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), do Instituto Federal da Paraíba (IFPB), Campus Sousa – PB, sob o protocolo de número 23000.001622.2020-11.

### **3.4 Análise de dados**

Os resultados das análises dos microrganismos identificados assim como do perfil de resistência frente aos antibióticos testados foram apresentados de forma descritiva. Os valores foram tabulados, calculados os percentuais respectivos e confrontados os resultados de acordo com a literatura.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Espécies isoladas nos cultivos microbiológicos

Foram examinadas 155 vacas provenientes de rebanhos leiteiros de 14 propriedades da região, das quais foram coletadas 170 amostras de leite somente dos animais positivos para mastite clínica e subclínica diagnosticadas a partir dos testes de CMT e da Caneca de fundo preto. Do total de amostras avaliadas que apresentaram crescimento nos meios (70,58%), constatou-se a prevalência de casos de mastite subclínica (55,29%) em relação a mastite clínica (15,29%), sendo que 29,52% das 170 amostras não apresentaram crescimento nas placas cultivadas.

Com relação aos patógenos isolados, foram identificados 120 microrganismos pertencentes as seguintes espécies: 67 amostras de *Staphylococcus* spp. (55,84%); 31 amostras de *Streptococcus* spp. (25,83%); 10 amostras de *Corynebacterium* spp. (8,33%) e 12 amostras de *Acinetorbaacter* spp. (10%) distribuídas na tabela 1 de acordo com a forma de apresentação da mastite que desencadearam.

Tabela 1. Espécies de bactérias identificadas nos cultivos microbiológicos de amostras de leite, subdivididas de acordo com o tipo de mastite no qual foram isolados na região de Sousa -PB.

AGENTE ISOLADO	MASTITE CLÍNICA	MASTITE SUBCLÍNICA	( % )
<i>Staphylococcus</i> spp.	20	47	55,84%
<i>Streptococcus</i> spp.	2	29	25,83%
<i>Corynebacterium</i> spp.	2	8	8,33%
<i>Acinetorbaacter</i> spp.	2	10	10,00%
<b>TOTAL</b>	26	94	100%

Fonte: o autor (2022)

O microrganismo que apresentou maior prevalência nos rebanhos foi o *Staphylococcus* spp. corroborando com Ribeiro et al. (2016) e Zecconi e Scali (2013), sendo considerado um agente de importância nos casos de mastite contagiosa, na forma clínica, subclínica ou crônica. Esse microrganismo possui alta taxa de sobrevivência na glândula mamaria devido suas características de adesão e fixação nas células epiteliais

desencadeando redução na produtividade em consequência da destruição do parênquima por micro abcedações e fibrosamento, que servem como barreira para ação do sistema imunológico; o qual é estabelecido a partir da infecção de um quarto sadio por outro contaminado em virtude de higienização e manejo inadequados da ordenha (KULKARNI & KALIWAL, 2013; HOGEVEEN et al., 2011).

Estudos desenvolvidos por Schvraz et al. (2012) demonstraram que os *Streptococcus* spp. representam outra classe de microrganismo que possui relevância na infecção, sendo o segundo com maior frequência nos isolados das amostras deste trabalho. Pode desencadear a mastite na forma aguda ou subclínica com significativa elevação na CCS, acarretando sérios problemas aos animais e a rentabilidade da fazenda. Sua transmissão acontece durante o período de realização da ordenha e as vacas infectadas por este agente constituem reservatórios consideráveis para todo o rebanho. É um microrganismo de caráter altamente contagioso, no qual consegue permanecer no parênquima da glândula mamária por longos períodos e por curto espaço de tempo no ambiente, apresentando boa resposta a antibioticoterapia. Além disso, apresenta prevalência elevada em tanques de expansão, presente em cerca de 44,5% de amostras de leite coletadas em pesquisas realizadas por Elias et al. (2012) e por Rato et al. (2013).

O *Corynebacterium* spp. é um agente comumente isolado em média de 10 a 25% dos casos de infecções intramamárias em vacas leiteiras, com quadros de discreta elevação das células somáticas e geralmente desencadeando a mastite na forma subclínica. Apesar de sua presença e importância nessa patologia, esse agente ainda é muito pouco estudado (GONÇALVES et al., 2014).

O *Acinetobacter* spp. foi o patógeno com menor frequência nos isolados, assim como em trabalhos realizados por Almassaudi (2016) e Bertoline (2022) com percentuais abaixo de 10,0% de prevalência corroborando com os resultados também encontrados no presente trabalho. É um agente infeccioso frequentemente isolado em animais, sendo considerado integrante da flora normal da pele, no entanto não é associado regularmente em casos de mastite bovina (MACIEL et al., 2016).

## **4.2 Antibiograma**

Em referência a avaliação de resistência aos antimicrobianos utilizados nos rebanhos em que foram coletadas as amostras, realizou-se o antibiograma somente nos animais que

apresentaram mastite clínica, com o intuito de a partir dos resultados obtidos orientar o produtor a instituir a antibioticoterapia eficiente para debelar o agente.

Desta forma o princípio ativo que os animais apresentaram elevada resistência foram a gentamicina (n=9), seguido pela penicilina (n=8), tetraciclina (n=5) , neomicina (n=3), amoxicilina com clavulonato (n=1) e nenhum animal apresentou resistência ao ciprofloxacino conforme descritos na tabela 2.

Tabela 2. Perfil de resistência dos microrganismos isolados aos antibióticos comumente utilizados nos rebanhos do alto sertão paraibano.

<b>ANTIBIÓTICOS</b>	<b>Nº DE ANIMAIS RESISTENTES</b>	<b>(%)</b>
GEN 10 mcg	9	34,61%
PEN G 10 UI	8	30,76%
TET 30 mcg	5	19,26%
NEO 30 mcg	3	11,53%
AMOX+CLAV 10/20 mcg	1	3,84%
CIP 5 mcg	0	0,00%

Legenda: GEN: gentamicina; PEN: penicilina; TET: tetraciclina; NEO: neomicina; AMOX: amoxicilina+ ac. Clavulônico; CIP: ciprofloxacino. Fonte: o autor (2022)

A gentamicina constituiu o antimicrobiano com menor sensibilidade na atual pesquisa, com índices semelhantes aos constatados por Carvalho et al. (2021) no qual essa classe de aminoglicosídeo apresentou resistência em 40% dos animais testados. Em Pernambuco, os percentuais de resistência para a gentamicina em rebanhos bovinos leiteiros apresentaram-se superiores a 50%. (MANZUR et al., 2020). Esse medicamento pertencente a classe dos aminoglicosídeos, possuindo ação bactericida e seu mecanismo de ação consiste na inibição da síntese de proteínas, onde após o transporte ativo se liga ao RNA ribossomal influenciando na tradução e resultando em proteínas defeituosas tanto de bactérias gram positivas e algumas gram negativas (CHAVES et al., 2021). A partir de observações durante as visitas nas fazendas as quais foram coletadas as amostras de leite em relação aos tratamentos usados, pode-se constatar que em praticamente todas esse princípio ativo era utilizado amplamente na rotina tanto no tratamento da mastite como também de outras enfermidades de origem bacteriana, fato que explica o perfil de resistência significativo desenvolvido pelos animais testados.

A penicilina foi o segundo antibiótico com maior perfil de resistência (30,76%) pelos microrganismos isolados, corroborando com Salaberry et al. (2016) e Noel et al. (2016) os quais relataram percentuais acima de 50% em amostras testadas. Já em uma pesquisa feita por Kurosawa et al. (2020) constatou-se índices de 34,5% de microrganismos não sensíveis a esse grupo de betalactâmico. Esta resistência é associada a capacidade destes agentes de produzir betalactamases, causando a lise dos anéis betalactâmicos constituindo o principal mecanismo de resistência a essa classe de antimicrobiano. O uso inadequado e indiscriminado de subdosagens possibilitam a seleção de cepas resistentes (ZIMERMANN et al., 2017).

O perfil de resistência no grupo das tetracilinas foi de 19,26 %, semelhante ao encontrado por Salaberry et al. (2016) e Kurosawa et al. (2020) de 14,5% e 13,8%, respectivamente. Segundo Zimmermann (2017) a síntese de uma proteína denominada Tet pelos agentes infecciosos desencadeia a resistência devido influenciar diretamente no transporte do antibiótico de dentro para fora da célula, fazendo com que o mesmo não desempenhe sua ação bacteriostática.

A neomicina apresentou baixo percentual de resistência (11,53%) quando observado o número de animais testados, resultados semelhantes foram encontrados por Dal Vesco et al. (2017) em que 17,68% dos animais desenvolveram resistência frente a esse antibiótico. O mecanismo de ação da neomicina está ligado a causar erros de leitura no código genético da bactéria essenciais para a síntese de suas proteínas e inibição da biossíntese da parede celular bacteriana (GUIMARÃES et al., 2019).

A classe dos antibióticos amoxicilina com clavulonato e ciprofloxacino representaram os medicamentos com melhor resposta frente ao combate dos agentes infecciosos. Os valores foram semelhantes também aos encontrados por Carvalho et al. (2021) de 16,67% e 0,0%, respectivamente. A amoxicilina pertence ao grupo dos betalactâmicos, assim como a penicilina, no entanto, era um dos fármacos utilizados com menor frequência nas fazendas, justificando o perfil de sensibilidade dos microrganismos diante desse medicamento.

O ciprofloxacino foi o único antibiótico que apresentou eficiência frente as bactérias isoladas nos cultivos, corroborando com Rosa et al. (2019) e Carvalho et al. (2021) que obtiveram os mesmos resultados em suas pesquisas. Este fármaco pertence ao grupo das quinolonas, com ação tanto em bactérias gram positivas como gram negativas e seu mecanismo de ação atua na replicação do DNA impedindo as atividades das enzimas DNA topoisomerase e DNA-girase, fundamentais na síntese de DNA, possuindo ação bactericida (TAI et al., 2021). Na rotina de tratamento da mastite nas propriedades, assim como a

amoxicilina, o ciprofloxacino não era um antibiótico usualmente empregado tanto por não ser um princípio tão difundido e de conhecimento por parte dos produtores na região para a terapêutica de mastite como também por possuir um custo mais elevado em relação aos demais antimicrobianos, no entanto constituiu a melhor escolha para o uso na terapia dos animais.

O grupo das penicilinas aparecem como os antimicrobianos com elevado número de citações assim como a gentamicina, tetraciclina e a neomicina (PINTO et al., 2021; DAL VESCO et al., 2017; ACOSTA et al., 2016). Tal resistência é atribuída ao uso intensivo de tais medicamentos em protocolos terapêuticos na rotina veterinária para o tratamento de infecções intramamárias em vacas lactantes ou secas, ou mesmo de outras enfermidades de origem bacteriana em criações de bovinos (MORITZ et al., 2016; SILVA et al., 2020) associada a expressão de determinados genes pelos patógenos que sofrem mutações nos principais mecanismos de ação dos fármacos possibilitando a sua multiplicação e crescimento mesmo na presença de elevadas concentrações em razão do uso de subdosagens e período de tratamento inadequados (BAKKEREN et al., 2020; MUNITA et al., 2016).

## 5. CONCLUSÃO

Conclui-se que há uma ampla variedade de microrganismos causadores de mastite bovina na região estudada, com predominância de bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. Para testes de sensibilidade a antimicrobianos conclui-se que a maioria dos agentes isolados são sensíveis aos diferentes antimicrobianos, sendo os antimicrobianos ciprofloxacino e amoxicilina + ácido clavulânico os que apresentaram melhor eficácia. Os maiores percentuais de resistência foram observados para gentamicina e penicilina.

Apesar do impacto comprovado que a mastite representa para a cadeia produtiva leiteira, foi possível determinar os principais microrganismos causadores de mastite na região do alto sertão paraibano sendo de grande importância para os produtores e pesquisadores da região.

Além disso, pode-se estabelecer o perfil de resistência dos microrganismos nos rebanhos, sendo possível avaliar como está sendo feito o uso de antimicrobianos para o tratamento da mastite e a partir destas informações instituir a conscientização e orientação devida aos produtores em relação a terapêutica correta a ser adotada para os animais, implicando na redução de gastos com medicamentos assim como contribuindo com a diminuição da resistência antimicrobiana gerada pelo uso incorreto de tais medicamentos.

## 6. REFERÊNCIAS

- ACOSTA, A.C. et al. Mastites em ruminantes no Brasil. **Pesq. Vet. Bras.**, v.36, n.7, p.565-573, 2016.
- ALMASSAUDI, S. B. Acinetobacter spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology and resistance features. **Saudi Journal of Biological Science, Deira**, v. 25, n. 3, p. 58-63, 2016.
- ANVISA, B. Descrição dos meios de cultura empregados nos exames microbiológicos. Brasília, 2010. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/microbiologia/mod\\_4\\_2010.pdf](http://www.anvisa.gov.br/microbiologia/mod_4_2010.pdf). Acesso em: jul. 2022.
- ASHRAF, S. et al. Clumping factor A of Staphylococcus aureus interacts with AnnexinA2 on mammary epithelial cells. **Scientific Reports**, v.7, p.1-9,2017.
- BAKEREN, E. et al. Causas evolutivas e consequências da persistência de antibióticos bacterianos. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, n. 9, pág. 479-490, 2020.
- BARBERIO, A.; G. H. et al. In vitro” sensibilidade aos antimicrobianos de Staphylococcus aureus e coliformes isolados de mastite bovina na região de Veneto, Itália, no período de 1996-1999. **Revista Napgama**, São Paulo, v. 5, n. 1, p. 10, 2002.
- BELOTI, V. et al. Leite: obtenção, inspeção e qualidade. Londrina: **Editora Planta**, v.1, p. 50- 54, 2015.
- BERTOLINI, A. B. Prevalência de patógenos relacionados a mastite bovina, identificados por espectrometria de massas, em dípteros capturados no ambiente de ordenha. **Tese de Doutorado - Universidade Estadual Paulista**, p. 64, 2022.
- DO BRASIL, G.. Mastite bovina: controle e prevenção. **Boletim Técnico**, v. 93, p. 1-30, 2018.
- CARDOSO, C. L. et al. Manual de Aulas Práticas. **Universidade Estadual de Maringá**, p. 110- 118, 2015.
- CARVALHO, A. S. S. et al. Estudo e caracterização de microrganismos causadores de mastite bovina no DF e entorno, sua resistência aos antimicrobianos e os fatores de risco para a ocorrência da doença. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 9, p. 47-61 2021.
- CASSOL, D. M. S. et al. Introdução agentes da mastite diagnóstico e tratamento. **A Hora Veterinária**, v. 29, n. 175, p. 1-5, 2010
- CHAVES, B. J. et al. Gentamicin: continuing education activity. **Stat Pearls**, v. 2, p. 85-92, 2021.
- COELHO, S.M.O. et al. Mapeamento do perfil de resistência e detecção do gene meca em Staphylococcus aureus e Staphylococcus intermedius oxacilina-resistentes isolados de espécies humanas e animais. **Ciência Rural**, v.37, p. 195-200, 2009.
- COSER, S. M. et al. Mastite bovina: Controle e Prevenção. Boletim técnico, **Editores Universidade Federal de Lavras**, n. 93, 2012.

- COSTA, G. M. et al. Resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite em bovinos leiteiros de Minas Gerais, Brasil. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 80, n. 03., São Paulo, 2013.
- DAMASCENO, V. S. et al. Análise do perfil microbiológico de agentes causadores de mastite bovina e sua relação com a qualidade do leite em uma fazenda do Sul de Minas Gerais. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 11, p. 409-421, 2020.
- DETILLEUX, J. et al. Mediation analysis to estimate direct and indirect milk losses due to clinical mastitis in dairy cattle. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 4., p. 78-85, 2015.
- DIAS, R. V. C. Principais métodos de diagnóstico e controle da mastite bovina. **Acta Veterinária Brasília**, p.23–27, 2007.
- DO BRASIL, G. Mastite bovina: controle e prevenção. **Boletim Técnico**, v. 93, p. 1-30, 2012. Disponível em: <<http://livraria.editora.ufla.br/upload/boletim-93.pdf>>. Acesso em: 02 jul. 2022.
- DÜRR, J.W. et al. Programa nacional de melhoria da qualidade do leite: uma oportunidade única. **Editora Universidade de Passo Fundo**, p.38-55, 2004.
- ELIAS, A. O. et al. Molecular detection of *Streptococcus agalactiae* in bovine raw milk samples obtained directly from bulk tanks. **Research in Veterinary Science**, n.93, p.34–38, 2012.
- GANDA, E. K. et al. Evaluation of an on-farm culture system (Accumast) for fast identification of milk pathogens associated with clinical mastitis in dairy cows. **PloS One**, v.11, p.5, 2016.
- GAZOLLA, M. et al. Qual " fortalecimento " da agricultura familiar? Uma análise do Pronaf crédito de custeio e investimento no Rio Grande do Sul. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v.51, p.45-68. 2013.
- GONÇALVES, J. L. et al. Identification of *Corynebacterium* spp. isolated from bovine intramammary infections by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **Veterinary microbiology**, v. 173, n. 1-2, p. 147–51, 2014.
- GUIMARÃES, B. P. et al. Desenvolvimento de micropartículas poliméricas contendo neomicina e bacitracina. **Revista Journal of Health**, 2178-3594, v. 1, p. 113-121, 2019.
- HOGVEEN, H. et al. Aspectos econômicos da mastite: novos desenvolvimentos. **Revista veterinária da Nova Zelândia**, v. 59, p. 16-23, 2011.
- IBGE, INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA . **Censo Brasileiro de 2020**. Rio de Janeiro: IBGE, 2020.

KEEFE, G. Update on control of Staphylococcus aureus and Streptococcus agalactiae for management of mastitis. Journal of Veterinary Clinics of North America. **Food Animal Practice**, v. 28, n.2, p. 203-216, 2012.

KUROSAWA, L. S. et al. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de Staphylococcus spp. associados a mastite bovina. **Pubvet**, v. 14, p. 138, 2020.

KULKARNI, A. G. et al. Bovine mastitis: a review. **International Journal of Recent Scientific Research**. v. 4, p. 543-548, 2013.

LAGONI, H. et al. Considerações sobre o tratamento das mastites. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.37, n.11, p. 1261-1269. 2017.

LANGONI, H. et al. Aspectos microbiológicos e de qualidade do leite bovino. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 12, p. 1059-1065, 2011

LOPES, B. C. et al. Etiologia das mastites: pesquisa de microrganismos da classe Mollicutes. **Vet. e Zootec.**, v. 25, n.2, p. 19-21, 2018.

MACIEL, W. G. et al. Epidemiologia molecular e mecanismos de resistência aos carbapenêmicos de Acinetobacter spp. na Ásia e Oceania. **Microb. Resistência a Drogas**, v. 21 p. 424 -443, 2016.

MANZUR, A.G.B. et al. Extract of Mangifera indica L. leaves may reduce biofilms of Staphylococcus spp. in stainless steel and teatcup rubbers. **Food Science and Technology International**, v. 26, n. 1, p. 11-20, 2020.

MESQUITA, A. A. et al. Contagem bacteriana total e contagem de células somáticas como indicadores de perdas de produção de leite. **Pubvet**, v. 12, p. 131, 2018.

MORITZ, F. et al. Resistência aos antimicrobianos em Staphylococcus spp. associados à mastite bovina. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, v. 3, n. 2, p. 132-136, 2016.

MOTTA, R. G. et al. Surto de mastite bovina causada por Arcanobacterium pyogenes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 3, p. 736-740, 2011.

MUNITA, J. M. et al. Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Microbiology Spectrum**, v. 4, 15-19, 2016.

NETO, F. P. et al. Mastite em vacas leiteiras-revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 16, p. 1679–7353, 2011.

NOEL, C. C. et al. Perfil de suscetibilidade antimicrobiana e produção de “slime” de isolados de Staphylococcus spp. provenientes de casos de mastite bovina na região sul-fluminense. **Revista de Saúde**, n.7, p. 22–26, 2016.

OLIVEIRA, G. C. et al. Perfil microbiológico de Streptococcus spp. como agentes causadores de mastites clínicas em diversas regiões do Brasil. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 14, n. 3, p. 74-74, 2016.

- PANTOJA, J. C. F. et al. Dinâmica da contagem de células somáticas e infecções intramamárias durante o período seco. **Medicina Veterinária Preventiva**, v. 90, n. 1-2, p. 43-54, 2009.
- PAIXÃO, M.G. et al. Impacto econômico da implantação das boas práticas agropecuárias relacionadas com a qualidade do leite. **Revista Ceres**, v. 61, n.5, p. 612-621, 2014.
- PEIXOTO, E. C. T. et al. Incidência de mastite bovina em animais homeopatizados. **Revista do Instituto de Lactícios Cândido Tostes**, v.64, n. 367/368, p. 66–71, 2009.
- PERES, N., F. et al. Mastite em vacas leiteiras. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, vol. 9, p. 68-73, 2011.
- PINTO, M. S. et al. Prevalência e etiologia da mastite bovina em propriedades rurais da região Noroeste Paulista. **Brazilian Journal of Development**, v.7, p.184-192, 2021.
- QUADROS, D.G. et al. Maior nível tecnológico e escala de produção propiciam melhor qualidade do leite e menor ocorrência de mastite bovina. **Revista Acadêmica: Ciência Animal**, v. 17, p. 1 -13, 2019.
- RATO, M. G. et al. Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of streptococci from bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, n. 161, p. 286–294, 2013.
- RIBEIRO, M.G. et al. Mastite em animais domésticos. **Doenças Infecciosas em Animais de Produção e de Companhia, Roca**, Rio de Janeiro, v.3, p.1155-1205, 2016.
- ROSA, J. F. et al. Perfil de resistência de *staphylococcus aureus* coletados em ambiente de ordenha frente a antimicrobianos. **Universidade Federal de Pelotas**, p. 1-4, 2019.
- SAINI, V.; M. T., et al. Antimicrobial resistance profiles of common mastitis pathogens on Canadian dairy farms. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 8, p. 4319-4332, 2012.
- SANTOS, M. V. et al. Controle da mastite e qualidade do leite: desafios e soluções. **Pirassununga-SP: Edição dos autores**, p. 301, 2019.
- SALABERRY, S. R. S. et al. Análise microbiológica e perfil de sensibilidade do *Staphylococcus* spp. em mastite subclínica de caprinos leiteiros. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, n. 68, p. 336–344, 2016.
- SCHVARZ, D. W. et al. Mastite Bovina em Rebanhos Leiteiros: Ocorrência e Métodos de Controle e Prevenção. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente, Maringá**, v.5, n.3, p. 453-473, 2012.
- SILVA, L. H. B. et al. Mastite bovina: revisão bibliográfica. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária**, v. 3, n. 2, p. 142-151, 2020.
- THAI, T. et al. Ciprofloxacina. **StatPearls Publishing**, v. 3, p. 45,52, 2021.
- VAN BOECKEL, T. P. et al. Tendências globais da resistência antimicrobiana em animais em países de baixa e média renda. **Ciência Rural**, v. 365, n. 6459, p. 1944, 2019.

VESCO, J. et al. Monitoramento dos agentes causadores de mastite e a susceptibilidade aos antimicrobianos. **Expressa Extensão**, v.22, p.34-50,

WAYNE, P. A. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. **Clinical and laboratory standards Institute (CLSI)**, v. 20, p. 1-5, 2016.

WINCKLER, J. P. P. Prevalência da mastite subclínica em rebanhos brasileiros e o efeito sobre a composição do leite. **Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo**, p. 55-61, 2019.

ZECCONI, A. et al. Staphylococcus aureus virulence factors in invasion from innate immune defenses in human and animal diseases. **Immunology Letters**. v.150, p.12-22, 2013.

ZIMERMANN, K. F. et al. Mastite bovina: agentes etiológicos e susceptibilidade a antimicrobianos. **Campo Digital**, n.12, p. 1-7, 2017.



