



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

AMANDA THAÍS FERREIRA SILVA

Rastreabilidade genética e detecção de resistência antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* isolados de vacas primíparas, ambiente de ordenha e ordenhadores no Estado de Pernambuco, Brasil

RECIFE

2020



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIA ANIMAL

AMANDA THAÍS FERREIRA SILVA

Rastreabilidade genética e detecção de resistência antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* isolados de vacas primíparas, ambiente de ordenha e ordenhadores no Estado de Pernambuco, Brasil

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre em Biociência Animal.

Orientador: Rinaldo Aparecido Mota

Coorientador: Rodolfo de Moraes Peixoto

RECIFE

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- S586r Silva, Amanda Thaís Ferreira
Rastreabilidade genética e detecção de resistência antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* isolados de vacas primíparas, ambiente de ordenha e ordenhadores no Estado de Pernambuco, Brasil / Amanda Thaís Ferreira Silva. – Recife, 2020.
89 f. : il.
- Orientador: RINALDO APARECIDO MOTA.
Coorientador: RODOLFO DE MORAES PEIXOTO.
Inclui referências e anexo(s).
- Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Recife, 2020.
1. *Staphylococcus aureus*. 2. Resistência antimicrobiana. 3. Rastreabilidade genética. 4. Mastite. 5. Primípara. I. MOTA, RINALDO APARECIDO, orient. II. PEIXOTO, RODOLFO DE MORAES, coorient. III. Título

AMANDA THAÍS FERREIRA SILVA

Rastreabilidade genética e detecção de resistência antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* isolados de vacas primíparas, ambiente de ordenha e ordenhadores no Estado de Pernambuco, Brasil

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre em Biociência Animal.

Área de concentração: Biotecnologia na linha de Saúde Única

APROVADA em 20 de fevereiro de 2020.

BANCA EXAMINADORA

Profº Drº Rinaldo Aparecido Mota (Orientador)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Profº Drº Rodolfo de Moraes Peixoto (Membro Titular)
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sertão Pernambucano

Profº Drº André de Souza Santos (Membro Titular)
Centro Universitário Brasileiro

DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação aos meus queridos avós José (in memoriam) e Neuza e às minhas amadas mãe, Giane, e irmã, Andressa.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força, fé e foco para chegar até aqui.

À minha mãe, Giane da Paz, que é o meu exemplo e a quem eu devo toda a minha formação. Obrigada por nunca me deixar faltar fé, carinho, respeito e amor. Agradeço principalmente por todas as suas orações!

À minha irmã, Andressa Silva, que é meu orgulho e a quem tenho muita admiração. Obrigada pelos abraços, risos e sorrisos!

Aos meus avós, José Paulino (*in memoriam*) e Neuza da Paz, que para mim traduzem as palavras amor e força. Agradeço pelos ensinamentos, amor e apoio incondicional.

Ao meu padrasto, Luiz, que sempre confia, torce e acredita em mim e nas minhas ideias.

À minha Ohana (*família*), que nunca me deixa faltar boas vibrações, suporte e encorajamento.

Ao meu amor, Victor Freret, que sempre me impulsiona a ser a melhor versão de mim. Obrigada pelo apoio, carinho e amor. Espero sempre poder compensar com muito amor os momentos de distância e agradecer pela infinita paciência.

Aos meus queridos mestres da graduação e da pós-graduação, que são os responsáveis pela minha formação. Aos mestres, com carinho!

Ao meu querido orientador, Prof. Rinaldo Mota, pela confiança, respeito, amizade, sinceridade e carinho. Obrigada por ser sempre um pai e em vários momentos ter me dado oportunidades para crescer e ser uma profissional cada dia melhor.

Ao meu coorientador, Prof. Rodolfo Peixoto, pela confiança e suporte necessários para realização desse projeto.

A todos os membros do Laboratório de Doenças Infectocontagiosas (LDIC) da UFRPE, sem exceções, pela ajuda, amizade e conversas, tornando o laboratório sempre um ambiente descontraído. Em especial, meus agradecimentos a Giva, que desde a graduação vem acompanhando a minha história e que contribuiu muito para a realização desse projeto, sempre me transmitindo calma e confiança; Breno, que abriu as portas de sua casa em Venturosa e me ajudou imensamente em diversos momentos do desenvolvimento desse projeto. Renatinha, que sempre está pronta pra ouvir as minhas longas conversas e teve paciência para me ajudar e ensinar biologia molecular; e André Santos, que mesmo tendo concluído seu doutorado, não se afastou do laboratório, sempre nos deu suporte e nunca mediu esforços para nos ajudar.

Aos Profs. Andrea Alice, Wilton Junior e Erika Samico pelas contribuições no dia-a-dia e em minha formação. Em especial agradeço a Erikinha, sobretudo pela amizade e respeito.

Ao meu amigo Willder, que sempre com muita disposição me ajudou a realizar várias coletas.

A todos do Laboratório de Avaliação de Produtos de Origem Animal (LAPOA/CCA) da UFPB, que me acolheram e contribuíram para a execução de parte desse projeto - em especial ao Prof Celso Oliveira, à pós-doutoranda Núbia, à doutoranda Priscylla e à técnica Juliana.

À Bárbara Nazly, doutoranda do laboratório Genoma da UFRPE, que me auxiliou muito na etapa final desse projeto.

A todos os produtores que abriram suas portas e porteiras para realização das coletas desse estudo.

Aos ordenhadores, pela participação e boa acolhida em cada coleta.

Aos animais, as tão queridas novilhas, pois sem elas esse estudo não teria sido conduzido.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal (PPGBA) por contribuírem com a minha formação.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), por fomentar a bolsa de estudo, que viabilizou a execução desse projeto.

A todos que não foram mencionados aqui, mas que contribuíram de alguma forma para a realização desse projeto.

EPÍGRAFE

"Trust in the Lord and do good;
dwell in the land and enjoy
safe pasture. Take delight in
the Lord, and he will give you
the desires of your heart."
(Psalm 37:3-4)

RESUMO

Neste estudo, objetivou-se avaliar a rastreabilidade genética e o perfil de resistência aos beta-lactâmicos de cepas de *Staphylococcus (S). aureus* isoladas de mastite em vacas primíparas, ambiente de ordenha e ordenhadores no estado de Pernambuco, Brasil. Foram coletadas 432 amostras de leite, 108 swabs de teto, 41 swabs de utensílios de ordenha e 28 swabs de ordenhadores (14 nasais e 14 de mãos). Foram analisadas 27 cepas de *S. aureus* de amostras de leite, seis cepas de *S. aureus* de amostras de swab de teto, uma cepa de *S. aureus* de swab de utensílios e quatro cepas de *S. aureus* de amostras de ordenhadores (três de swab nasal e uma de swab de mãos). Realizou-se a detecção dos genes de resistência *blaZ*, *mecA* e *mecC* por PCR e para o teste de resistência antimicrobiana utilizou-se o método de concentração inibitória mínima (CIM). O gene *blaZ* foi identificado em 74,07% (20/27) dos isolados das amostras de leite, em 16,6% (1/6) dos isolados de swab de tetos, 100% (1/1) dos isolados de utensílios de ordenha e 100% (4/4) dos isolados de ordenhadores e os genes *mecA* e *mecC* não foram detectados. A técnica de Concentração Inibitória Mínima (CIM) para penicilina e oxacilina foi realizada em todos os isolados de *S. aureus* e constatou-se 73,68% de taxa de resistência à penicilina e 10,51% de resistência à oxacilina. Além disso, realizaram-se as técnicas de tipificação rep-PCR, usando o primer RW3A, e PFGE, usando a endonuclease *SmaI* para investigar a correlação genética entre 18 isolados de *S. aureus* positivos para o gene *blaZ*. A tipagem por rep-PCR foi altamente discriminatória (valor D = 0,9804) e um total de 15 padrões foram detectados. A técnica de PFGE também foi altamente discriminatória (valor D = 0,9667) e um total de 13 padrões foi observado. A partir das duas técnicas foi possível detectar cepas clonais em amostras de leite da mesma propriedade e, apesar da presença de cepas dominantes, percebeu-se uma alta diversidade genética dentre as cepas de *S. aureus* analisadas. Assim, a alta frequência do gene *blaZ* associada aos resultados da CIM evidenciaram a importância da produção de beta-lactamases como mecanismos indutores de resistência nos isolados de *S. aureus* estudados. Além disso, a circulação de *S. aureus* resistentes a beta-lactâmicos indica a importância do conhecimento mais aprofundado acerca da disseminação dessas cepas no ambiente agropecuário. Desse modo, fazem-se necessárias medidas preventivas, tais como: a conscientização dos ordenhadores acerca da importância da higiene pessoal e do ambiente de ordenha, o uso racional de antimicrobianos e a escolha de drogas antimicrobianas apenas após a realização de testes de sensibilidade *in vitro*, visando reduzir a seleção e propagação de cepas de *S. aureus* resistentes.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*. Resistência antimicrobiana. Rastreabilidade genética. Mastite. Primípara.

ABSTRACT

The general objective of this study was to assess the genetic traceability and the beta-lactam resistance profile of *Staphylococcus* (*S.*) *aureus* strains isolated from mastitis in primiparous dairy cows, milking environment and milkers in Pernambuco state, Brazil. A total of 432 milk samples, 108 teat swabs, 41 milking utensil's swabs and 28 milker's swabs (14 nasal swabs and 14 hand swabs) were collected. Twenty-seven *S. aureus* strains from milk samples, six *S. aureus* strains from teat swabs, one *S. aureus* strain from milking utensils and four *S. aureus* strains from milkers (three from nasal swab and one from hand swab) were evaluated. Determination of genotypic resistance of *S. aureus* was achieved by Polymerase Chain Reaction (PCR) for amplification of the *blaZ*, *mecA* and *mecC* genes. Phenotypic resistance of *S. aureus* strains was evaluated by Minimal Inhibitory Concentration (MIC) technique using broth microdilutions of penicillin and oxacillin. The *blaZ* gene was detected in 74.07% (20/27) of the isolates from milk samples, 16.6% (1/6) of the isolates from teat swabs, 100% (1/1) of the isolates from milking utensils and 100% (4/4) of the isolates from milkers and the *mecA* and *mecC* genes were not detected. MIC technique was performed in all *S. aureus* strains and according to its results, penicillin had a 73.68% resistance rate and oxacillin had a 10.51% resistance rate. In addition, repetitive extragenic palindromic polymerase chain reaction (rep-PCR), using RW3A primers, and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), using the endonuclease *SmaI*, were carried out to investigate the genotypic relatedness of 18 *S. aureus* strains (*blaZ*-positive). The rep-PCR typing was highly discriminatory (D value= 0.9804) and a total of 15 patterns were detected. The PFGE method was also highly discriminatory (D value= 0.9667) and a total of 13 patterns were observed. Also, clonally-related strains isolated from milk were identified at the same farm by both typing methods, and despite the presence of dominant strains, the results of this study suggest a high genetic diversity of *S. aureus* strains exist at the dairy farms. Thus, the high frequency of the *blaZ* gene associated with MIC results indicates the significance of beta-lactamase production as induced resistance mechanism in *S. aureus* strains. The circulation of beta-lactam resistant *S. aureus* strains shows the need for deep knowledge to be acquired about the dissemination of these strains in the agricultural environment. Therefore, it becomes necessary to take preventive measures, such as: the awareness of milkers about the importance of personal and milking environmental hygiene, the rational use of antibiotics and the selection of antimicrobial drugs only after conducting *in vitro* susceptibility testing, aiming to reduce the selection and the spread of resistant *S. aureus* strains.

Keywords: *Staphylococcus aureus*. Antimicrobial resistance. Genetic traceability. Mastitis. Primiparous.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	ATP-binding cassette
ADAGRO	Agência de Defesa e Fiscalização Agropecuária de Pernambuco
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ATP	Adenosina trifosfato
BHI	Brain Heart Infusion
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
<i>blaZ</i>	Gene indutor de betalactamase
<i>Bp</i>	Base pairs
CCB	Centro de Ciências Biológicas
CCS	Contagem de células somáticas
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical & Laboratory Standards Institute
CMT	California Mastitis Test
DMV	Departamento de Medicina Veterinária
ECN	Estafilococo coagulase-negativo
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC	Intervalo de confiança
IIM	Infecção intramamária
LABCEN	Laboratório Central
LDIC	Laboratório de Doenças Infectocontagiosas
MATE	Multidrug and toxic compound extrusion
<i>mecA</i>	Gene indutor de PBP2a
<i>mecC</i>	Gene homólogo ao gene <i>mecA</i>
MFS	Major facilitator superfamily
MIC	Minimum inhibitory concentration
MIC ₅₀	Minimum inhibitory concentration for 50% of strains

MIC ₉₀	Minimum inhibitory concentration for 90% of strains
MLST	Multilocus sequence typing
MRSA	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NMC	National Mastitis Council
<i>nuc</i>	Gene nuclease
OXA	Oxacillin
PBP	Penicillin binding protein
PBP2a	Alternative penicillin binding protein
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEN	Penicillin
PFGE	Pulsed-field Gel Electrophoresis
rep-PCR	Repetitive element palindromic PCR
RND	Resistance-nodulation-cell division
<i>SCCmec</i>	Staphylococcal cassette chromosome MEC
SMR	Small multidrug resistance
<i>spa</i>	Staphylococcal protein A
sp.	Espécie
spp.	Espécies
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UFRPE	Universidade Federal Rural de Pernambuco
UPE	Universidade de Pernambuco
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean
USDA	United States Department of Agriculture
WGS	Whole genome sequencing

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 2

Genetic traceability of *Staphylococcus aureus* strains isolated from primiparous dairy cows mastitis, humans and environment in the Northeast region of Brazil

Figure 1: Dendrogram showing the genotypic relatedness of 18 *Staphylococcus aureus* isolated from different sources in five dairy herds in Pernambuco State, Northeastern Brazil, which shows three clusters (A-C) at 80% similarity among the band profiles. Dendrogram was built based on the unweighted pair group method with arithmetic mean clustering algorithm (UPGMA) and genetic similarity using the Jaccard's coefficient (1% tolerance) of the genotypic band patterns generated by repetitive extragenic palindromic polymerase chain reaction (rep-PCR) using the RW3A primer.....72

Figure 2: Dendrogram showing the genotypic relatedness of 16 *Staphylococcus aureus* isolated from different sources in five dairy herds in Pernambuco State, Northeastern Brazil, which shows two clusters (A-B) at 80% similarity among the band profiles. Dendrogram was built based on the unweighted pair group method with arithmetic mean clustering algorithm (UPGMA) and genetic similarity using the Dice's coefficient (5% tolerance) of the genotypic band patterns generated by pulsed-field gel eletrophoresis (PFGE) using the restriction enzyme *SmaI*.....73

LISTA DE TABELAS

Revisão de Literatura

Tabela 1: Publicações brasileiras relacionadas ao tema “mastite por *Staphylococcus aureus* portadores do gene *blaZ*.....32

Tabela 2: Publicações brasileiras relacionadas ao tema “mastite por *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina (MRSA)”.....34

Capítulo 1

Occurrence of β -lactam-resistant *Staphylococcus aureus* in milk from primiparous dairy cows in the northeastern region of Brazil

Table 1: Primer sequences for PCR and their respective sizes of amplicons in base pairs (bp) and references.....56

Table 2: Frequency of beta-lactam resistance genes among *Staphylococcus aureus* strains isolated from primiparous cows' milk from dairy herds in Pernambuco state, Brazil.....57

Table 3: Comparison of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* isolates to a natural beta-lactam (penicillin) and a synthetic one (oxacillin) in MIC technique ($\mu\text{g/mL}$).....58

Capítulo 2

Genetic traceability of *Staphylococcus aureus* strains isolated from primiparous dairy cows mastitis, humans and environment in the Northeast region of Brazil

Table 1: Frequency of *Staphylococcus aureus* in different sample sources taken from five dairy herds in Pernambuco state, Northeastern Brazil.....70

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 Mastite por <i>Staphylococcus aureus</i> em vacas primíparas	19
2.1.1 Aspectos históricos	19
2.1.2 Principais impactos da mastite	20
2.1.3 Aspectos clínico-epidemiológicos	22
2.1.4 Aspectos relacionados ao diagnóstico	24
2.1.5 Tratamento da mastite	25
2.1.6 Estratégias de prevenção e controle	27
2.1.6.1 Estratégias sem uso de antimicrobiano	28
2.1.6.2 Estratégias com uso de antimicrobiano	28
2.2 Principais consequências do uso indiscriminado de antimicrobianos	29
2.3 Resistência de <i>Staphylococcus aureus</i> aos beta-lactâmicos	30
2.3.1 Produção de beta-lactamases	31
2.3.1.1 Gene <i>blaZ</i>	33
2.3.2 Alterações nas proteínas de ligação à penicilina (PBPs)	33
2.3.2.1 Genes <i>mecA</i> e <i>mecC</i>	34
2.3.3 Sistema de Efluxo	35
2.4 Rastreabilidade genética	36
2.5 Detecção de resistência a beta-lactâmicos	37
3 OBJETIVOS	39
3.1 Geral	39
3.2 Específicos	39
4 REFERÊNCIAS	40
CAPÍTULO 1	
Ocorrência de β -lactam-resistente <i>Staphylococcus aureus</i> em leite de vacas primíparas na região nordeste do Brasil	52

CAPÍTULO 2

_____ Genetic traceability of <i>Staphylococcus aureus</i> strains isolated from primiparous dairy cows mastitis, humans and environment in the Northeast region of Brazil.....	67
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	77
ANEXOS	79
ANEXO A – Parecer de aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRPE ..	80
ANEXO B – Parecer de aprovação No Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da UFPE.....	81
ANEXO C – Comprovante de publicação do manuscrito intitulado “Occurrence of β -lactam-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> in milk from primiparous dairy cows in the northeastern region of Brazil”	82
ANEXO D – Normas de submissão de manuscrito no periódico Tropical Animal Health and Production	83
ANEXO E – Comprovante de submissão do manuscrito intitulado “Genetic traceability of <i>Staphylococcus aureus</i> strains isolated from primiparous dairy cows mastitis, humans and environment in the Northeast region of Brazil”	85
ANEXO F – Normas de submissão de manuscrito no periódico Journal of Dairy Research.	86
APÊNDICE	88
APÊNDICE A – Publicação da Cartilha “Mastite: Perguntas e Respostas”	89

1 INTRODUÇÃO

O setor lácteo brasileiro tem apresentado um crescimento contínuo nos últimos anos, estando em constante expansão e tecnificação. A produção média de leite no Brasil foi de 1.695 litros/vaca/ano em 2017 (IBGE, 2018). De acordo com o Departamento de Agricultura dos EUA (USDA), o país foi o sexto maior produtor de leite do mundo em 2018, com uma média de produção de 35 bilhões de litros (IBGE, 2018). Concomitantemente ao aumento da produtividade de leite, surgem os distúrbios relacionados à glândula mamária, especificamente as afecções que podem gerar grandes prejuízos e interferir na produção de leite.

Heinrichs *et al.* (2017) consideram que as vacas de primeiro parto representam o futuro da pecuária leiteira e o manejo dessas fêmeas apresenta alto custo no sistema de produção. Dessa forma, é fundamental a disponibilidade de vacas primíparas com úbere saudável e com elevada capacidade leiteira, visando posteriormente a alta rentabilidade e eficiência da produção de leite desses animais. De acordo com Langoni *et al.* (2017), a mastite é umas das principais enfermidades que afeta a produtividade de vacas primíparas, resultando em perdas econômicas significativas para os produtores e para a indústria de produtos lácteos, por reduzir a quantidade e a qualidade do leite.

Segundo Shearer e Harmon (1993), acreditava-se que as vacas primíparas estariam livres de infecções intramamárias (IIMs) no primeiro parto por ainda não experimentarem a exigência de várias ordenhas diárias, por não terem sido tão expostas ao uso de equipamentos de ordenha e por terem a glândula mamária ainda imatura e menos suscetível ao contato físico com o ambiente, ou seja, menos expostas a patógenos. No entanto, a mastite em primíparas não é incomum e constitui uma ameaça à saúde do úbere na primeira e nas lactações subsequentes.

Desse modo, é muito importante que a sanidade da glândula mamária dessas fêmeas não seja negligenciada, pois a IIM em vacas primíparas pode persistir por longos períodos de tempo, aumentando a contagem de células somáticas (CCS), prejudicando o desenvolvimento da glândula mamária e afetando a produção de leite após o parto (ARCHER *et al.*, 2013).

De acordo com Myllys e Rautala (1995), os microrganismos mais importantes causadores de mastite em primíparas pertencem ao gênero *Staphylococcus* e, em geral, estafilococos coagulase-negativos (ECN) e *Staphylococcus aureus* têm sido

os patógenos mais isolados nesse tipo de infecção (HOGEVEEN; HUIJPS; LAM, 2011; LINDER *et al.*, 2013).

Staphylococcus aureus tem sido associado como a causa mais frequente de mastite contagiosa em todo o mundo (TONG *et al.*, 2015). Conforme Petersson-Wolfe, Mullarky e Jones (2010), as vacas primíparas funcionam como reservatório para *S. aureus* e são fonte para novas infecções intramamárias, representando quase um terço dos novos casos de mastite por *S. aureus* em rebanhos leiteiros (OLIVER *et al.*, 2005).

Estudos também demonstram as implicações do *S. aureus* na Saúde Pública, pois estes microrganismos podem ser excretados no leite, contaminando o produto. Além disso, existem cepas resistentes a antimicrobianos e com a capacidade de transferência de genes de resistência aos seres humanos, a exemplo de antibióticos beta-lactâmicos, dificultando o tratamento de infecções (ZECCONI; HAHN, 2000; KLIMEŠOVÁ *et al.*, 2017).

Os beta-lactâmicos são uma ampla classe de antimicrobianos, incluindo penicilina e seus derivados que apresentam em sua estrutura química um anel beta-lactâmico. O uso dessas drogas é bastante difundido na Medicina Veterinária, devido à eficácia do medicamento e sua baixa toxicidade. No entanto, a utilização indiscriminada resultou no surgimento da resistência bacteriana (LYONT; SKURRAY, 1987).

A resistência de *S. aureus* aos antibióticos beta-lactâmicos pode ocorrer de três principais formas: inativação do antibiótico por hidrólise enzimática (beta-lactamases); modificação do alvo do antibiótico [proteínas de ligação à penicilina (PBPs)]; diminuição nas concentrações intracelulares do antibiótico como resultado da atuação do sistema de efluxo. Estudos indicam que a análise de genotipagem de isolados de *S. aureus* resistentes é uma importante ferramenta epidemiológica, contribuindo para o entendimento da disseminação do patógeno nos rebanhos (JUHÁSZ-KASZANYITZKY *et al.*, 2007; ANDERSON *et al.*, 2012; LIM *et al.*, 2013).

Considerando que a mastite em vacas primíparas por *S. aureus* está diretamente relacionada à manutenção do patógeno nos rebanhos, bem como os impactos do microrganismo na Saúde Animal e Humana, é fundamental rastrear sua origem e analisar a correlação genética entre os isolados da bactéria, buscando instituir medidas de prevenção e controle do patógeno nas propriedades leiteiras.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Mastite por *Staphylococcus aureus* em vacas primíparas

2.1.1 Aspectos históricos

Na década de 1900 surgiram as primeiras publicações sobre a mastite bovina, quando microrganismos foram isolados e identificados no leite de vacas, mesmo sem apresentarem sinais clínicos evidentes (RUEGG, 2017). Em 1933, Minett, Stableforth e Edwards afirmaram que as vacas no primeiro parto estariam livres de infecção e que a incidência da doença aumentaria com o passar da idade, devido à maior exposição dos animais aos patógenos. Entretanto, em 1935, Stableforth, Edwards e Minett relataram pela primeira vez a mastite em vacas primíparas.

Na década de 40, Palmer, Kakavas e Hay (1941) investigaram a mastite clínica em primíparas, entre um ano de idade até próximo ao parto, em três rebanhos leiteiros. Nos rebanhos estudados, *Staphylococcus aureus* foi o patógeno predominantemente isolado das secreções mamárias de vacas de primeiro parto e a incidência de mastite clínica foi esporádica. Schalm (1942) foi o primeiro a descrever a possibilidade de transferência de *Streptococcus agalactiae* para o úbere de vacas primíparas por meio da mamada entre novilhas ainda muito jovens. Assim, nesse período, constatou-se que seria possível que vacas de primeira lactação já apresentassem patógenos dentro da glândula mamária, mesmo antes do primeiro parto.

Apenas a partir dos anos 70, as infecções intramamárias em vacas primíparas passaram a ser consideradas como um problema significativo para os rebanhos leiteiros (MUNCH-PETERSEN, 1970; OLIVER; MITCHELL, 1983; OLIVER, 1987). Ao longo do tempo, percebeu-se que as primíparas apresentavam risco de ter infecções ainda muito jovens, bem antes da primeira lactação (BODDIE *et al.*, 1987; TRINIDAD; NICKERSON; ALLEY, 1990; HALLBERG *et al.*, 1995). Em 1995, Nickerson, Owens e Boddie demonstraram o aparecimento de mastite em vacas de nove meses de idade e descreveram a possibilidade de infecção em até 97% das vacas jovens e em 75% dos quartos mamários.

No Brasil, os estudos sobre a ocorrência de mastite em vacas primíparas são escassos. Apenas na década de 90, as infecções intramamárias em vacas de primeiro parto passaram a ser evidenciadas devido à alta prevalência da

enfermidade dentro dos rebanhos leiteiros, ocasionando queda na rentabilidade e na eficiência da produção de leite nas vacas ao atingir a idade adulta (LAFFRANCHI *et al.*, 2001). Costa *et al.* (1996, 1999) e Pardo *et al.* (1998) relataram a ocorrência de mastite em vacas primíparas nos Estados de São Paulo e Paraná, respectivamente, e descreveram infecções nas duas primeiras semanas pós-parto com predominância de *Staphylococcus* spp., principalmente de estafilococos coagulase-negativos (ECN), possivelmente devido à presença dos mesmos na microbiota da pele e mucosa (TRINIDAD; NICKERSON; ALLEY, 1990).

Estudos recentes reforçaram a importância da realização de pesquisas no Brasil que identifiquem a situação da distribuição da doença em animais jovens, assim como sua patogênese e epidemiologia, por permanecerem em grande parte desconhecidas (CASTELANI *et al.*, 2013, 2015; PILON *et al.*, 2016). Além disso, estudos de fatores de risco para patógenos específicos são fundamentais para aperfeiçoar os programas de prevenção de mastite em primíparas (SANTMAN-BERENDS *et al.*, 2012; YANG *et al.*, 2014).

2.1.2 Principais impactos da mastite

A mastite é a principal doença que afeta os rebanhos leiteiros no mundo e proporciona as maiores perdas econômicas na exploração de bovinos leiteiros (CASTELANI *et al.*, 2018). É uma enfermidade particularmente preocupante em países em desenvolvimento, como o Brasil, onde o setor leiteiro assume um significativo papel na ordem econômica e social do agronegócio no país. Vale salientar que a saúde do úbere não é importante apenas para o proprietário, mas também para a cadeia produtiva do leite como um todo, devido ao crescente interesse dos consumidores acerca do bem estar animal e da cadeia agroindustrial do leite (HOGEVEEN; HUIJPS; LAM, 2011).

Piepers *et al.* (2009) consideram que ainda é um desafio quantificar a influência de cada um dos fatores envolvidos na mastite de vacas primíparas (por exemplo, patógeno causador, duração da infecção antes do parto, persistência ou cura da infecção no início da lactação, imunidade do hospedeiro) sobre o desempenho futuro desses animais. Além disso, apesar das infecções intramamárias em primíparas serem relatadas como um problema em potencial, relativamente poucos estudos quantificam o efeito da mastite nesse grupo de

animais sobre a saúde do úbere e a produção de leite (ROBERSON *et al.*, 1998; PIEPERS *et al.*, 2009).

Estudos relatam que as infecções intramamárias em primíparas podem persistir por longos períodos de tempo, prejudicam o desenvolvimento da glândula mamária, afetando a produção de leite após o parto, e tendo como maior consequência o aumento da contagem de células somáticas (CCS) (ROBERSON *et al.*, 1998; DE VLIEGHER *et al.*, 2005; PIEPERS *et al.*, 2009). A elevação da CCS resulta na redução da qualidade do leite e influencia na composição e no tempo de vida de prateleira do produto (WAAGE; SVILAND; ØDEGAARD, 1998). Além disso, pode aumentar o risco de mastite subclínica e clínica na lactação, bem como o risco de descarte prematuro dos animais (HUIJPS *et al.*, 2009).

Segundo Hand, Godkin e Kelton (2012), estima-se que uma vaca de primeira lactação com uma média de CCS de 500 mil células/ml tenha perda de produção de aproximadamente um litro de leite por dia em comparação com as outras vacas do rebanho sob as mesmas condições de alimentação, instalação e genética. Quando a CCS chega a um milhão, a perda chega a quase dois litros de leite por dia. No Brasil, em função da alta prevalência de mastite nos rebanhos, pode-se deduzir que ocorra uma perda de produção entre 12% e 15%, o que significa um total de 2,8 bilhões de litros/ano em relação à produção anual de 21 bilhões de litros (LOPES; LACERDA; RONDA, 2013).

No geral, o impacto causado pela mastite na pecuária leiteira deve ser diferenciado para cada perfil de bovinocultor e, por si só, depende das condições epidemiológicas, administrativas e econômicas locais e regionais (SEEGERS; FOURICHON; BEAUDEAU, 2003). Para avaliar o impacto econômico direto da mastite, os custos e as perdas devem estar associados. Guimarães *et al.* (2017) realizaram uma estimativa do impacto econômico da mastite em um rebanho leiteiro sob condições tropicais e concluíram que o descarte dos animais e a redução na produção de leite tiveram maior influência nos custos.

Huijps *et al.* (2009) utilizaram modelagem estocástica, levando em conta a variação e a incerteza da mastite em primíparas, e concluíram que o custo estimado com a doença seria de US\$ 35/primípara em uma propriedade leiteira. Esses custos foram calculados considerando as perdas na produção de leite, o aumento do risco de mastite clínica e subclínica durante a lactação, aumento da mão de obra, medicamentos e a elevada percentagem de descarte de animais.

Nesse cenário, a alternativa para redução do impacto da mastite seria por meio da adoção de medidas de gestão com a maior eficácia, utilizando-se estratégias adequadas de diagnóstico, tratamento, prevenção e controle da enfermidade (DE VLIEGHER *et al.*, 2012).

2.1.3 Aspectos clínico-epidemiológicos

A mastite é uma doença complexa e que pode ser considerada um exemplo clássico da interação entre microrganismo, ambiente e hospedeiro (COSER; LOPES; COSTA, 2012). Segundo Kibebew (2017), existem três modos distintos de infecção, sendo eles: contagioso, oportunista/ambiental, além da infecção por meio de vetores. No primeiro, a disseminação de microrganismos ocorre de animal para animal; no segundo, a interação entre microrganismos oportunistas, fatores inerentes ao hospedeiro e fatores ambientais colocam o animal em risco; e no último, sua etiologia se dá a partir da exposição dos animais a vetores carregando o(s) patógeno(s), a exemplo da mosca-dos-chifres (*Haematobia irritans*).

Estudos prévios da epidemiologia do *Staphylococcus aureus* em vacas primíparas identificaram que os principais reservatórios do patógeno são úbere infectado, canal do teto e lesões do teto, sendo também encontradas na pele do teto, na mufla e nas narinas (ANDERSON *et al.*, 2012; YANG *et al.*, 2014; TONG *et al.*, 2015). *Staphylococcus* spp. não sobrevivem na pele sadia, mas colonizam rapidamente áreas lesadas da pele e do teto, havendo então a multiplicação dos microrganismos na região e possibilitando a colonização do canal do teto e subsequente infecção do úbere (PETERSSON-WOLFE; MULLARKY; JONES, 2010).

A disseminação do *S. aureus* para os quartos mamários sadios pode ocorrer por meio dos utensílios de ordenha, mãos de ordenhadores, panos, água, moscas (WEGENER; NIELSEN; ROSDAHL, 1993; OWENS *et al.*, 1998; OLIVER *et al.*, 2005; TONG *et al.*, 2015). Desse modo, evidencia-se que a deficiência de higiene dos animais, dos equipamentos de ordenha, das mãos dos ordenhadores, bem como a contaminação ambiental e da pele do teto permitem a proliferação do patógeno (LANGONI, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Apesar de não ser totalmente elucidado o mecanismo exato de como vacas primíparas ainda não lactantes desenvolvem infecções por *S. aureus*, um estudo demonstrou que os canais do teto podem ser colonizados em idades muito jovens

(NICKERSON, 2009). Além disso, as vacas de primeiro parto infectadas durante a gestação podem carrear o patógeno e servir como importantes reservatórios de *S. aureus*, transmitindo o patógeno para os animais sadios do rebanho (PETERSSON-WOLFE; MULLARKY; JONES, 2010).

Ainda existem algumas controvérsias relacionadas às formas de transmissão da mastite causada por *S. aureus*, contudo, sabe-se que, comumente, ocorre por contágio. Estudos relatam também o papel da mosca-dos-chifres no desenvolvimento de lesões no teto de primíparas, que podem evoluir para uma mastite crônica por *S. aureus*, e esses vetores podem disseminar o patógeno entre as primíparas, principalmente quando os animais estão soltos a pasto (OLIVER *et al.*, 2005; OWENS *et al.*, 1998; RYMAN *et al.*, 2013).

Quanto à apresentação da doença, existem duas formas, sendo elas: mastite clínica, quando as alterações são visíveis macroscopicamente e mastite subclínica, quando as alterações não são visíveis a olho nu (RUEGG, 2017). A mastite clínica em vacas primíparas é rara durante o período pré-parto, sendo mais evidente no início da lactação (BARKEMA *et al.*, 1998; NYMAN *et al.*, 2007). Por outro lado, alguns estudos apontam que as infecções em primíparas causadas por *S. aureus* são principalmente subclínicas e podem ser diagnosticadas comumente no pré-parto e nos primeiros dias de lactação (FOX, 2009; JÁNOSI; BALTAY, 2004; MALINOWSKI *et al.*, 2006). Segundo Fox (2009), a prevalência da infecção do quarto mamário varia entre 28,9 - 74,6% no pré-parto e 12,3 - 45,5% no pós-parto imediato.

De Vlieghe *et al.* (2012) sugeriram que as vacas de primeiro parto podem ser excelentes sentinelas para estimar a dinâmica de prevalência e incidência de *S. aureus* em rebanhos leiteiros, pois elas são menos susceptíveis a ter infecções crônicas do que vacas múltíparas. Nesse contexto, a prevalência de mastite em vacas primíparas causada por *S. aureus* está relacionada principalmente ao tamanho do rebanho, mamada entre bezerras, remoção de tetos supranumerários, idade ao primeiro parto, acomodação das vacas primíparas próximas ao parto, número de bezerros, feridas no úbere e no teto, higiene do úbere no pós-parto, produção de leite e administração de ocitocina na primeira ordenha (DE VLIEGHER; ZADOKS; BARKEMA, 2009). A incidência está relacionada aos fatores associados à contagem de células somáticas do leite, em especial: higiene, estação do ano,

desinfecção dos tetos pré e pós-ordenha, presença de moscas, alimentação e sistema de criação (OLDE RIEKERINK; BARKEMA; STRYHN, 2007).

Os principais fatores de risco para mastite clínica em vacas primíparas descritos na literatura são: dieta, fatores inerentes à glândula mamária, como edema e vazamento de leite, e fatores associados ao manejo (MYLLYS; RAUTALA, 1995; PIEPERS *et al.*, 2011; WAAGE *et al.*, 2001). Por outro lado, a estação do ano, o tamanho do rebanho, a fase gestacional e o contato entre vacas primíparas e multíparas são fatores essenciais para ocorrência de mastite subclínica (BAŞTAN *et al.*, 2015; FOX, 2009). No entanto, é desconhecido até que ponto esses fatores de risco podem explicar o surgimento de mastite em vacas primíparas no Brasil (COSTA *et al.*, 1996; PARDO *et al.*, 1998; CASTELANI *et al.*, 2013).

2.1.4 Aspectos relacionados ao diagnóstico

A detecção e o diagnóstico da mastite são procedimentos complementares e que permitem monitorar a saúde do úbere, bem como estabelecer metas para o controle e monitoramento da doença nos rebanhos. Quando na fase inicial da enfermidade, o diagnóstico ameniza os possíveis danos à glândula mamária, aumenta a eficácia do tratamento e ajuda a evitar a disseminação do microrganismo causador no rebanho (LAM *et al.*, 2009).

A mastite em vacas de primeiro parto é raramente perceptível antes do parto e poucas propriedades leiteiras procuram ativamente diagnosticar a doença nesse período. Uma vez que esses animais representam o futuro do rebanho, é fundamental realizar um acompanhamento clínico dessas fêmeas durante toda a gestação e no pós-parto (NICKERSON, 2009). Inicialmente, deve-se realizar a inspeção da glândula mamária, pois glândulas inchadas e endurecidas são fatores relevantes para a doença. Posteriormente, deve-se monitorar as características da secreção mamária, visto que primíparas com mastite apresentam uma secreção diferenciada (fina, aquosa, com coágulos e flóculos) (CERQUEIRA *et al.*, 2009).

A diferenciação clínica das infecções intramamárias em vacas primíparas é complexa devido à variedade de agentes causadores e de sinais clínicos que podem ser provocados por mais de um patógeno. Assim, é recomendável a coleta de amostras de leite para a identificação do patógeno daqueles animais com diagnóstico clínico positivo. Caso as coletas por quarto mamário sejam realizadas antes do parto, é extremamente importante que as amostras sejam obtidas usando

condições higiênicas rigorosas, para que as infecções não sejam introduzidas inadvertidamente durante a amostragem (RUEGG, 2017).

No Brasil, dentre os patógenos mais prevalentes associados à mastite em primíparas estão os estafilococos coagulase-negativos e os estafilococos coagulase-positivos, principalmente *S. aureus* (PARDO *et al.*, 1998; LAFFRANCHI *et al.*, 2001). O método padrão de identificação da mastite por *S. aureus* requer a coleta asséptica de amostras de leite para cultura bacteriológica e a *expertise* do laboratório microbiológico. Esse tipo de procedimento pode apresentar alguns problemas como: custos de coleta, manuseio e processamento de amostras e o tempo necessário para o crescimento de patógenos no laboratório (EL-RASHIDY; FOX; GAY, 1992). A cultura de leite do tanque é uma estratégia fácil, econômica e útil para o monitoramento do *status* da enfermidade dentro de uma propriedade, contudo, isso não substitui a cultura de amostras de leite individual de primíparas (DINGWELL *et al.*, 2003).

Recomenda-se a realização da Contagem de Células Somáticas (CCS) e/ou do *California Mastitis Test* (CMT) em todas as vacas de primeiro parto do rebanho, uma vez que é possível identificar quais vacas e quartos mamários apresentam mastite subclínica (FOX, 2009).

O resultado da CCS pode ser usado como um indicador de inflamação da glândula mamária, permitindo monitorar a sanidade do úbere, e uma alta CCS se correlaciona fortemente com a presença de patógeno(s) no(s) quarto(s) mamário(s). Por outro lado, o CMT possibilita determinar os quartos mamários infectados, para que a cultura bacteriológica seja realizada especificamente dos quartos positivos. Ou seja, a realização dessas técnicas no rebanho constitui um ponto de partida para identificar as vacas primíparas positivas e elaborar uma estratégia de tratamento e controle adequada (RUEGG, 2017).

2.1.5 Tratamento da mastite

A mastite pode acometer vacas primíparas desde o momento que começam a produzir secreção mamária, por volta dos seis a oito meses de idade (NICKERSON, 2009), e as IIMs podem persistir de 12 a 18 meses antes do parto, tempo suficiente para que a infecção se estabeleça e cause danos permanentes ao tecido mamário. Assim, constata-se a necessidade de um programa eficiente de tratamento de IIMs

em primíparas, bem como de um bom programa de monitoramento da sanidade do úbere desse grupo de animais nos rebanhos leiteiros (NICKERSON, 2009).

O tratamento de primíparas antes do parto pode parecer uma medida drástica, no entanto, Oliver *et al.*, (1992) e Nickerson (2009) relataram que as infecções no pré-parto têm um impacto negativo tanto na saúde do animal quando no desempenho produtivo do rebanho, ocasionando perdas econômicas significativas para o produtor.

Alguns dos tratamentos utilizados no pré-parto são: vacinas, selantes de teto sem antimicrobianos, antimicrobianos de curto prazo (2 a 3 dias) e longo prazo (5 a 8 dias) e combinações desses tratamentos. Conforme De Vliegher *et al.* (2012), o tratamento com antimicrobiano no pré-parto só deve ser implementado como uma medida de curto prazo (2 a 3 dias), apenas para auxiliar no controle de um problema significativo de mastite em primíparas.

Nickerson (2009) alcançou uma elevada taxa de cura de mastite por *S. aureus* em vacas primíparas realizando as seguintes etapas:

- I. Exame do úbere das primíparas cerca de dois meses antes da data prevista para o parto, buscando avaliar se está endurecido e também verificar a secreção mamária;
- II. Não intervir quando a secreção mamária for espessa;
- III. Realização de cultura bacteriológica para detectar o *S. aureus* quando a secreção mamária for fina, aquosa, com coágulos e grumos;
- IV. Tratamento com antibiótico para vaca seca (terapia de secagem) dos quartos mamários de todos os animais positivos para *S. aureus*.

Staphylococcus aureus é suscetível a diversos antibióticos *in vitro* (BARKEMA; SCHUKKEN; ZADOKS, 2006). No entanto, existem muitas controvérsias quanto à taxa de cura *in vivo* (OLIVER *et al.*, 2003). Vários fatores, incluindo a capacidade de sobreviver dentro de neutrófilos (MULLARKY *et al.*, 2001) e de invadir células epiteliais mamárias (LAMMERS *et al.*, 2000) contribuem para uma resposta insatisfatória ao tratamento de infecções por *S. aureus*. Assim, na tentativa de melhorar a resposta ao tratamento, várias classes de compostos antimicrobianos, combinações de drogas e de vias de aplicação e duração de tratamento têm sido investigadas (GILLESPIE *et al.*, 2002).

No Brasil, estudos apontam que o patógeno apresenta um aumento progressivo no padrão de resistência aos antimicrobianos (ACOSTA *et al.*, 2016;

GUIMARÃES *et al.*, 2017; MEDEIROS *et al.*, 2009), o que pode estar relacionado à capacidade desses microrganismos adquirirem genes de resistência (SCHMIDT; KOCK; EHLERS, 2015). Nesse contexto, é importante ressaltar a necessidade do monitoramento da resistência em *S. aureus*, pois o uso inadequado e indiscriminado de antimicrobianos influencia diretamente no aumento das taxas de resistência. Assim, essa medida reduziria falhas terapêuticas e os riscos de desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos (COSTA *et al.*, 2013).

2.1.6 Estratégias de prevenção e controle

A redução da incidência da mastite em vacas primíparas depende da criação de estratégias integradas de prevenção e controle da enfermidade, sendo necessários: o estabelecimento de metas, a avaliação dos sistemas atuais de criação, a realização de intervenções apropriadas e específicas e o monitoramento dos resultados (MCDOUGALL *et al.*, 2009). Além disso, essas estratégias constituem os principais componentes do manejo sanitário de bovinos leiteiros e devem ser individualizadas para cada propriedade (NMC, 2011).

Segundo o Conselho Nacional de Mastite dos EUA (NMC, 2011), não existe um programa de prevenção e controle da mastite específico para vacas primíparas. Entretanto, De Vlieghe *et al.* (2012) consideram que existem intervenções específicas que deveriam ser implementadas em qualquer propriedade, sendo denominadas de “Programa de 10-pontos para Prevenir e Controlar a Mastite em Vacas Primíparas”:

- I. Melhorar o manejo geral da saúde do úbere para diminuir a chance de infecção das primíparas pelos patógenos do úbere de vacas mais velhas;
- II. Controlar a mamada cruzada em vacas primíparas e bezerras;
- III. Implementar um sistema de controle de moscas efetivo e eficiente;
- IV. Manter as vacas primíparas em um ambiente limpo e higiênico, separado de vacas multíparas;
- V. Evitar qualquer deficiência nutricional;
- VI. Minimizar o risco de balanço energético negativo antes e depois do parto através de sistemas de alimentação de transição apropriados;
- VII. Reduzir a incidência de edema do úbere por meio do gerenciamento otimizado do periparto;

- VIII. Minimizar o estresse próximo ao parto e minimizar a incidência de distocia e doenças no periparto;
- IX. Considerar o uso de selantes internos do teto, onde há um alto risco de mastite ambiental no período periparto;
- X. Usar antibiótico pré-parto.

Assim, o controle e a prevenção de mastite por *S. aureus* em vacas primíparas podem se basear em estratégias sem e/ou com o uso de antimicrobianos (OLIVER *et al.*, 2005).

2.1.6.1 Estratégias sem uso de antimicrobiano

O controle e a prevenção da mastite em primíparas têm sido fundamentados em estratégias sem o uso de antimicrobiano, buscando identificar os fatores de risco específicos para o agente causador, devido à variação na epidemiologia e na patogênese da enfermidade (OLIVER *et al.*, 2005).

Os procedimentos considerados fundamentais para prevenção e controle de mastite por *S. aureus* incluem a separação das bezerras para evitar amamentação cruzada entre crias jovens, otimização da higiene e da alimentação, controle de moscas, segregação de vacas primíparas e multíparas e melhoria no conforto das fêmeas (DE VLIEGHER *et al.*, 2012).

2.1.6.2 Estratégias com uso de antimicrobiano

O uso de antimicrobianos em primíparas deve ser feito em um momento em que os animais não estão em lactação e pode exigir instalações de contenção adequadas para realização de um tratamento seguro. Além disso, o antimicrobiano deverá ser empregado sob a supervisão de um médico veterinário. O início do tratamento deve ocorrer após a quantificação do problema no rebanho e a identificação do patógeno, bem como a escolha dos antibióticos deve se basear no teste de sensibilidade aos antimicrobianos e deve ser realizado o teste de resíduos antimicrobianos antes de direcionar o leite para consumo (NICKERSON, 2009).

O tratamento pré-parto tem apresentado excelente taxa de cura contra mastite em vacas primíparas por *S. aureus*, no entanto, pode resultar em um crescente nível de resistência antimicrobiana, bem como na contaminação do leite por resíduo de antibiótico quando o intervalo entre a terapia e o parto é muito curto

(OLIVER *et al.*, 1992). Desse modo, é importante descontinuar o tratamento assim que novas estratégias se tornarem eficazes no controle da enfermidade na propriedade.

2.2 Principais consequências do uso indiscriminado de antimicrobianos

O uso indiscriminado de antimicrobianos para tratar infecções intramamárias tem resultado em altos teores de resíduos dessas drogas no leite, representando risco à saúde do consumidor, bem como na identificação de bactérias resistentes a esses fármacos (SALAZAR, 2012).

A presença de resíduos de antibióticos no leite pode ser resultado de vários fatores, entre os quais: o desrespeito ao período de carência do antibiótico, a utilização inadequada do medicamento e o tratamento pré-parto (FAGUNDES; GARINO JR; COSTA, 2004). Os resíduos de antibióticos no leite de vacas de primeira lactação representam um problema significativo para a indústria do leite, uma vez que a antibioticoterapia em primíparas geralmente é realizada cerca de 2 a 4 semanas antes do parto (NICKERSON, 2009) e, conseqüentemente, aquelas que parem antes do período esperado representam um risco potencial para eliminação de resíduos no leite.

Além disso, esses resíduos podem causar alergias ao consumidor, aumentar a resistência bacteriana e interferir negativamente no processo industrial do leite e na fabricação de derivados (MENDES *et al.*, 2008). Assim, deve-se ter cuidado na recomendação do uso de infusão intramamária de antibióticos em primíparas e incluir, no manejo do rebanho, medidas que possam garantir que o leite esteja livre de resíduos de drogas prejudiciais antes da comercialização.

Deve-se ressaltar que a vigilância do uso de antibióticos é fundamental para gerenciar a resistência antimicrobiana dentro dos rebanhos leiteiros e a identificação do patógeno causador da mastite possibilita a seleção da terapia apropriada para atingir a cura bacteriológica (BARKEMA; SCHUKKEN; ZADOKS, 2006).

Tratando-se das bactérias do gênero *Staphylococcus*, que comumente causam IIMs em primíparas, uma razão perceptível para a dificuldade na resposta ao tratamento é a existência de diversas cepas de *Staphylococcus* resistentes a antimicrobianos (BARKEMA; SCHUKKEN; ZADOKS, 2006). Nesse contexto, a escolha do tratamento deve se basear no conhecimento da sensibilidade antimicrobiana da cepa causadora da enfermidade.

Microrganismos do gênero *Staphylococcus* adaptam-se facilmente à pressão de seleção e podem sofrer mutações nos seus genes ou adquirir genes de outras espécies de bactérias (BLAIR *et al.*, 2015). Os mecanismos de resistência são variados, podendo ser divididos, quanto à origem, em: intrínsecos/naturais ou adquiridos. No primeiro, a resistência é expressa naturalmente por todos os indivíduos de um gênero ou espécie bacteriana. Enquanto a forma adquirida pode ser originada a partir de mutação em genes reguladores ou estruturais da bactéria, ou por meio de aquisição dos genes de resistência de outras bactérias (conjugação: plasmídeo, transposon), via bacteriófago (transdução) ou via ambiente (transformação) (YELIN; KISHONY, 2018).

S. aureus desenvolve resistência aos antimicrobianos por diferentes mecanismos, incluindo a limitação da absorção do fármaco, modificação do alvo do fármaco, inativação enzimática do fármaco e efluxo ativo do fármaco. Dependendo do antimicrobiano utilizado, as bactérias podem usar um ou vários desses mecanismos de resistência. Em particular, a localização de genes de resistência em elementos genéticos transferíveis, como plasmídeos e transposons, facilita a transferência horizontal de resistência entre bactérias (YILMAZ; ASLANTAŞ, 2017).

Desse modo, percebe-se que *S. aureus* apresenta alto potencial de resistência antimicrobiana, sendo relatado grande número de cepas portadoras de fatores genéticos indutores de resistência, em especial para a classe dos beta-lactâmicos, como os genes *mecA*, *mecC* (gene homólogo do *mecA*) e o gene *blaZ* (COSTA *et al.*, 2013; SCHMIDT; KOCK; EHLERS, 2015; MARTINI *et al.*, 2017).

2.3 Resistência de *Staphylococcus aureus* aos beta-lactâmicos

Antibióticos beta-lactâmicos têm como elemento comum em suas estruturas moleculares um anel de quatro átomos conhecido como anel beta-lactâmico (ABRAHAM; CHAIN, 1940). Essa classe de antimicrobianos é a mais utilizada para tratamento de doenças em rebanhos leiteiros, mas seu uso prolongado e repetido pode levar à resistência a esses medicamentos (PITKÄLÄ *et al.*, 2007).

A penicilina é um antibiótico do grupo dos beta-lactâmicos e sua descoberta ocorreu em 1928, de modo acidental, e foi atribuída ao médico e bacteriologista, Alexander Fleming (MORETTI, 2007). No entanto, apenas em 1938, a penicilina foi verdadeiramente isolada pelos cientistas Ernst Boris Chain e Howard Walter Florey, a partir do fungo *Penicillium* (PITKÄLÄ *et al.*, 2007). Desse modo, desde 1941, o

fármaco está disponível no mercado, sendo o primeiro antibiótico a ser utilizado com sucesso (KALMUS *et al.*, 2006). Kakavas (1944) foi o primeiro pesquisador a utilizar a penicilina para tratar a mastite bovina e relatou resultados muito favoráveis. No entanto, com o tempo, *S. aureus* isolados de mastite bovina desenvolveram resistência à penicilina e, no final da década de 1940, a grande maioria dos *S. aureus* já havia se tornado resistente à droga.

Nessa perspectiva, as penicilinas semissintéticas, a exemplo da meticilina, surgiram como novas estratégias para o tratamento de infecções por *S. aureus* resistentes à penicilina. No entanto, logo surgiram cepas resistentes à meticilina, denominadas MRSA (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*), cujo padrão de resistência se estende a outros antibióticos beta-lactâmicos (VOSS *et al.*, 1994).

Em animais domésticos, o primeiro relato da infecção por MRSA ocorreu em 1972, no Reino Unido, e se tratava de um caso de mastite em vaca leiteira (DEVRIESE; VAN DAMME; FAMEREE, 1972). Desde então, passaram a ser relatados casos de mastite por MRSA em gado leiteiro (HOLMES; ZADOKS, 2011; JUHÁSZ-KASZANYITZKY *et al.*, 2007; MOON; DUARTE, 2006; SAKWINSKA *et al.*, 2011; HATA, 2016) e, devido à distribuição desse agente etiológico no ambiente pecuário, criou-se o termo LA-MRSA, ou MRSA ligado ao ambiente pecuário (HUBER *et al.*, 2010).

A resistência de *S. aureus* aos beta-lactâmicos se deve principalmente a três mecanismos, sendo eles: a produção de beta-lactamase, codificada pelo gene *blaZ* (ROBLES *et al.*, 2014); as alterações nas proteínas de ligação à penicilina (PBPs), produzindo uma proteína denominada PBP2a, de baixa afinidade com os antibióticos beta-lactâmicos, codificada pelos genes *mecA* e *mecC* (LOWY, 2008); e atuação do sistema de efluxo, reduzindo as concentrações intracelulares do antibiótico (WEBBER; PIDDOCK, 2003).

2.3.1 Produção de beta-lactamases

S. aureus pode produzir enzimas com capacidade de hidrolisar total ou parcialmente o anel beta-lactâmico, são as chamadas beta-lactamases, que conferem ao patógeno a resistência a esses antibióticos (MARTINI *et al.*, 2017). Essas enzimas podem ser encontradas extracelularmente em *S. aureus* e os genes que codificam a produção dessas enzimas podem estar localizados no cromossomo bacteriano ou no plasmídeo (BUSH, 1988). O gene *blaZ* é o responsável por

codificar as beta-lactamases em *S. aureus*, permitindo que essas enzimas inativem por hidrólise o anel beta-lactâmico, quebrando a ligação amida, e resultando na perda da capacidade do medicamento de inibir a síntese da parede celular bacteriana (DEVAPRIYA *et al.*, 2013). Deve-se destacar que esse gene já foi identificado em alguns estudos brasileiros que caracterizaram *Staphylococcus aureus* isolados de casos de mastite (MEDEIROS *et al.*, 2011; MARTINI *et al.*, 2017).

Tabela 1. Publicações brasileiras relacionadas ao tema “mastite por *Staphylococcus aureus* portadores do gene *blaZ*”

Ano	Título	Referência
2018	High Frequency of Beta-Lactam Resistance among <i>Staphylococcus aureus</i> Isolated from Bovine Mastitis in Northeast of Brazil	Santos <i>et al.</i>
2017	First report of the <i>Staphylococcus aureus</i> isolate from subclinical bovine mastitis in the South of Brazil harboring resistance gene <i>dfrG</i> and transposon family Tn916-1545	Haubert <i>et al.</i>
2017	Characterisation of penicillin and tetracycline resistance in <i>Staphylococcus aureus</i> isolated from bovine milk samples in Minas Gerais, Brazil	Martini <i>et al.</i>
2017	Biofilm production and beta-lactamic resistance in Brazilian <i>Staphylococcus aureus</i> isolates from bovine mastitis	Marques <i>et al.</i>
2017	Characterization of virulence and antibiotic profile and <i>agr</i> typing of <i>Staphylococcus aureus</i> from milk of subclinical mastitis bovine in State of Rio de Janeiro	Soares <i>et al.</i>
2016	Presence of <i>mecA</i> -positive multidrug-resistant <i>Staphylococcus epidermidis</i> in bovine milk samples in Brazil	Santos <i>et al.</i>
2015	Resistance to antimicrobials and biofilm formation in <i>Staphylococcus</i> spp. isolated from bovine mastitis in the Northeast of Brazil	Krewer <i>et al.</i>
2014	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> of lineage ST398 as cause of mastitis in cows	Silva <i>et al.</i>
2014	Beta-lactamase detection in <i>Staphylococcus aureus</i> and coagulase-negative <i>Staphylococcus</i> isolated from bovine mastitis	Robles <i>et al.</i>
2011	Antimicrobial resistance of <i>Staphylococcus</i> spp. isolates from cases of mastitis in buffalo in Brazil	Medeiros <i>et al.</i>

2.3.1.1 Gene *blaZ*

A resistência de *S. aureus* aos antibióticos beta-lactâmicos é comumente devido à expressão do gene *blaZ* (PITKÄLÄ *et al.*, 2007). Esse gene geralmente é localizado no plasmídeo, mas também pode estar localizado no cromossomo da bactéria (ZHANG *et al.*, 2001). A transcrição do gene *blaZ* é regulada pelo sistema *blaZ-blaR1-blaI*, onde *blaI* é um repressor da transcrição e *blaR1* é um anti-repressor. Assim, uma vez que a bactéria é exposta ao antibiótico, o gene *blaR1* inicia uma cascata de sinalização, promovendo clivagem do gene *blaI*, e resultando na transcrição do gene *blaZ* (ROBLES *et al.*, 2014).

2.3.2 Alterações nas proteínas de ligação à penicilina (PBPs)

As proteínas de ligação à penicilina (PBPs, do inglês *Penicillin-Binding Proteins*) são componentes essenciais da maquinaria de síntese da parede celular de bactérias (NAVRATNA *et al.*, 2010). A alteração nas PBPs impede a ligação ou diminui a afinidade da interação entre a droga com um ou mais alvos na célula bacteriana, desse modo o antibiótico não reconhece mais o alvo (LOWY, 2008).

Segundo Navratna *et al.* (2010), *S. aureus* apresenta cinco PBPs, sendo a PBP alterada (PBP2a) a mais estudada pois constitui um marcador específico para cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA). De acordo com Wu *et al.* (2015), cepas de MRSA têm a capacidade de adquirir um elemento genético denominado SCCmec (do inglês *Staphylococcal Cassette Chromosome mec*), que carrega o gene *mecA* e/ou *mecC* e que codifica a PBP2a. Desse modo, na presença de resistência induzida por uma PBP2a, a síntese da parede celular bacteriana ocorrerá normalmente mesmo na presença de qualquer antibiótico beta-lactâmico (WU *et al.*, 2015).

Destaca-se que cepas de MRSA foram relatadas pela primeira vez em vacas leiteiras em 1972, na Bélgica (DEVRIESE; HOMMEZ, 1975). No Brasil, são escassas as publicações identificando os casos de mastite por cepas de MRSA, fazendo-se necessária a realização de estudos que venham a contribuir para a epidemiologia da infecção por esse patógeno no país (MEJIA; ZURITA; GUZMÁN-BLANCO, 2010).

Tabela 2. Publicações brasileiras relacionadas ao tema “mastite por *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA)”

Ano	Título	Referência
2018	Genetic diversity and antimicrobial resistance in <i>Staphylococcus aureus</i> and coagulase-negative <i>Staphylococcus</i> isolates from bovine mastitis in Minas Gerais, Brazil	Dorneles <i>et al.</i>
2018	Bovine mastitis caused by <i>Staphylococcus</i> spp. Methicillin-resistant: Literature review	Silva; Alcântara; Mota
2017	Short communication: Outbreak of methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)-associated mastitis in a closed dairy herd	Guimarães <i>et al.</i>
2017	Occurrence and genetic characterization of <i>Staphylococcus aureus</i> in milk samples of cattle with mastitis, and in the veterinary hospital personnel and dairy workers	Leigue <i>et al.</i>
2016	Antimicrobial resistance profiles of <i>Staphylococcus aureus</i> clusters on small dairy farms in southern Brazil	Girardini <i>et al.</i>
2014	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> of lineage ST398 as cause of mastitis in cows	Silva <i>et al.</i>
2014	Age related to the presence of antimicrobial resistant bacteria in twenty one dairy herds in Rio Grande do Sul, Brazil	Santiago-Neto <i>et al.</i>
2009	Molecular characterisation of <i>Staphylococcus aureus</i> strains isolated from small and large ruminants reveals a host rather than tissue specificity	Alves <i>et al.</i>

2.3.2.1 Genes *mecA* e *mecC*

Cassete cromossômico estafilocócico mec (SCCmec) é um elemento genético móvel que carrega o “complexo *mec*”, incluindo-se os genes *mecA* e *mecC* (BECKER *et al.*, 2018). O gene *mecA* geralmente é acompanhado por genes indutores/repressores intactos ou truncados: *mecI-mecR1* (SHORE; COLEMAN, 2013). Além disso, esse gene codifica a PBP2a, que tem uma menor afinidade para ligação com beta-lactâmicos, conferindo resistência à bactéria. Destaca-se ainda que os reguladores homólogos *mecI* e *mecR1* controlam a expressão do gene *mecA* de modo semelhantes ao *blaZ*, quando há exposição da bactéria aos antibióticos beta-lactâmicos (LONCARIC *et al.*, 2019). Em 2011, um novo tipo de gene *mec* foi descoberto em *S. aureus*, que compartilha aproximadamente 70% da identidade da sequência de nucleotídeos com *mecA* (SHORE *et al.*, 2011). Este homólogo do *mecA*, inicialmente referido como *mecALGA251* e depois re-designado como *mecC*,

é uma parte do complexo do gene da classe E *mec* (*blaZ-mecC-mecR1-mecI*) e também confere resistência a beta-lactâmicos (LONCARIC *et al.*, 2019). Mais recentemente, um gene *mecB* também foi identificado a partir de plasmídeo de *S. aureus* e, apesar de mais estudos serem necessários, sugere-se que esse gene possa resultar no aumento do risco de disseminação de MRSA (BECKER *et al.*, 2018).

2.3.3 Sistema de Efluxo

O sistema de efluxo, ou bombas de efluxo, equivalem a proteínas presentes na membrana celular bacteriana, responsáveis pelo deslocamento de substâncias tóxicas à bactéria do meio intra para o meio extracelular, e que podem transportar antimicrobianos de diferentes classes (WEBBER; PIDDOCK, 2003).

Mais de 15 bombas de efluxo já foram caracterizadas em *S. aureus*, sendo codificadas no plasmídeo ou no cromossomo estafilocócico (PIDDOCK *et al.*, 2006). Ressalta-se, ainda, que a presença dos genes do sistema de efluxo em plasmídeo favorece a transferência de genes de resistência entre a mesma espécie ou entre espécies diferentes de bactérias (BUTAYE; CLOECKAERT; SCHWARZ, 2003). Por outro lado, caso o microrganismo não necessite da atuação do sistema de efluxo para sua sobrevivência, o gene de bomba de efluxo presente em plasmídeo pode ser perdido (PIDDOCK *et al.*, 2006).

Além disso, as bombas de efluxo são agrupadas em cinco famílias, caracterizadas pelas subunidades presentes em sua estrutura. Algumas famílias são divididas em subfamílias, sendo elas: Superfamília grande facilitadora (Major facilitator superfamily - MFS); Superfamília ligada à ATP cassete (ATP-binding cassette [ABC] superfamily); Pequena família de resistência a múltiplos medicamentos (Small multidrug resistance [SMR] family); Superfamília de divisão celular de nodulação de resistência, (Resistance-nodulation-cell division [RND] superfamily); Superfamília de extrusão de multidrogas e de compostos tóxicos (Multidrug and toxic compound extrusion [MATE] family) (PIDDOCK *et al.*, 2006).

Nos microrganismos Gram-positivos, a superfamília MFS é a mais estudada e inclui exemplos clinicamente relevantes, como *NorA* de *Staphylococcus aureus*, que exporta fluoroquinolonas e compostos de amônio quaternário. *NorA* é o sistema de efluxo mais bem estudado de *Staphylococcus aureus* e, portanto, frequentemente

usado como modelo para investigar a resistência mediada por efluxo nesse patógeno (ALAV; SUTTON; RAHMAN, 2018).

Desse modo, o sistema de efluxo favorece a sobrevivência de *S. aureus* mesmo em ambientes muito hostis e existem algumas bombas de efluxo específicas que reconhecem um único antibiótico ou classe de antibiótico, enquanto outras, conhecidas como bombas de efluxo de resistência a múltiplas drogas, reconhecem várias moléculas tóxicas que compartilham características comuns (WEBBER; PIDDOCK, 2003).

2.4 Rastreabilidade genética

A rastreabilidade genética se refere à capacidade de identificação de espécies ou genótipos de microrganismos presentes em uma cadeia produtiva (CAPORALE, 2001). Essa é uma importante ferramenta para salvaguardar a saúde pública e animal, pois permite identificar e rastrear microrganismos patogênicos ao longo da cadeia produtiva de alimentos (DALVIT; MARCHI; CASSANDRO, 2007).

Na cadeia produtiva do leite, constata-se que novas tecnologias e técnicas moleculares vêm sendo utilizadas para a rastreabilidade genética de microrganismos, permitindo mais agilidade e assertividade na tomada de decisão dos produtores e médicos veterinários, reduzindo custos e implementando medidas mais eficientes de controle e prevenção de patógenos no ambiente agropecuário (CASSANDRO, 2006).

Na perspectiva de investigações comparativas e correlações entre estruturas de microrganismos, os métodos moleculares têm se mostrado muito úteis, indicando as possíveis causas, locais de contaminação e métodos para um controle microbiológico efetivo e acessível. Desse modo, ressalta-se que as técnicas moleculares se baseiam na identificação dos microrganismos a partir do seu DNA ou RNA e a escolha da técnica mais adequada depende do que se deseja avaliar, do custo e da reprodutibilidade (FERRI, 2006).

Essas técnicas podem ser utilizadas em toda a cadeia produtiva de leite, na realização do rastreamento epidemiológico de agentes patogênicos, caracterizando os seus perfis genéticos com o intuito de determinar uma possível associação entre os mesmos, definir a fonte inicial de contaminação e/ou infecção e permitir a adoção de medidas de controles efetivas desde o início (SINGH *et al.*, 2006).

As técnicas de tipagem molecular são frequentemente empregadas para determinar a origem e as rotas das infecções, confirmar ou excluir surtos, rastrear a transmissão de patógenos associados à saúde, reconhecer cepas virulentas e avaliar a eficácia das medidas de controle (RANJBAR, 2014). Nesse contexto, a compreensão da epidemiologia de cepas de *S. aureus* resistentes não pode ser completamente apreciada sem o uso das técnicas de tipagem molecular (ARCENAS, 2017). Essas técnicas têm ajudado no monitoramento e no controle da disseminação dessas cepas no ambiente agropecuário, especificamente na cadeia produtiva do leite (KÜMMEL, 2016).

2.5 Detecção de resistência a beta-lactâmicos

Segundo Kralik e Ricchi (2017), a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) representa uma importante ferramenta em identificação de *Staphylococcus aureus* e em detecção rápida e precisa dos genes de resistência aos beta-lactâmicos, permitindo uma eficiente elaboração de estratégias que visem diminuir a disseminação do patógeno.

A incorporação da tipagem molecular tem sido considerada uma estratégia útil no diagnóstico e na vigilância epidemiológica de infecções por cepas de *S. aureus* resistentes (SINGH *et al.*, 2006). Dentre os principais métodos de tipagem, destacam-se a eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) (PATYI; VARGA; KRISTOF, 2011), a PCR em sequências palindrômicas extragênicas repetidas (rep-PCR) (CHURCH *et al.*, 2011), a tipagem *spa* (STROMMINGER *et al.*, 2008), a tipagem de *SCCmec* (VAINIO *et al.*, 2011), tipagem de sequências multilocus (MLST) (SAUNDERS; HOLMES, 2007) e o sequenciamento completo do genoma (WGS) (PRICE *et al.*, 2013).

A eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) é considerada a técnica ouro para genotipagem de *S. aureus* resistentes a beta-lactâmicos (PATYI; VARGA; KRISTOF, 2011). A partir da utilização dessa técnica é possível realizar a tipagem das amostras de *S. aureus* e avaliar a correlação genética dos isolados, possibilitando a elaboração de estratégias de controle e prevenção do patógeno nos rebanhos (BANNERMAN *et al.*, 1995).

O método de tipagem de *S. aureus* baseado na PCR, que utiliza primers de sequências consenso para sequências palindrômicas extragênicas (REP), tem sido

amplamente utilizado para investigar a similaridade entre isolados de *S. aureus*, por ser uma ferramenta extremamente reprodutível e rápida (CHAPAVAL *et al.*, 2006).

Assim, ressalta-se que a genotipagem de isolados de *S. aureus* por PFGE e por rep-PCR tem contribuído em muitos estudos epidemiológicos de mastite em primíparas, permitindo um melhor entendimento da disseminação do microrganismo (ANDERSON *et al.*, 2012).

Além disso, a resistência aos beta-lactâmicos é rotineiramente determinada por técnicas fenotípicas clássicas. As técnicas mais amplamente utilizadas incluem a microdiluição em caldo, que fornece avaliações quantitativas (ex: concentração inibitória mínima) e qualitativas usando as categorias suscetíveis, intermediárias ou resistentes e o teste de disco-difusão, que fornece informações qualitativas (CLSI, 2018). Entretanto, o método de microdiluição em caldo é considerado um dos mais confiáveis para avaliar a resistência fenotípica dos *S. aureus* aos antimicrobianos beta-lactâmicos (CLSI, 2018), tendo como objetivo determinar a concentração inibitória mínima (CIM) do agente antimicrobiano, gerando uma inibição do crescimento da bactéria investigada (ROBLES *et al.*, 2014).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a rastreabilidade genética e o perfil de resistência a beta-lactâmicos de cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite em vacas primíparas, ambiente de ordenha e ordenhadores no estado de Pernambuco, Brasil.

3.2 Específicos

- Isolar e identificar *Staphylococcus aureus* em amostras oriundas dos quartos mamários de vacas primíparas, de utensílios de ordenha e de ordenhadores.
- Detectar os genes *blaZ*, *mecA* e *mecC*, codificadores da resistência a beta-lactâmicos em cepas de *Staphylococcus aureus*.
- Avaliar a resistência antimicrobiana das cepas de *Staphylococcus aureus* frente a beta-lactâmicos (oxacilina e penicilina) pela técnica da Concentração Inibitória Mínima (CIM).
- Tipificar as cepas de *Staphylococcus aureus* portadoras de genes de resistência a beta-lactâmicos.

4 REFERÊNCIAS

ABRAHAM, E. P.; CHAIN, E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. **Nature**, v.146, p.837, 1940.

ACOSTA, A. C. *et al.* Mastites em ruminantes no Brasil. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v.36, n.7, p.565–573, 2016.

ALAV, I.; SUTTON, J. M.; RAHMAN, K. M. Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.73, n.8, p.2003-2020, 2018.

ALVES, P. D. D. *et al.* Molecular characterisation of *Staphylococcus aureus* strains isolated from small and large ruminants reveals a host rather than tissue specificity. **Veterinary Microbiology**, v.137, n.1-2, p.190-195, 2009.

ANDERSON, K. L. *et al.* Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy heifers. **Journal of Dairy Science**, v.95, n.9, p.4921–4930, 2012.

ARCENAS, R. C. Molecular Methods for Healthcare-Acquired Infections. In: **Diagnostic Molecular Pathology**. Academic Press, 2017. p. 163-177.

ARCHER, S. C. *et al.* Association between somatic cell count early in the first lactation and the longevity of Irish dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.96, n.5, p.2939–2950, 2013.

BANNERMAN, T. L. *et al.* Pulsed-field gel electrophoresis as a replacement for bacteriophage typing of *Staphylococcus aureus*. **Journal of clinical microbiology**, v.33, n.3, p.551–555, 1995.

BARHEMA, H. W. *et al.* Incidence of Clinical Mastitis in Dairy Herds Grouped in Three Categories by Bulk Milk Somatic Cell Counts. **Journal of Dairy Science**, v.81, n.2, p.411-419, 1998.

BARHEMA, H. W.; SCHUKKEN, Y. H.; ZADOKS, R. N. Invited Review : The Role of Cow , Pathogen , and Treatment Regimen in the Therapeutic Success of Bovine *Staphylococcus aureus* Mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 6, p. 1877–1895, 2006.

BAŞTAN, A. *et al.* The prediction of the prevalence and risk factors for subclinical heifer mastitis in Turkish dairy farms. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v. 39, n. 6, p. 682–687, 2015.

BECKER, K. *et al.* Plasmid-encoded transferable mecB-mediated methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Emerging Infectious Diseases**, v.24, n.2, p.242-248, 2018.

BLAIR, J. M. A. *et al.* Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v.13, n.1, p.42-51, 2015.

BODDIE, R.L. *et al.* Udder microflora in non-lactating heifers. **Agri-Practice**, v.8, p.22–25, 1987.

BUSH, K. Beta-lactamase inhibitors from laboratory to clinic. **Clinical Microbiology Reviews**, v.1, n.1, p.109-123, 1988.

BUTAYE, P.; CLOECKAERT, A.; SCHWARZ, S. Mobile genes coding for efflux-mediated antimicrobial resistance in Gram-positive and Gram-negative bacteria. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.22, p.205-210, 2003.

CAPORALE, V. *et al.* Importance of the traceability of animals and animal products in epidemiology. **Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties**, v. 20, n. 2, p. 372-378, 2001.

CASSANDRO, M. *et al.* Genetic Traceability of livestock products. **Acta Agraria Kaposváriensis**, v. 10, n. 2, p. 19-26, 2006.

CASTELANI, L. *et al.* Molecular typing of mastitis-causing *Staphylococcus aureus* isolated from heifers and cows. **International Journal of Molecular Sciences**, v.14, n.2, p.4326–4333, 2013.

CASTELANI, L. *et al.* Investigation of biofilm production and *icaA* and *icaD* genes in *Staphylococcus aureus* isolated from heifers and cows with mastitis. **Animal Science Journal**, v.86, n.3, p.340-344, 2015.

CASTELANI, L. *et al.* Short communication: Activity of nisin, lipid bilayer fragments and cationic nisin-lipid nanoparticles against multidrug-resistant *Staphylococcus* spp. isolated from bovine mastitis. **Journal of Dairy Science**, v.102, p.1, p.678–683, 2018.

CERQUEIRA, M. M. O. P. *et al.* Mastite em novilhas: importância e controle. **Ciência Animal Brasileira**, v.1, 2009.

CHAPAVAL, L. *et al.* Aplicação da técnica de REP-PCR no rastreamento de *Staphylococcus aureus* em sala de ordenha, para o monitoramento da qualidade do leite. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, n. 3, p. 309-320, 2006.

CHURCH, D. L. *et al.* Comparison of automated repetitive-sequence–based polymerase chain reaction and *spa* typing versus pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v.69, p.30-37, 2011.

CLSI. **M100-S25: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. Twenty-Eighth Informational Supplement. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018.

COSER, S. M.; LOPES, M. A.; COSTA, G. M. Mastite bovina: Controle e Prevenção. **Boletim Técnico UFL**, n.93, p.1–30, 2012.

COSTA, G. M. *et al.* Resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite em bovinos leiteiros de Minas Gerais, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.80, n.3, p.297-302, 2013.

COSTA, E. O. *et al.* Prevalence of intramammary infections in primigravid Brazilian dairy heifers. **Preventive Veterinary Medicine**, v.29, n.2, p.151–155, 1996.

COSTA, E.O. *et al.* Infecções intramamárias em novilhas primíparas no período pré ao pós-parto e sua importância no controle de mastite. **Revista Napgama**, n.1, p.16-20, 1999.

DALVIT, C.; DE MARCHI, M.; CASSANDRO, M. Genetic traceability of livestock products: A review. **Meat Science**, v. 77, n. 4, p. 437-449, 2007.

DE VLIEGHER, S. *et al.* Impact of Early Lactation Somatic Cell Count in Heifers on Milk Yield Over the First Lactation. **Journal of Dairy Science**, v.88, n.3, p.938–947, 2005.

DE VLIEGHER, S. *et al.* Invited review: Mastitis in dairy heifers: Nature of the disease, potential impact, prevention, and control. **Journal of Dairy Science**, v.95, n.3, p.1025–1040, 2012.

DE VLIEGHER, S.; ZADOKS, R. N.; BARKEMA, H. W. Heifer and CNS mastitis. **Veterinary Microbiology**, v.134, n.1-2, p.1-2, 2009.

DEVAPRIYA, F. *et al.* β -lactamase production of *Staphylococcus aureus*: a comparison study of different iodometric methods. **Gulf Medical Journal**, v.2, n.1, p.16-21, 2013.

DEVRIESE L. A.; VAN DAMME L.R.; FAMEREE L. Methicillin (cloxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis cases. **Zentralblatt für Veterinärmedizin**, v.19, n.7, p.598-605, 1972.

DEVRIESE, L. A.; HOMMEZ, J. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dairy herds. **Research in Veterinary Science**, 1975.

DINGWELL, R. T. *et al.* Evaluation of the California mastitis test to detect an intramammary infection with a major pathogen in early lactation dairy cows. **Canadian Veterinary Journal**, v.44, n.5, p.413–416, 2003.

DORNELES, E. M. S. *et al.* Genetic diversity and antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* and *coagulase-negative Staphylococcus* isolates from bovine mastitis in Minas Gerais, Brazil. **MicrobiologyOpen**, v.8, n.5, p.1-7, 2018.

EL-RASHIDY, A. A.; FOX, L. K.; GAY, J. M. Diagnosis of *Staphylococcus aureus* Intramammary Infection by Detection of Specific Antibody Titer in Milk. **Journal of Dairy Science**, v.75, n.6, p.1430–1435, 1992.

FAGUNDES, H.; GARINO JR, F.; COSTA, E.O. Primigravid heifers pré-partum: efficacy and antimicrobial milk residue risk. **Revista Napgama**, v.7, p.6-12, 2004.

FERRI, G. Epidemiological surveillance and on-farm inspections: rural veterinary network, public-private sector relations, training of farmers and veterinarians. **Compendium of technical items presented to the International Committee or to Regional Commissions of the OIE**, 2006.

FOX, L. K. Prevalence, incidence and risk factors of heifer mastitis. **Veterinary Microbiology**, v.134, n.1-2, p.82-88, 2009.

GILLESPIE, D. E. *et al.* Isolation of antibiotics turbomycin A and B from a metagenomic library of soil microbial DNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.9, p.4301–4306, 2002.

GIRARDINI, L. K. *et al.* Antimicrobial resistance profiles of *Staphylococcus aureus* clusters on small dairy farms in southern Brazil. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v.36, n.10, p.951-956, 2016.

GUIMARÃES, F. F. *et al.* Short communication : Outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) -associated mastitis in a closed dairy herd. **Journal of Dairy Science**, v.100, n.1, p.726–730, 2017.

HALLBERG, J. W. *et al.* The visual appearance and somatic cell count of mammary secretions collected from primigravid heifers during gestation and early postpartum. **Journal of dairy science**, v.78, n.7, p.1629–1636, 1995.

HAND, K. J.; GODKIN, A.; KELTON, D. F. Milk production and somatic cell counts: A cow-level analysis. **Journal of Dairy Science**, v.95, n.3, p.1358-1362, 2012.

HATA, E. Bovine mastitis outbreak in Japan caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* New York / Japan clone. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 28, n.3, p.291-298, 2016.

HAUBERT, L. *et al.* First report of the *Staphylococcus aureus* isolate from subclinical bovine mastitis in the South of Brazil harboring resistance gene *dfg* and transposon family Tn916-1545. **Microbial Pathogenesis**, v.113, p.242-247, 2017.

HEINRICHS, A. J. *et al.* A 100-Year Review: A century of dairy heifer research. **Journal of Dairy Science**, v.100, n.12, p.10173–10188, 2017.

HOGVEEN, H.; HUIJPS, K.; LAM, T. J. G. M. Economic aspects of mastitis: New developments. **New Zealand Veterinary Journal**, v.59, n.1, p.16-23, 2011.

HOLMES, M. A.; ZADOKS, R. N. Methicillin resistant *S. aureus* in human and bovine mastitis. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v.16, n.4, p.373-382, 2011.

HUBER, H. *et al.* Prevalence and characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in humans in contact with farm animals, in livestock, and in food of animal origin, Switzerland, 2009. **Eurosurveillance**, v.15, n.16, 2010.

HUIJPS, K. *et al.* Cost estimation of heifer mastitis in early lactation by stochastic

modelling. **Veterinary Microbiology**, v.134, p.121–127, 2009.

IBGE. Indicadores IBGE - Estatística da Produção Pecuária, jan.-mar. 2018.
Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, 2018.

JÁNOSI, S.; BALTAY, Z. Correlations among the somatic cell count of individual bulk milk, result of the California Mastitis Test and bacteriological status of the udder in dairy cows. **Acta Veterinaria Hungarica**, v.52, n.2, p.173-183, 2004.

JUHÁSZ-KASZANYITZKY, É. *et al.* MRSA transmission between cows and humans. **Emerging Infectious Diseases**, v.13, n.4, p.630-632, 2007.

KAKAVAS, J. C.: Penicillin in the treatment of bovine mastitis. **North American Veterinarian**, v.25, p.408-412, 1944.

KALMUS, P. *et al.* Occurrence of clinical mastitis in primiparous Estonian dairy cows in different housing conditions. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.48, n.1, p.1-6, 2006.

KIBEBEW, K. Bovine Mastitis : A Review of Causes and Epidemiological Point of View. **Journal of Biology, Agriculture and Healthcare**, v. 7, n. 2, p. 1–14, 2017.

KLIMEŠOVÁ, M. *et al.* Occurrence of *Staphylococcus aureus* in cattle, sheep, goat, and pig rearing in the Czech Republic. **Acta Veterinaria Brno**, v.86, n.1, p3-10, 2017.

KRALIK, P.; RICCHI, M. A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: Definitions, parameters, and everything. **Frontiers in Microbiology**, v.8, n.108, p.1-9, 2017.

KREWER, C. C. *et al.* Resistance to antimicrobials and biofilm formation in *Staphylococcus* spp. isolated from bovine mastitis in the Northeast of Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v.47, n.3, p.511-518, 2015.

KÜMMEL, J. *et al.* *Staphylococcus aureus* entrance into the dairy chain: tracking *S. aureus* from dairy cow to cheese. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 1603, 2016.

LAFFRANCHI, A. *et al.* Etiologia das infecções intramamárias em vacas primíparas ao longo dos primeiros quatro meses de lactação. **Ciência Rural**, v. 31, n. 6, p. 1027–1032, dez. 2001.

LAM, T. J. G. M. *et al.* Mastitis diagnostics and performance monitoring: A practical approach. **Irish Veterinary Journal**, v.62, n.4, p.34–39, 2009.

LAMMERS, A. *et al.* Identification of *Staphylococcus aureus* genes expressed during growth in milk: A useful model for selection of genes important in bovine mastitis? **Microbiology**, v.146, n.4, p.981-987, 2000.

LANGONI, H. Qualidade do leite: Utopia sem um programa sério de monitoramento

da ocorrência de mastite bovina. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v.33, n.5, p.620-626, 2013.

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

LEIGUE, L. *et al.* Occurrence and genetic characterization of *Staphylococcus aureus* in milk samples of cattle with mastitis, and in the Veterinary Hospital personnel and dairy workers. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.52, n.2, p.117-128, 2017.

LIM, S.K. *et al.* Transmission and Persistence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Milk, Environment, and Workers in Dairy Cattle Farms. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.10, n.8, p.731-736, 2013.

LINDER, M. *et al.* Cure rates of chronic subclinical *Staphylococcus aureus* mastitis in lactating dairy cows after antibiotic therapy. **Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift**, v.126, n7-8, p.291-296, 2013.

LONCARIC, I. *et al.* Characterization of mecC gene-carrying coagulase-negative *Staphylococcus* spp. isolated from various animals. **Veterinary Microbiology**, v.230, p.138-144, 2019.

LOPES, L.O.; LACERDA, M.S.; RONDA, J.B. Uso de antibióticos na cura e controle de mastite clínica e subclínica causada por principais micro-organismos contagiosos em bovinos leiteiros: revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v.21, p.1-15, 2013.

LOWY, F. D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Investigation**, v.111, n.9, p.1265-1273, 2008.

LYONT, B. R.; SKURRAY, R. O. N. Antimicrobial Resistance of *Staphylococcus aureus*: Genetic Basis. **Microbiology Reviews**, v.51, n.1, p. 88–134, 1987.

MALINOWSKI, E. *et al.* Relationship between mastitis agents and somatic cell count in foremilk samples. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v.50, n.3, p.349-352, 2006.

MARQUES, V. F. *et al.* Biofilm production and beta-lactamic resistance in Brazilian *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.48, p.118–124, 2017.

MARTINI, C. L. *et al.* Characterisation of penicillin and tetracycline resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk samples in Minas Gerais, Brazil. **Journal of Dairy Research**, v.84, n.2, p.202-205, 2017.

MCDUGALL, S. *et al.* A review of prevention and control of heifer mastitis via non-antibiotic strategies. **Veterinary Microbiology**, v.134, n.1-2, p.177-185, 2009.

MEDEIROS, E. S. *et al.* Perfil de sensibilidade microbiana in vitro de linhagens de

Staphylococcus spp . isoladas de vacas com mastite. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 7, p. 569–574, 2009.

MEDEIROS, E. S. *et al.* Antimicrobial resistance of *staphylococcus* spp. isolates from cases of mastitis in buffalo in brazil. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.23, n.4, p.793–796, 2011.

MEJIA, C.; ZURITA, J.; GUZMÁN-BLANCO, M. Epidemiologia e vigilância de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina na América Latina. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.14, n.2, p.79-86, 2010.

MENDES, C. G. *et al.* Pesquisa de Resíduos de Beta-Lactâmicos no Leite Cru Comercializado Clandestinamente no Município de Mossoró, RN, utilizando o DELVOTEST SP. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.75, n.1, p.95-98, 2008.

MINETT, F. C.; STABLEFORTH, A. W.; EDWARDS, S. J. Studies on bovine mastitis—VIII. The control of chronic streptococcus mastitis. **Journal of Comparative Pathology and Therapeutics**, v. 46, p. 131–138, 1933.

MOON, D. H.; DUARTE, F. R. Aplicação da técnica de REP – PCR no rastreamento de *Staphylococcus aureus* em sala de ordenha , para o monitoramento da qualidade do leite. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, n.3, p.309–320, 2006.

MORETTI, P. E. Antibiograma. **Microbiologia, Fundamentos & Aplicações - Métodos em Microbiologia**, 2007.

MULLARKY, I. K. *et al.* *Staphylococcus aureus* agr genotypes with enterotoxin production capabilities can resist neutrophil bactericidal activity. **Infection and Immunity**, v.69, n.1, p.45–51, 2001.

MUNCH-PETERSEN, E. Mastitis in bovine primiparae. **The Veterinary record**, v.87, p.568-574, 1970.

MYLLYS, V.; RAUTALA, H. Characterization of Clinical Mastitis in Primiparous Heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 78, n. 3, p. 538–545, 1995.

NAVRATNA, V. *et al.* Molecular basis for the role of *Staphylococcus aureus* penicillin binding protein 4 in antimicrobial resistance. **Journal of bacteriology**, v.192, n.1, p.134-144, 2010.

NICKERSON, S. C. Control of heifer mastitis: Antimicrobial treatment-An overview. **Veterinary Microbiology**, v.134, n.1-2, p.128-135, 2009.

NICKERSON, S. C.; OWENS, W. E.; BODDIE, R. L. Mastitis in dairy heifers: initial studies on prevalence and control. **Journal of dairy science**, v.78, n.7, p.1607–1618, 1995.

NMC. **Recommended mastitis control program**. Verona: National Mastitis Council, 2011. Disponível em: www.nmconline.org/docs/NMCchecklistInt.pdf.

NYMAN, A. K. *et al.* Risk factors associated with the incidence of veterinary-treated clinical mastitis in Swedish dairy herds with a high milk yield and a low prevalence of subclinical mastitis. **Preventive Veterinary Medicine**, v.78, n.2, p.142-160, 2007.

OLDE RIEKERINK, R. G. M.; BARKEMA, H. W.; STRYHN, H. The Effect of Season on Somatic Cell Count and the Incidence of Clinical Mastitis. **Journal of Dairy Science**, v.90, n.4, p.1704-1715, 2007.

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.

OLIVER, S.P.; MITCHELL, B.A. Intramammary infections in primigravid heifers near parturition. **Journal of Dairy Science**, v.66, p.1180-1183, 1983.

OLIVER, S.P. Intramammary infections in heifers at parturition and during early lactation in a herd with high prevalence of environmental mastitis. **Tennessee Farm and Home Science**, v.143, p.18-22, 1987.

OLIVER, S. P. *et al.* Influence of Prepartum Antibiotic Therapy on Intramammary Infections in Primigravid Heifers During Early Lactation. **Journal of Dairy Science**, v.75, n.2, p.406-414, 1992.

OLIVER, S. P. *et al.* Prepartum Antibiotic Treatment of Heifers: Milk Production, Milk Quality and Economic Benefit. **Journal of Dairy Science**, v.86, n.4, p.1187–1193, 2003.

OLIVER, S. P. *et al.* Prevalence, Risk Factors, and Strategies for Controlling Mastitis in Heifers During the Periparturient Period. **The International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine**, v. 3, n. 2, p. 150–162, 2005.

OWENS, W. E. *et al.* Role of horn flies (*Haematobia irritans*) in *Staphylococcus aureus*-induced mastitis in dairy heifers. **American Journal of Veterinary Research**, v.59, n.9, p.1122-1124, 1998.

PALMER, C.C.; KAKAVAS, J.C.; HAY, J.R. Studies on bovine mastitis. Mastitis in heifers. **American Journal of Veterinary Research**, v.2, p.18-34, 1941.

PARDO, P. E. *et al.* Etiologia das infecções intramamárias em vacas primíparas no período pós-parto. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.18, n.3-4, p.115-118, 1998.

PATYI, M.; VARGA, É.; KRISTOF, K. Curiosities of the methicillin resistant *Staphylococcus aureus* survey-possibility of pseudo-outbreak and transmission to household contacts. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v.58, p.135-144, 2011.

PETERSSON-WOLFE, C. S.; MULLARKY, I. K.; JONES, G. M. *Staphylococcus aureus* Mastitis: Cause, Detection, and Control. **Virginia Cooperative Extension**, 2010.

PIDDOCK, L. J. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v.19, p.382–402, 2006.

PIEPERS, S. *et al.* Impact of intramammary infections in dairy heifers on future udder health , milk production , and culling. **Veterinary Microbiology**, v.134, n1-2, p. 113–120, 2009.

PIEPERS, S. *et al.* Pathogen group specific risk factors at herd, heifer and quarter levels for intramammary infections in early lactating dairy heifers. **Preventive Veterinary Medicine**, v.99, n2-4, p.91-101, 2011.

PILON, L. E. *et al.* Identification of Bacterial Agents and Resistance Profile of Coagulase-Negative Staphylococci Isolated from Heifers Submitted or not to Precalving Treatment. **Journal of Veterinary Veterinary Science & Technology**, v.7, n.6, 2016.

PITKÄLÄ, A. *et al.* Comparison of tests for detection of β -lactamase-producing staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, n.6, p.2031-2033, 2007.

PRICE, J. *et al.* The usefulness of whole genome sequencing in the management of *Staphylococcus aureus* infections. **Clinical Microbiology and Infection**, v.19, n.9, p.784-789, 2013.

RANJBAR, R. *et al.* Typing methods used in the molecular epidemiology of microbial pathogens: a how-to guide. **The new microbiologica**, v. 37, n. 1, p. 1-15, 2014.

ROBERSON, J. R. *et al.* Sources of Intramammary Infections from *Staphylococcus aureus* in Dairy Heifers at First Parturition. **Journal of Dairy Science**, v.81, p.687–693, 1998.

ROBLES, B. F. *et al.* Beta-lactamase detection in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* isolated from bovine mastitis. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v.34, n.4, p.325-328, 2014.

RUEGG, P. L. A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. **Journal of Dairy Science**, v.100, n.12, p.10381-10397, 2017.

RYMAN, V. E. *et al.* Influence of horn flies (*Haematobia irritans*) on teat skin condition, intramammary infection, and serum anti-*S. aureus* antibody titres in holstein heifers. **Research in Veterinary Science**, v.95, n.2, p.343-346, 2013.

SAKWINSKA, O. *et al.* *Staphylococcus aureus* Host Range and Human-Bovine Host Shift. **Applied and Environmental Microbiology**, v.77, n.17, p.5908-5915, 2011.

SALAZAR , J. A. E. Mastitis en novillas de primer parto: Patógenos, prevención y control. **UTN Informa**, v.61, p.64-68, 2012. Disponível em: http://eeavm.ucr.ac.cr/Documentos/ARTICULOS_PUBLICADOS/2012/171.pdf

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte:

Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998, 221p.

SANTIAGO-NETO, W. *et al.* Age related to the presence of antimicrobial resistant bacteria in twenty one dairy herds in Rio Grande do Sul, Brazil. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v.34, n.7, p.613-620, 2014.

SANTMAN-BERENDS, I. M. G. A. *et al.* Incidence of subclinical mastitis in Dutch dairy heifers in the first 100 days in lactation and associated risk factors. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 5, p. 2476–2484, 2012.

SANTOS, A. S. *et al.* High Frequency of Beta-Lactam Resistance among *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Mastitis in Northeast of Brazil. **International Journal of Bacteriology & Parasitology**, v. 108, p. 1-4, 2018.

SANTOS, F. F. *et al.* Presence of mecA-positive multidrug-resistant *Staphylococcus epidermidis* in bovine milk samples in Brazil. **Journal of Dairy Science**, v.99, n.2, p.1374-1382, 2016.

SAUNDERS, N. A.; HOLMES, A. Multilocus sequence typing (MLST) of *Staphylococcus aureus*. In: **Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* (MRSA) Protocols**. Humana Press, 2007. p. 71-85.

SCHALM, O. W. Streptococcus agalactiae in the udder of heifers at parturition traced to suckling among calves. **Cornell Vet.**, v.32, p.39-60, 1942.

SCHMIDT, T.; KOCK, M. M.; EHLERS, M. M. Diversity and antimicrobial susceptibility profiling of staphylococci isolated from bovine mastitis cases and close human contacts. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 9, 2015.

SEEGERS, H.; FOURICHON, C.; BEAUDEAU, F. Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. **Veterinary Research**, v.34, n.5, p.475-491, 2003.

SHEARER, J. K.; HARMON, R. J. MASTITIS IN HEIFERS. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 9, n. 3, p. 583–595, 1993.

SHORE, A. C. *et al.* Detection of staphylococcal cassette chromosome mec type XI carrying highly divergent mecA, mecI, mecR1, blaZ, and ccr genes in human clinical isolates of clonal complex 130 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.55, n.8, p.3765-3773, 2011.

SHORE, A. C.; COLEMAN, D. C. Staphylococcal cassette chromosome mec: Recent advances and new insights. **International Journal of Medical Microbiology**, v.303, n.6-7, p.350-359, 2013.

SILVA, J. G.; ALCÂNTARA, A. M.; MOTA, R. A. Bovine mastitis caused by *Staphylococcus* spp. Methicillin-resistant: Literature review. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v.38, n.2, p.223-228, 2018.

SILVA, N. C. C. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of lineage ST398

as cause of mastitis in cows. **Letters in Applied Microbiology**, v.59, n.6, p.665-669, 2014.

SINGH, A. *et al.* Application of molecular techniques to the study of hospital infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v.19, n.3, p.512-530, 2006.

SOARES, B. S. *et al.* Characterization of virulence and antibiotic profile and agr typing of *Staphylococcus aureus* from milk of subclinical mastitis bovine in State of Rio de Janeiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v.69, n.4, p.843-850, 2017.

STABLEFORTH, A. W.; EDWARDS, S. J.; MINETT, F. C. Studies on Bovine Mastitis. XI.—Further Observations on the Control of Chronic *Streptococcus* Mastitis. **Journal of Comparative Pathology and Therapeutics**, v. 48, p. 300–315, 1935.

STROMMINGER, B. *et al.* spa typing of *Staphylococcus aureus* as a frontline tool in epidemiological typing. **Journal of clinical microbiology**, v.46, n.2, p.574-581, 2008.

TONG, S. Y. *et al.* *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. **Clinical Microbiology Reviews**, v.28, n.3, p.603-61. 2015.

TRINIDAD, P.; NICKERSON, S. C.; ALLEY, T. K. Prevalence of Intramammary Infection and Teat Canal Colonization In Unbred and Primigravid Dairy Heifers1. **Journal of Dairy Science**, v. 73, n. 1, p. 107–114, 1990.

VAINIO, A. *et al.* Adapting spa typing for national laboratory-based surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**; v.30, p.789-797, 2011.

VOSS, A. *et al.* Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v.13, n.1, p.50–55, 1994.

WAAGE, S. *et al.* Case-control study of risk factors for clinical mastitis in postpartum dairy heifers. **Journal of dairy science**, v. 84, n. 2, p. 392–9, 2001.

WAAGE, S.; SVILAND, S.; ØDEGAARD, S. A. Identification of Risk Factors for Clinical Mastitis in Dairy Heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 5, p. 1275–1284, 1998.

WEBBER, M. A.; PIDDOCK, L. J. V. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.51, n.1, p.9-11, 2003.

WEGENER, H. C.; NIELSEN, P.; ROSDAHL, V. T. *Staphylococcus aureus* mastitis in heifers. An epidemiological study by conventional and molecular typing methods. **Dansk Veterinærtidsskrift**, 1993.

WU, Z. *et al.* Novel type XII staphylococcal cassette chromosome mec harboring a

new cassette chromosome recombinase, CcrC2. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.59, n.12, p.7597-7601, 2015.

YANG, F. L. *et al.* The prevalence of heifer mastitis and its associated risk factors in Huanggang, Central China. **Tropical Animal Health and Production**, v.47, n.1, p.87–92, 2014.

YELIN, I.; KISHONY, R. Antibiotic Resistance. **Cell**, v.172, n.5, p.1136-1136, 2018.

YILMAZ, E. Ş.; ASLANTAŞ, Ö. Antimicrobial resistance and underlying mechanisms in *Staphylococcus aureus* isolates. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v.10, n.11, p.1059-1064, 2017.

ZECCONI, A.; HAHN, G. *Staphylococcus aureus* in raw milk and human health risk. **Bulletin of IDF**, Belgium, v. 345, p. 15-18, 2000.

ZHANG, H. Z. *et al.* A proteolytic transmembrane signaling pathway and resistance to β -lactams in staphylococci. **Science**, v.291, n.5510, p1962-1965, 2001.

CAPÍTULO 1

Ocurrence of β -lactam-resistant *Staphylococcus aureus* in milk from primiparous dairy cows in the northeastern region of Brazil

(Manuscrito publicado no periódico Tropical Animal Health and Production)

Occurrence of β -lactam-resistant *Staphylococcus aureus* in milk from primiparous dairy cows in the northeastern region of Brazil

ABSTRACT

The objective of the current study was to isolate and identify *Staphylococcus (S.) aureus* strains resistant to beta-lactam antibiotics from primiparous cows' milk. A total of 432 milk samples were collected from all primiparous dairy cows in early lactation originated from 9 dairy properties. All samples were cultured in Mannitol Salt Agar enriched with egg yolk emulsion. Determination of genotypic resistance of *S. aureus* was achieved by Polymerase Chain Reaction (PCR) for amplification of the *blaZ*, *mecA* and *mecC* genes. Phenotypic resistance of *S. aureus* strains was evaluated by Minimal Inhibitory Concentration (MIC) technique using broth microdilutions of penicillin G and oxacillin. From all the mammary quarters examined, *S. aureus* strains were detected in 27 out of 432 (6.25%) milk samples ($CI_{95\%}$, 4.33-8.84). From all dairy properties visited, only two out of 9 were found to have *S. aureus*. Hence, it was able to evaluate genotypic and phenotypic resistance in 27 samples from two dairy farms. The isolates of *S. aureus* had a frequency of (20/27) 74.07% to *blaZ* gene ($CI_{95\%}$, 57.5-90.6) whereas *mecA* and *mecC* genes were not observed. According to MIC results, penicillin G had a 74.07% (20/27) resistance rate ($CI_{95\%}$, 57.5-90.6) and oxacillin had a 14.81% (4/27) resistance rate ($CI_{95\%}$, 1.4-28.2). Thus, the circulation of *S. aureus* strains resistant to beta-lactams has been confirmed in primiparous dairy cows in the northeastern region of Brazil, indicating the need of new management strategies involving the use of beta-lactam drugs to treat mastitis, discouraging and/or limiting their use. Also, it is important to highlight the need for further studies on epidemiology and traceability of the pathogen.

Keywords: antimicrobial resistance; intramammary infection; primigravid cow; *Staphylococcus* spp.

Introduction

Intramammary infections (IMIs) in primiparous dairy cows result primarily in milk quality decrease and compromise productive capacity in subsequent lactations (Laffranchi *et al.* 2001). In Brazil, studies on primiparous cows mastitis are scarce, thus, it is important to conduct research aiming to identify the disease situation in this group of animals in Brazilian dairy herds.

Bacteria in the genus *Staphylococcus* have been considered one of the main mastitis-causing pathogens in primigravid cows (Adkins *et al.* 2018), especially *Staphylococcus (S.) aureus*, and they also have been reported frequently causing human infections (Buchan *et al.* 2019). Possibly, treatment failures of IMIs occur as a result of antimicrobial resistance mechanisms developed by the microorganism, in particular beta-lactam compounds, which remain the most commonly used drugs in veterinary medicine (Pitkälä *et al.* 2007). Considering that there are *S. aureus* strains capable of transferring beta-lactam resistance genes to humans, the objective of this study was to evaluate the presence of the *blaZ*, *mecA* and *mecC* genes in *S. aureus* isolates from milk of primiparous cows and evaluate the phenotypic resistance profile of these isolates.

Materials and Methods

Ethical approval

The entire experimental procedure is in accordance with the ethical principles adopted by the Ethics Committee for the Use of Animals from Federal Rural University of Pernambuco, license number 037/2018.

Sampling

In total, 432 milk samples were collected from all primiparous dairy cows in early lactation (<50 days in milk, DIM) (n=108), originated from dairy properties (n=9) registered in the Agricultural and Livestock Defense and Inspection Agency of the State of Pernambuco (ADAGRO) located in the Agreste region of Pernambuco state.

Sample collection was performed according to the National Mastitis Council recommendations (NMC 2011). Milk samples were collected after disinfection of each teat with a cotton ball soaked in 70% alcohol and discarding the three first milk jets. The collection of 5 mL of milk was performed by mammary quarter style, in sterile resealable sample tubes with a lid and identified with the number of the animal and the mammary quarter. All the milk samples were sent to the Laboratory of Infectious and Contagious Diseases of Domestic Animals (LDIC), Department of Veterinary Medicine (DMV), at Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE) for microbiological examination according to NMC protocols (Laboratory handbook on bovine mastitis 1999).

Bacterial isolates

Bacterial isolation was performed in Mannitol Salt Agar (Difco Laboratories Inc., Detroit, USA) enriched with egg yolk emulsion (HiMedia, Mumbai, India) and incubated aerobically at 37°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) with readings after 24, and 48 hours to identify colony morphology. All typical colonies of *S. aureus* with a positive coagulase test were cultured again in Mannitol Salt Agar to obtain a greater amount of bacteria for genomic DNA extraction.

DNA Extraction and *S. aureus* confirmation

DNA extraction of typical colonies of *S. aureus* was performed using the heat treatment of bacteria conducted according to Fan et al. (1995). Subsequently, DNA concentration and

purity were assessed using a spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) with absorbance at 260nm (Brakstad et al. 1992).

The confirmation of *S. aureus* was achieved by Polymerase Chain Reaction (PCR) for amplification of the *nuc* gene (Kateete et al. 2010) (Table 1). For *nuc* gene detection, the ATCC® 43300 *S. aureus* subspecies *aureus* strain was used as a positive control and DNA Free Water (QIAGEN, Hilden, Germany) as a negative control.

DNA Sequencing

PCR amplified products were purified using the Quiacki purification® kit following the manufacturer's recommendations and forwarded to the Central Laboratory (LABCEN) of the Center of Biological Sciences (CCB) from Federal University of Pernambuco (UFPE).

At LABCEN, purified PCR products were sequenced bidirectionally with ABI BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit ver.3.1 (Applied Biosystems®) following the manufacturer's recommendations, by Sanger sequencing method. Afterwards, the sequences acquired were analyzed with aid of software BioEdit® (Hall 1999) and MEGA 5 compared to the database found in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).

Genotypic profile of beta-lactam resistance

The genotypic profile of beta-lactam resistance of the *S. aureus* isolates was carried out by PCR for amplification of the *blaZ*, which encodes beta-lactamases, and the *mecA* and *mecC* genes, which are inducers of the beta-lactam site of action modification (Table 1). For detection of *blaZ* gene, PCR was performed according to Sawant et al. (2009) and the ATCC® 29213 *S. aureus* subspecies *aureus* strain was used as a positive control and DNA Free Water (QIAGEN, Hilden, Germany) as a negative control. For detection of *mecA* gene,

PCR was executed as described by Nakagawa et al. (2005) and thermal profile according to Paterson et al. (2012) and the ATCC® 43300 *S. aureus* subspecies *aureus* strain was used as a positive control and DNA Free Water (QIAGEN, Hilden, Germany) as a negative control. For detection of *mecC* gene, PCR was conducted as described by Paterson et al. (2012) and the ATCC® 43300 *S. aureus* subspecies *aureus* strain was used as a positive control and DNA Free Water (QIAGEN, Hilden, Germany) as a negative control.

Table 1. *Primer* sequences for PCR and their respective sizes of amplicons in base pairs (bp) and references

Primer name	Sequence (5'-3')	Predicted product (pb)	Reference
nuc	F: GCGATTGATGGTGATACGGTT R: AGCCAAGCCTTGACGAACTAAGC	279	Kateete et al. (2010)
blaZ	F: AAGAGATTTGCCTATGCTTC R: GGCAATATGATCAAGATAC	517	Sawant et al. (2009)
mecA	F: TGGTATGTGGAAGTTAGATTGGGAT R: CTAATCTCATATGTGTTCTGTATTGGC	155	Nakagawa et al. (2005)
mecC	F: CATTAAAATCAGAGCGAGGC R: TGGCTGAACCCATTTTGTAT	188	Paterson et al. (2012)

Positive controls for all genes were provided by the LDIC, DMV, UFRPE and used to confirm the accuracy of the PCR method.

Phenotypic profile of beta-lactam resistance

The phenotypic profile of beta-lactam resistance in *S. aureus* isolates was determined by Minimum Inhibitory Concentration (MIC) technique using broth microdilutions of Oxacillin and Penicillin G, as described by Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI 2018). The MIC distribution data were obtained from all the *S. aureus* isolates and the ATCC® 29213 *S. aureus* subspecies *aureus* strain (provided by LDIC, DMV, UFRPE) was used as a positive control for penicillin resistance and the ATCC® 43300 *S. aureus* subspecies *aureus* strain

(provided by LDIC, DMV, UFRPE) as a positive control for oxacillin resistance. Also, the MIC values of each antimicrobial drug required to inhibit 50% (MIC₅₀) and 90% (MIC₉₀) were determined and expressed as absolute and relative frequencies (Field, 2011).

Statistical analysis

The qualitative variables were compared in contingency tables and analyzed by chi-square test at a 5% probability level (Sampaio 2002).

Results

Microbiological tests revealed *S. aureus* in 27 out of 432 (6.25%) milk samples (95% confidence interval [CI], 4.33-8.84) from two out of 9 dairy herds. All 27 bacterial isolates were positive to *nuc* gene and the sequencing analysis results obtained for all isolates were the same, the *Staphylococcus aureus* strain ch3 plasmid pLUH02 (NCBI accession number MH785250.1). Hence, genotypic and phenotypic resistances were evaluated in 27 bacterial isolates.

Of all *S. aureus* isolates, 74.07% (20/27) were positive for *blaZ* gene (95% confidence interval [CI], 57.5-90.6) and none of these isolates were positive for *mecA* and *mecC* genes (Table 2).

Table 2. Frequency of beta-lactam resistance genes among *Staphylococcus aureus* strains isolated from primiparous cows' milk from dairy herds in Pernambuco state, Brazil.

Dairy herd	Number of milk samples	<i>S. aureus</i> positive (%)	<i>blaZ</i> positive (% of total of positive <i>S. aureus</i>)	<i>mecA</i> positive (% of total of positive <i>S. aureus</i>)	<i>mecC</i> positive (% of total of positive <i>S. aureus</i>)
1	44	0	0	0	0
2	28	0	0	0	0
3	12	0	0	0	0
4	24	0	0	0	0

5	56	1 (1.78)	1 (3.70)	0	0
6	112	26 (23.21)	19 (70.37)	0	0
7	88	0	0	0	0
8	48	0	0	0	0
9	20	0	0	0	0
Total	432	27 (6.25)	20 (74.07)	0	0

% = Relative Frequency

Considering MIC test, MIC₅₀ and MIC₉₀ were, respectively, 0.5 and 2 µg/mL for penicillin G and 0.5 and 8 µg/mL for oxacillin (Table 3).

Table 3. Comparison of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* isolates to a natural beta-lactam (penicillin) and a synthetic one (oxacillin) in MIC technique (µg/mL)

Total of analyzed <i>S. aureus</i> isolates	PEN			OXA		
	%	MIC ₅₀	2	%	MIC ₅₀	8
		MIC ₉₀			MIC ₉₀	
27	74.07	0.5	2	14.81	0.5	8

% = Relative Frequency; PEN = penicillin G; OXA= oxacillin.

There was a divergence between phenotypic and genotypic results to penicillin G because 74.07% (20/27) of the isolates expressed phenotypic resistance (95% confidence interval [CI], 57.5-90.6) but only 75% (15/20) of them carrying *blaZ* gene (95% confidence interval [CI], 56.0-94.0). In addition, 25.92% (7/27) of the isolates were sensitive to penicillin (95% confidence interval [CI], 9.5-42.5) whereas 71.43% (5/7) of them carrying *blaZ* gene (95% confidence interval [CI], 37.9-104.9). However, there were no significant differences ($P > 0.05$) between the results obtained from penicillin-resistant and penicillin-susceptible isolates. There was also a disagreement between phenotypic and genotypic analysis to oxacillin, considering that 14.81% (4/27) of the isolates expressed phenotypic resistance (95% confidence interval [CI], 1.5-28.5), but none of them carried *mecA* and *mecC* gene. It was not

possible to perform statistical analysis of the oxacillin-resistant and oxacillin-susceptible isolates because of the absence of *mecA* and *mecC* genes.

Discussion

The frequency of 6.25% of *S. aureus* in milk samples from primiparous cows is in accordance with previous findings from related study that suggests a rate of 8% (Fox, 2009). In a similar study, *S. aureus* isolates were identified in 10% of colostrum samples from primiparous cows, suggesting that this bacterium may have a mechanism allowing it to persist in their udder during first lactation and, potentially, in subsequent lactations, permitting the transmission between primiparous and multiparous cows (Stalder et al. 2014).

Despite the role of *S. aureus* in IMIs, genotypic and phenotypic analyzes of this bacterium causing mastitis in primigravid cows are still poorly performed in Brazil (Castelani et al. 2013; Robles et al. 2014; Santiago Neto et al. 2014; Martini et al. 2017).

The occurrence of *S. aureus* in only two out of nine dairy herds may be related to the lack of hygiene during milking, with transmission from milkers' hands or teatcup liners to primiparous cows, to infections originated pre-calving, carried by flies or by direct contact with contaminated (e.g., skin or saliva) herd mates.

Overall MIC results for penicillin G and oxacillin were higher compared to previous studies (Gentilini et al., 2000; Oliveira et al., 2000; Rubin et al., 2011), which may herald an escalating evolution of *S. aureus* strains resistant to beta-lactams. Besides, oxacillin had a 14.81% (4/27) resistance rate and penicillin G had a 74.07% (20/27) resistance rate, being the highest rate among the *S. aureus* isolates.

The phenotypic and genotypic results to penicillin G agree with earlier studies (Robles et al. 2014; Yang et al. 2015) and may be related to the expression of other genes or to the existence of other resistance mechanisms. Additionally, *blaZ* gene detection does not necessarily mean

the gene has a detectable phenotype (Martini et al. 2017) and also there are mechanisms of gene inactivation (Hammad et al. 2014), by interfering with the phenotypic resistance detection.

The phenotypic and genotypic results to oxacillin are similar to another study (Ba et al. 2019) and can be explained by other resistance mechanisms. According to previous studies (Hiramatsu et al. 2013; Becker et al. 2014), a possible explanation would be the occurrence of other homologous genes and the production of other classes of Penicillin-binding proteins, or due to an overproduction of beta-lactamase (Livermore and Brown 2001). Therefore, it should be noted that three of four isolates that expressed oxacillin resistance carried out *blaZ* gene, which may justify phenotypic resistance to oxacillin.

In this perspective, the absence of *mecA* and *mecC* genes in *S. aureus* isolates from primiparous cows' milk agrees with a study performed previously (Stalder et al. 2014), thus highlighting the epidemiological importance of *blaZ* gene as an inducer of beta-lactam resistance mechanisms among *S. aureus* in the studied region.

Analysis of the results obtained in the current study indicates the spread of *S. aureus* strains resistant to beta-lactams among primiparous cows. Since there are no technical guidelines regarding the rational use of antimicrobials being applied in the dairy properties, it can be inferred that the indiscriminate use of these drugs may be the main cause for resistant *S. aureus* strains selection (Garcia et al. 2019), indicating the need of new management strategies involving the use of beta-lactam drugs. In addition, the use of beta-lactam antibiotics to treat mastitis in the northeastern region of Brazil should be discouraged and/or limited.

These findings are significant from epidemiological point of view because they emphasize the need to carry out larger studies to monitor *S. aureus* and its antimicrobial resistance in dairy herds in the northeastern region of Brazil, aiming to contribute with genetic traceability and

epidemiology of the pathogen around the country. It is also important to highlight that the data should assist the veterinary authorities to deploy proper control measures and to implement strategies for the rational use of antimicrobials.

Funding information

This research was supported by the Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), throughout project IBPG-0500-5.05/17.

References

- Adkins, P.R.F., Dufour, S., Spain, J.N., Calcutt, M.J., Reilly, T., Stewart, G.C. and Middleton, J.R., 2018. Cross-sectional study to identify staphylococcal species isolated from teat and inguinal skin of different-aged dairy heifers, *Journal of Dairy Science*, 101, 3213-3225
- Ba, X., Kalmar, L., Hadjirin, N.F., Kerschner, H., Apfalter, P., Morgan, F.J., Paterson, G.K., Girvan, S.L., Zhou, R., Harrison, E.M. and Holmes, M.A., 2019. Truncation of GdpP mediates β -lactam resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 74, 1182–1191
- Becker, K., Ballhausen, B., Köck, R. and Kriegeskorte, A., 2014. Methicillin resistance in *Staphylococcus* isolates: the ‘mec alphabet’ with specific consideration of mecC, a mec homolog associated with zoonotic *S. aureus* lineages, *International Journal of Medical Microbiology*, 304, 794-804
- Brakstad, O., Aasbakk, K. and Maeland, J.A., 1992. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the *nuc* gene, *Journal of Clinical Microbiology*, 30, 1654-1660
- Buchan, K.D., Foster, S.J. and Renshaw, S.A., 2019. *Staphylococcus aureus*: setting its sights on the human innate immune system, *Microbiology*, 165, 367-385

- 236 Castelani, L., Santos, A., Miranda, M.S., Zafalon, L., Pozzi, C. and Arcaro, J., 2013.
237 Molecular typing of mastitis-causing *Staphylococcus aureus* isolated from heifers and
238 cows, International Journal of Molecular Sciences, 14, 4326-4333
- 239 CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), 2018. Performance Standards for
240 Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty-eighth Informational Supplement M100-
241 S25, (CLSI, Wayne, USA)
- 242 Fan, H.H., Kleven, S.H. and Jackwood, M.W., 1995. Application of polymerase chain
243 reaction with arbitrary primers to strain identification of *Mycoplasma gallisepticum*,
244 Avian Diseases, 39, 729-735
- 245 Field, A., 2011. Descobrimos a estatística usando o SPSS (2th edn., Chapt.2), (Artmed, Porto
246 Alegre, Brazil)
- 247 Fox, L.K., 2009. Prevalence, incidence and risk factors of heifer mastitis, Veterinary
248 Microbiology, 134, 82-88
- 249 Garcia, S.N., Osburn, B.I. and Cullor, J.S., 2019. A one health perspective on dairy
250 production and dairy food safety, One Health, 100086
- 251 Gentilini, E., Denamiel, G., Llorente, P., Godaly, S., Rebuelto, M. and DeGregorio, O., 2000.
252 Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in
253 Argentina, Journal of Dairy Science, 83, 1224-1227
- 254 Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis
255 program for Windows 95/98/NT, Nucleic Acids Symposium Series, 41, 95-98
- 256 Hammad, A.M., Shimamoto, T. and Shimamoto, T., 2014. Genetic characterization of
257 antibiotic resistance and virulence factors in *Enterococcus* spp. from Japanese retail ready
258 to- eat raw fish, Food Microbiology, 38, 62–66
- 259 Hiramatsu, K., 2013. Genomic basis for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*,
260 Infection & Chemotherapy. 45, 117-136

- 261 Kateete, D.P., Kimani, C.N., Katabazi, F.A., Okeng, A., Okee, M.S., Nanteza, A., Joloba,
 262 M.L. and Najjuka, F.C., 2010. Identification of *Staphylococcus aureus*: DNase and
 263 Mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test, *Annals of Clinical*
 264 *Microbiology and Antimicrobials*, 9, 23–29.
- 265 Laboratory handbook on bovine mastitis, 1999. Laboratory handbook on bovine mastitis,
 266 (National Mastitis Council, Madison, USA)
- 267 Laffranchi, A., Muller, E.E., Freitas, J.C., Giordano, L.G.P., Dias, J.A. and Salvador, R, 2001.
 268 Etiologia das infecções intramamárias em vacas primíparas ao longo dos primeiros quatro
 269 meses de lactação, *Ciência Rural*, 31, 1027-1032
- 270 Livermore, D.M. and Brown, D.F., 2001. Detection of beta-lactamase-mediated resistance,
 271 *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48, 59-64
- 272 Martini, C.L., Lange, C.C., Brito, M.A., Ribeiro, J.B., Mendonça, L.C. and Vaz, E.K., 2017.
 273 Characterisation of penicillin and tetracycline resistance in *Staphylococcus aureus*
 274 isolated from bovine milk samples in Minas Gerais, Brazil, *Journal of Dairy Research*,
 275 84, 202-205
- 276 Nakagawa, T., Shimizu, S., Watanabe, T., Yamaguchi, O., Otsu, K., Yamagata, H., Inohara,
 277 H., Kubo, T. and Tsujimoto, Y., 2005. Cyclophilin D-dependent mitochondrial
 278 permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death, *Nature*, 434,
 279 652-658
- 280 NMC (National Mastitis Council), (2011). Recommended mastitis control program, (Natl.
 281 Mastitis Counc. Inc., Verona, USA)
- 282 Oliveira, A.P., Watts, J.L., Salmon, S.A. and Aarestrup, F.M., 2000. Antimicrobial
 283 susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Europe and the
 284 United States, *Journal of Dairy Science*, 83, 855-862

- 285 Paterson, G.K., Larsen, A.R., Robb, A., Edwards, G.E., Pennycott, T.W., Foster, G., Mot, D.,
 286 Hermans, K., Baert, K., Peacock, S.J., Parkhill, J., Zadoks, R.N. and Holmes, M.A.,
 287 2012. The newly described *mecA* homologue, *mecALGA251*, is present in methicillin-
 288 resistant *Staphylococcus aureus* isolates from a diverse range of host species, Journal of
 289 Antimicrobial Chemotherapy, 67, 2809–2813
- 290 Pitkälä, A., Salmikivi, L., Bredbacka, P., Myllyniemi, A.L. and Koskinen, M.T., 2007.
 291 Comparison of tests for detection of β -lactamase-producing staphylococci, Journal of
 292 Clinical Microbiology, 45, 2031-2033
- 293 Robles, B.F., Nóbrega, D.B., Guimarães, F.F., Wanderley, G.G. and Langoni, H., 2014. Beta-
 294 lactamase detection in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus*
 295 isolated from bovine mastitis, Pesquisa Veterinária Brasileira, 34, 325-328
- 296 Rubin, J.E., Ball, K.R. and Chirino-Trejo, M., 2011. Antimicrobial susceptibility of
 297 *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from various
 298 animals, The Canadian Veterinary Journal, 52, 153
- 299 Sampaio, I.B.M., 2002. Estatística aplicada à experimentação animal. Belo Horizonte:
 300 Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 265p
- 301 Santiago Neto, W., Machado, G., Paim, D.S., Campos, T.D., Brito, M.A.V., Cardoso,
 302 M.R.D.I. and Corbellini, L.G., 2014. Relação da idade na presença de bactérias
 303 resistentes a antimicrobianos em rebanhos leiteiros no Rio Grande do Sul. Pesquisa
 304 Veterinária Brasileira, 34, 613-620
- 305 Stalder, U., Stephan, R., Corti, S., Bludau, M., Maeschli, A., Klocke, P. and Johler, S., 2014.
 306 Short communication: *Staphylococcus aureus* isolated from colostrum of dairy heifers
 307 represent a closely related group exhibiting highly homogeneous genomic and
 308 antimicrobial resistance features, Journal of Dairy Science, 97, 4997-5000

- 309 Sawant, A.A., Gillespie, B.E. and Oliver, S.P., 2009. Antimicrobial susceptibility of
310 coagulase-negative *Staphylococcus* species isolated from bovine milk, Veterinary
311 Microbiology, 134, 73-81
- 312 Yang, F.L., Shen, C., He, B.X., Yang, Y.Y. and Li, X.S., 2015. The prevalence of heifer
313 mastitis and its associated risk factors in Huanggang, Central China, Tropical Animal
314 Health and Production, 47, 87–92

CAPÍTULO 2

Genetic traceability of *Staphylococcus aureus* strains isolated from primiparous dairy cows mastitis, humans and environment in the Northeast region of Brazil

(Manuscrito submetido ao periódico Journal of Dairy Research)

Genetic traceability of *Staphylococcus aureus* strains isolated from primiparous dairy cows mastitis, humans and environment in the Northeast region of Brazil

Summary

This Research Communication aimed to investigate the genotypic relatedness of 18 *Staphylococcus (S.) aureus* strains isolated from intramammary infections in primiparous cows and extramammary sites on five dairy herds by repetitive extragenic palindromic polymerase chain reaction (rep-PCR) using RW3A primers, and by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) using the endonuclease *SmaI*. The isolates were also evaluated *in vitro* for the susceptibility against beta-lactam antimicrobials drugs (penicillin and oxacillin), considering that beta-lactams are frequently used for treating staphylococcal intramammary infections. The rep-PCR typing was highly discriminatory (D value= 0.9804) and a total of 15 patterns were detected. The *S. aureus* isolates were grouped in three different clusters (A to C) at 80% similarity. The PFGE method was also highly discriminatory (D value= 0.9667) and a total of 13 patterns were observed. The dendrogram analysis with an 80% similarity coefficient generated two different clusters (A and B). Also, clonally-related strains isolated from milk were identified at the same farm (Farm 1) by both typing methods, and despite the presence of dominant strains, our results suggest a high genetic diversity of *S. aureus* strains exist at the farms. A total of 15 out of 18 (83%) isolates were resistant to penicillin and one out of 18 (6%) to oxacillin. A better knowledge of antimicrobial drug-resistant *S. aureus* strains distribution in dairy herds might help in formulating strategies to control the intramammary infections. Furthermore, knowing the dynamics of resistant strains of *S. aureus* should be used as guide to select effective drugs for the therapy of intramammary infections and to prevent the spread of these strains.

Keywords: staphylococcal intramammary infection, DNA fingerprinting, drug resistance, beta-lactam, heifer.

Primiparous dairy cows are of key significance for every dairy herd as their mammary gland health status will directly impact the longevity of the animals and herd productivity. Despite of the common sense that they are not susceptible to intramammary infections (IMIs), an increasing number of recent studies have reported cases of mastitis in primiparous cows, mainly attributed to *Staphylococcus* spp (Anderson et al., 2012; Stalder et al., 2014; Baştan et al., 2015).

There are still a lot of uncertainties about the epidemiology of these IMIs and *Staphylococcus* (*S.*) *aureus* has been considered an important contagious agent transmitted among lactating animals (Baştan et al., 2015). However, recent researches suggest humans and environment as potential sources of *S. aureus* causing mastitis in dairy heifers (Anderson et al., 2012; Stalder et al., 2014).

Furthermore, emerging antimicrobial resistance in *S. aureus* has posed a serious problem to the treatment of mastitis in dairy herds (Dias et al., 2015) and antimicrobial-resistant *Staphylococcus* can serve as reservoirs of antimicrobial resistant genes (Anderson et al., 2012) with implications in public health.

Considering the important role of *Staphylococcus aureus* on the mastitis etiology in primiparous cows, the objective of this study was to investigate the genotypic relatedness of *S. aureus* isolates causing IMIs in dairy heifers and extramammary sites on five dairy herds located in the dairy region of Pernambuco state, Brazil.

Materials and Methods

The experimental procedures were approved by the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA) of Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE), Recife, Brazil (License No. 037/2018) and to the Human Research Ethics Committee at University of Pernambuco (UPE), Recife, Brazil (License No. 88030518.0.0000.5207).

Bacterial isolates

A total of 18 *S. aureus* strains were collected from five dairy farms (Table 1), named Farm 1 (n=12), Farm 2 (n=1), Farm 3 (n=1), Farm 4 (n=2) and Farm 5 (n=2), located in the dairy region of Pernambuco state, Northeastern Brazil. The isolates were obtained from milk of primiparous dairy cows with subclinical mastitis, teat swabs, milking utensils, human hand

and human nostrils, between 2018-2019. All *S. aureus* strains were stored frozen in glycerinated BHI (Brain Heart Infusion) broth at -20°C at the Laboratory of Infectious Diseases (LDIC) – UFRPE.

Table 1. Frequency of *Staphylococcus aureus* in different sample sources taken from five dairy herds in Pernambuco state, Northeastern Brazil

Sample source	Farm 1	Farm 2	Farm 3	Farm 4	Farm 5	Total
Milk	11	-	-	1	-	12
Teat swab	1	-	-	-	-	1
Milking utensils	-	-	-	1	-	1
Human hand	-	-	-	-	1	1
Human nostril	-	1	1	-	1	3

Confirmation of Staphylococcus aureus

Species confirmation was achieved by Polymerase Chain Reaction (PCR) for amplification of the *nuc* gene (Kateete et al., 2010) using ATCC® 43300 *S. aureus* subspecies *aureus* strain as a positive control and DNA Free Water (QIAGEN, Hilden, Germany) as a negative control. DNA extraction was conducted using the heat treatment of bacteria according to Fan et al., (1995). Subsequently, DNA concentration and purity were assessed using a spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) with absorbance at 260nm (Brakstad et al., 1992).

Polymerase Chain Reaction (PCR) testing for beta-lactam resistance genes

PCR was performed for the amplification of *blaZ* gene, which encodes beta-lactamases, as previously described by Sawant et al. (2009) and *mecA* and *mecC* genes, which are inducers of the beta-lactam site of action modification, according to Nakagawa et al. (2005) and Paterson et al. (2012), respectively.

Beta-lactam susceptibility test

Antimicrobial susceptibility testing against penicillin and oxacillin was performed by broth microdilution according to CLSI (2018) and the results expressed in minimum inhibitory concentration (MIC). The isolates were then categorized as susceptible, intermediate and resistant based upon interpretative criteria developed by the National Committee of Clinical Laboratory Standards. The ATCC® 43300 *S. aureus* subspecies *aureus* strain was used as a recommended quality control reference organism to be run with each group of unknowns.

DNA fingerprinting by rep-PCR

Genomic DNA was extracted according to Sambrook et al. (1989) and repetitive extragenic palindromic polymerase chain reaction (rep-PCR) assay using the RW3A primer was carried out as described by Van der Zee et al. (1999) to investigate the genotypic relatedness of the *S. aureus* isolates from different sources. The PCR pattern analysis was performed as described by Van der Zee et al. (1999). Dendrograms was built by an unweighted pair group method with arithmetic mean clustering algorithm (UPGMA) and the genetic similarity between isolates was calculated using the Jaccard's coefficient (1% tolerance), using BioNumerics software (Version 7.1, Applied Maths, Belgium). A *S. aureus* strain from United States and an *E. coli* strain were used for outgrouping purposes.

DNA fingerprinting by PFGE

Genomic DNA from 2 ml of overnight cultures was prepared in low-melting-point agarose plugs as described by André et al. (2008), and digested with the endonuclease *SmaI* (New England Biolabs, France) according to the manufacturer's instructions. The PFGE pattern analysis was performed as described by Tenover et al. (1995). Dendrograms was built by an unweighted pair group method with arithmetic mean clustering algorithm (UPGMA) and the genetic similarity between isolates was calculated using the Dice's coefficient (5% tolerance), using BioNumerics software (Version 7.1, Applied Maths, Belgium).

Discriminatory power of the typing methods

The discriminatory power was assessed using the Simpson's index of diversity (*D*) that indicates the average probability that a typing system will assign a different type to two unrelated strains randomly sampled from a population (Hunter, 1990).

Results and Discussion

In this study, all 18 isolates were confirmed to be *S. aureus* by PCR for *nuc* gene and the presence of the *blaZ* gene was detected in 100% (18/18) of them; however, *mecA* and *mecC* were not detected among the isolates.

Considering the antimicrobial susceptibility testing results, approximately eighty three percent (15/18) of the strains were resistant to penicillin and six percent (1/18) to oxacillin.

The detection of *blaZ* gene in all *S. aureus* isolates was mostly compatible to the phenotypic resistance profiles of penicillin and this usually occurs due to beta-lactamases action, whose production is induced by *blaZ* gene (Dias et al., 2015).

The identification of one *S. aureus* isolate (from milk sample) showing phenotypic resistance to oxacillin and lacking both *mecA* and *mecC* genes could be explained by other resistance mechanisms, such as the occurrence of putative homologous genes, or due to a beta-lactamase hyperproduction.

Also, the high occurrence of *blaZ* gene is in agreement with a study conducted by Krewer et al. (2015) in the Brazilian Northeast region, strongly suggesting its great epidemiological importance as a mechanism of beta-lactam resistance in staphylococci in dairy herds.

The genetic relationship of the 18 *S. aureus* strains was assessed by both rep-PCR and PFGE analysis. Based on the cluster analysis, these strains were genetically diverse and heterogeneous. This is in concordance with previous studies that showed high genetic diversity among *S. aureus* strains from animals, environment and humans (Smith, 2015; Kümmel et al., 2016; Papadopoulos et al., 2018).

The rep-PCR method was highly discriminatory (D value= 0.9804) and a total of 15 patterns were observed. The *S. aureus* isolates were grouped in three different clusters (A to C) at 80% similarity (Figure 1). The isolates from human origin were not related to those from animal and environmental sources. At a 100% similarity level, most of the isolates showed unique genotypic patterns and only three clusters (I to III) containing clonal isolates were identified. A highly diversity of genotypic patterns were observed among isolates within the same farm.

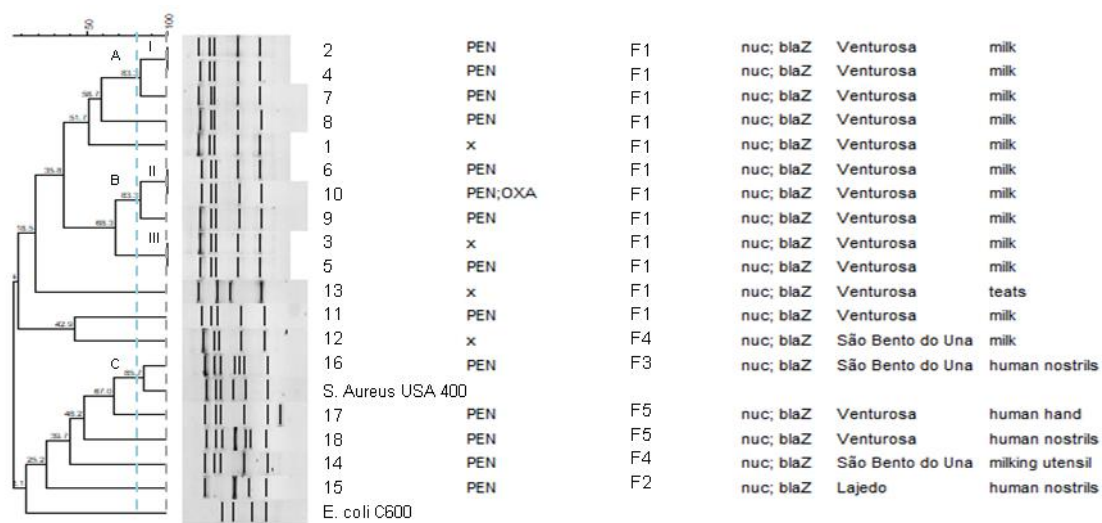


Figure 1. Dendrogram showing the genotypic relatedness of 18 *Staphylococcus aureus* isolated from different sources in five dairy herds in Pernambuco State, Northeastern Brazil,

which shows three clusters (A-C) at 80% similarity among the band profiles. Dendrogram was built based on the unweighted pair group method with arithmetic mean clustering algorithm (UPGMA) and genetic similarity using the Jaccard's coefficient (1% tolerance) of the genotypic band patterns generated by repetitive extragenic palindromic polymerase chain reaction (rep-PCR) using the RW3A primer.

By PFGE, using *SmaI* as the restriction enzyme, samples 15 and 18, both from human nostrils, could not be lysed. These isolates were therefore excluded from the analysis. Furthermore, the PFGE method was highly discriminatory (D value= 0.9667) and a total of 13 patterns were observed. The dendrogram analysis with an 80% similarity coefficient generated two different clusters (A and B), all from Farm 1 (Figure 2). At a 100% similarity level, most of the isolates showed unique genotypic patterns and only two pulsotypes (I and II) containing clonal isolates were identified. The majority of the strains were grouped in pulsotype I. A highly diversity of genotypic patterns were observed among isolates within the same farm, in agreement with the results obtained by rep-PCR.

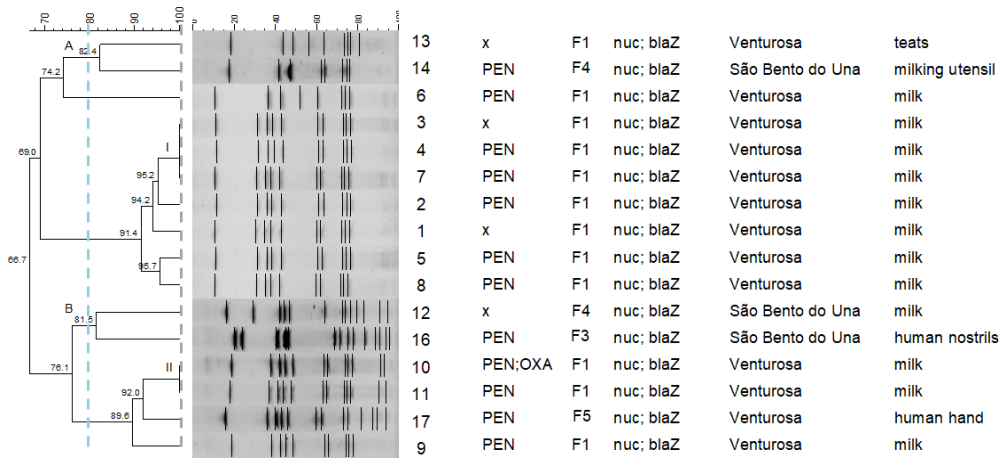


Figure 2. Dendrogram showing the genotypic relatedness of 16 *Staphylococcus aureus* isolated from different sources in five dairy herds in Pernambuco State, Northeastern Brazil, which shows two clusters (A-B) at 80% similarity among the band profiles. Dendrogram was built based on the unweighted pair group method with arithmetic mean clustering algorithm (UPGMA) and genetic similarity using the Dice's coefficient (5% tolerance) of the genotypic band patterns generated by pulsed-field gel eletrophoresis (PFGE) using the restriction enzyme *SmaI*.

Interestingly, both molecular typing methods demonstrated quite different genotypic profiles between human and milk samples. Additionally, there was no isolation of *S. aureus* in human sources in the farms with higher mastitis index, and there were no cases of heifer mastitis in the farms with higher isolation of *S. aureus* in human sources. Hence, *S. aureus* isolates associated with heifer mastitis were not of human origin.

Also, clonally-related strains isolated from milk were identified at the same farm (Farm 1) by both typing methods, and despite the presence of dominant strains, our results suggest a high genetic diversity of *S. aureus* strains exist at the farms.

No agreement between antimicrobial patterns, rep-profiles and PFGE-profiles was observed for the majority of the isolates. Therefore, beta-lactam resistance patterns alone were found to be of limited value in differentiating closely related strains.

These findings revealed a significant diversity within the strain collection using rep-PCR and PFGE typing methods. Thus, the rep-PCR technique is a useful method for the epidemiologic characterization of *S. aureus*, the results being comparable to those obtained with the PFGE technique, both with a high discriminatory power. Also, both methods are powerful tools for confirmation of a specific *S. aureus* clone responsible for mastitis. In addition, rep-PCR could be used for screening due to its practicality and reproducibility.

This report clearly demonstrates that detailed knowledge on the epidemiology of intramammary infections in primiparous cows caused by *S. aureus* might help in creating new approaches to reduce infection spread. Also, a better knowledge of drug-resistant *S. aureus* strains distribution in dairy herds might help in formulating strategies to control of infection. Furthermore, knowing the dynamics of resistant strains of *S. aureus* should be used as guide to select effective drugs for the therapy of intramammary infections and to prevent the spread of these strains.

References

- André, MCDPB, Campos, MRH, Borges, LJ, Kipnis, A, Pimenta FC & Serafini ÁB 2008 Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from food handlers, raw bovine milk and Minas Frescal cheese by antibiogram and pulsed-field gel electrophoresis following SmaI digestion. *Food Control* **19** 200–207
- Anderson, KL, Lyman, R, Moury, K, Ray, D, Watson DW & Correa MT 2012 Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy heifers. *Journal of Dairy Science* **95** 4921–4930

- Baştan, A, Salar, S, Cengiz, M, Darbaz, I, Demirel MA & Özen D 2015 The prediction of the prevalence and risk factors for subclinical heifer mastitis in Turkish dairy farms. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* **39** 682–687
- Brakstad, OG, Aasbakk K & Maeland JA 1992 Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the nuc gene. *Journal of Clinical Microbiology* **30** 1654-1660
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2015 *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Twenty-Fifth Informational Supplement, M100-S25*. Pennsylvania, USA: CLSI
- Dias, APM, Pinheiro MG & Aguiar-Alves F 2015 Clinical characteristics, resistance and virulence factors in *Staphylococcus aureus*. *Acta Scientiarum Technology* **3** 9-23
- Fan, HH, Kleven SH & Jackwood MW 1995 Application of polymerase chain reaction with arbitrary primers to strain identification of *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Diseases* **39** 729-735
- Hunter P 1990 Reproducibility and indices of discriminatory power of microbial typing methods. *Journal of Clinical Microbiology* **28** 1903-1905
- Kateete, DP, Kimani, CN, Katabazi, FA, Okeng, A, Okee, MS, Nanteza, A, Joloba ML & Najjuka FC 2010 Identification of *Staphylococcus aureus*: DNase and Mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* **9** 23–29
- Krewer, CC, Amanso, ES, Gouveia, GV, Souza, RL, Costa MM & Mota RA 2015 Resistance to antimicrobials and biofilm formation in *Staphylococcus* spp. isolated from bovine mastitis in the Northeast of Brazil. *Tropical animal health and production* **47** 511-518
- Kümmel, J, Stessl, B, Gonano, M, Walcher, G, Bereuter, O, Fricker, M, Grunert, T, Wagner M & Ehling-Schulz M 2016 *Staphylococcus aureus* entrance into the dairy chain: tracking *S. aureus* from dairy cow to cheese. *Frontiers in microbiology* **7** 1603
- Nakagawa, T, Shimizu, S, Watanabe, T, Yamaguchi, O, Otsu, K, Yamagata, H, Inohara, H, Kubo T & Tsujimoto Y 2005 Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature* **434** 652-658
- Papadopoulos, P, Papadopoulos, T, Angelidis, AS, Boukouvala, E, Zdragas, A, Papa, A, Hadjichristodoulou C & Sergelidis D 2018 Prevalence of *Staphylococcus aureus* and of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) along the production chain of dairy products in north-western Greece. *Food microbiology* **69** 43-50

- Paterson, GK, Larsen, AR, Robb, A, Edwards, GE, Pennycott, TW, Foster, G, Mot, D, Hermans, K, Baert, K, Peacock, SJ, Parkhill, J, Zadoks RN & Holmes MA 2012 The newly described *mecA* homologue, *mecALGA251*, is present in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from a diverse range of host species. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **67** 2809-2813
- Sambrook, J, Fritsch EF & Maniatis T 1989 Extraction and purification of plasmid DNA *Molecular cloning: a laboratory manual*. **1** 21-152
- Stalder, U, Stephan, R., Corti, S, Bludau, M, Maeschli, A, Klocke P & Johler S 2014 Short communication: *Staphylococcus aureus* isolated from colostrum of dairy heifers represent a closely related group exhibiting highly homogeneous genomic and antimicrobial resistance features. *Journal of Dairy Science*. **97** 4997-5000
- Sawant, A, Gillespie BE & Oliver SP 2009 Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative *Staphylococcus* species isolated from bovine milk. *Veterinary Microbiology* **134** 73-81
- Smith TC 2015 Livestock-associated *Staphylococcus aureus*: the United States experience. *PLoS pathogens* **11** e1004564.
- Tenover, FC, Arbeit, RD, Goering, RV, Mickelsen, PA, Murray, BE, Persing DH & Swaminathan B 1995 Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by PFGE: criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology* **33** 2233
- Van der Zee, A, Verbakel, H, van Zon, JC, Frenay, I, van Belkum, A, Peeters, M, Buiting A & Bergmans A 1999 Molecular genotyping of *Staphylococcus aureus* strains: comparison of repetitive element sequence-based PCR with various typing methods and isolation of a novel epidemicity marker. *Journal of Clinical Microbiology* **37** 342-349.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos nesse estudo a partir da avaliação da rastreabilidade genética e do perfil de resistência a beta-lactâmicos de cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite em vacas primíparas, ambiente de ordenha e ordenhadores no estado de Pernambuco permitem concluir que:

- A espécie *Staphylococcus aureus* possui um importante papel na epidemiologia da mastite em vacas primíparas no estado de Pernambuco;
- Níveis significativos de resistência a beta-lactâmicos estão presentes entre cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas em Pernambuco;
- A elevada ocorrência do gene *blaZ* indica que a produção de beta-lactamase pode ser a principal estratégia de resistência aos betalactâmicos nesses microrganismos;
- A ausência dos genes *mecA* e *mecC*, mesmo havendo isolados fenotipicamente resistentes à oxacilina, sugere que outros mecanismos de resistência estejam envolvidos, tais como: ocorrência de outros genes homólogos, produção de outras classes de proteínas ligadoras de penicilina, ou hiperprodução de beta-lactamases;
- O isolamento de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a beta-lactâmicos em amostras de vacas primíparas, ambiente (utensílios) e ordenhadores sugere a disseminação desses microrganismos no ambiente de ordenha, o que pode resultar na transmissão entre ordenhadores e animais, bem como na contaminação ambiental;
- Há uma alta diversidade genética entre as cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas em Pernambuco;
- O perfil de resistência fenotípica e genotípica a beta-lactâmicos dos isolados de *Staphylococcus aureus* tem valor limitado na diferenciação clonal de cepas;
- As técnicas de rep-PCR e PFGE são ferramentas de alto poder discriminatório para a identificação de cepas clonais de *Staphylococcus aureus* isoladas em Pernambuco.

De modo geral, esses resultados corroboram para as preocupações atuais de Saúde Única (saúde animal, humana e ambiental), tornando-se evidente a

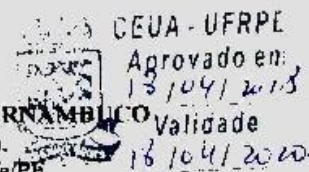
necessidade de estudos mais detalhados acerca da epidemiologia da mastite em vacas primíparas causadas por *S. aureus*, visando reduzir o risco de disseminação de cepas resistentes no ambiente agropecuário e permitir a formulação de novas estratégias de tratamento, prevenção e controle da doença. Sendo assim, recomenda-se a conscientização dos ordenhadores acerca da importância da higiene pessoal e do ambiente de ordenha, o uso racional de antimicrobianos e a escolha de drogas antimicrobianas apenas após a realização de testes de sensibilidade *in vitro*, diminuindo a possibilidade de seleção de *S. aureus* resistentes.

ANEXOS

ANEXO A – Parecer de aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRPE.



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n.
Dois Irmãos - CEP: 52171-900 - Recife/PE



Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA – B-15 Licença condicional para o uso de animais em experimentação e/ou ensino

A Comissão de ética no uso de animais CEUA da Universidade Federal Rural de Pernambuco, no uso de suas atribuições, autoriza a execução do projeto discriminado abaixo. O presente projeto também se encontra de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11794/2008.

Número da licença	037/2018
Número do processo	23082.006410/2018-34
Data de emissão da licença	18 de abril de 2018
Título do Projeto	“Rastreabilidade genética e detecção da resistência antimicrobiana de <i>Staphylococcus aureus</i> isolados de casos de mastite em vacas primíparas de propriedades leiteiras no Estado de Pernambuco, Brasil”.
Finalidade (Ensino, Pesquisa, Extensão)	Pesquisa
Responsável pela execução do projeto	Rinaldo Aparecido Mota
Colaboradores	Amanda Thaís Ferreira Silva; Rodolfo de Moraes Peixoto; José Givanildo da Silva; Breno Bezerra Aragão;; Renata Pimentel Bandeira de Melo; Raylson Pereira de Oliveira.
Tipo de animal e quantidade total autorizada	Espécie: Bovino Quantidade: 50 fêmeas. Total: 50.

Profª Drª Marleyne Amorim
Presidente CEUA/UFRPE
SIAPE 384977


Profª. Dra. Marleyne José Afonso Accioly Lins Amorim
(Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA /UFRPE)

ANEXO B – Parecer de aprovação No Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da UFPE

UNIVERSIDADE DE PERNAMBUCO/ PROPEGE/ 
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA Título da Pesquisa: Rastreabilidade genética e detecção de resistência antimicrobiana de <i>Staphylococcus aureus</i> isolados de casos de mastite em vacas primíparas Pesquisador: Rinaldo Aparecido Mota Área Temática: Versão: 2 CAAE: 88030518.0.0000.5207 Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO Patrocinador Principal: Financiamento Próprio
DADOS DO PARECER Número do Parecer: 2.701.194
Apresentação do Projeto: Segundo o proponente, o Projeto de pesquisa submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco e ao Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal de Pernambuco. A amostragem utilizada neste estudo será do tipo não probabilística por conveniência. No corpo do projeto é informada a quantidade de pessoas que participarão da amostra (dez). A metodologia utilizada nos humanos (ordenhadores) será de aplicação de questionários epidemiológicos e coleta de material biológico (swabs estéreis friccionados nas palmas das mãos e fossas nasais dos funcionários de ordenha). Quanto a coleta do material, o autor informa que nesta etapa o projeto não oferece risco aos seus participantes e essas etapas não irão causar dor, desconforto e nem ansiedade nos funcionários avaliados. Ainda informa que com relação à aplicação dos questionários, alguns participantes podem se sentir constrangidos no repasse de informações. Caso isto ocorra, a equipe atuará para minimizar desconfortos, garantindo local reservado e liberdade para não responder questões constrangedoras.
Objetivo da Pesquisa: Segundo o autor, o objetivo geral da pesquisa é: "Rastrear geneticamente <i>Staphylococcus aureus</i> e detectar sua resistência antimicrobiana na cadeia produtiva de leite em vacas primíparas em propriedades leiteiras no Estado de Pernambuco." E os objetivos específicos são: - Isolar e identificar <i>Staphylococcus aureus</i> em amostras de leite oriundas dos quartos mamários de vacas primíparas com mastite, dos ordenhadores, utensílios e da água utilizada para lavagem dos tetos e das teieiras; - Avaliar a resistência a meticilina em isolados de <i>S. aureus</i> pela técnica de concentração inibitória mínima; - Detectar os genes <i>mecA</i> e <i>mecC</i> responsáveis pela resistência à meticilina em cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> , isoladas em amostras de leite oriundas dos quartos mamários com mastite, dos ordenhadores, utensílios e da água utilizada para lavagem dos tetos e das teieiras; - Tipificar geneticamente os isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> da cadeia produtiva de leite em vacas primíparas com mastite. - Realizar o rastreamento genético dos isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> da cadeia produtiva de leite em vacas primíparas com mastite.
Avaliação dos Riscos e Benefícios: Riscos. Com relação à aplicação dos questionários, alguns participantes podem se sentir constrangidos no repasse de informações. Não é informando quais medidas protetivas para evitar os riscos serão tomadas. Benefícios. Esperasse contribuir para a epidemiologia da mastite bovina no estado de Pernambuco e fornecer dados para fomentar novas medidas de controle e prevenção desta enfermidade
Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: Pesquisa relevante. Contemporânea e bem aplicável a sociedade. Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: Todos apresentados Recomendações: Não há. Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Projeto aprovado Considerações Finais a critério do CEP: O pleno acompanha o parecer do relator.
Endereço: Av. Agamenon Magalhães, s/nº Bairro: Santo Amaro CEP: 50.100-010 UF: PE Município: RECIFE Telefone: (81)3183-3775 Fax: (81)3183-3775 E-mail: comite.etica@ufpe.br

ANEXO C – Comprovante de publicação do manuscrito intitulado “Occurrence of β -lactam-resistant *Staphylococcus aureus* in milk from primiparous dairy cows in the northeastern region of Brazil”



Online First: your article is published

2020-03-08

Congratulations

Dear Amanda Silva,

We are pleased to inform you that your article has just been published:

Title

Occurrence of β -lactam-resistant *Staphylococcus aureus* in milk from primiparous dairy cows in the northeastern region of Brazil

Journal

Tropical Animal Health and Production, (), 1-5

DOI

10.1007/s11250-020-02259-w



ANEXO D – Normas de submissão de manuscrito no periódico Tropical Animal Health and Production

GUIDE FOR AUTHORS

Tropical Animal Health and Production, Editorial Office
PO Box 55
Lancaster, LA1 1PE, UK

Typescript

- Typescripts should be in English. Authors whose mother tongue or lingua franca is not English are advised to seek the advice of an English-speaking colleague before submitting their article.
- Submit one original and, if possible, two copies. Enclose the original illustrations and, if possible, two sets of photocopies (3 prints of any photographs). Authors are strongly advised to retain copies of the text and illustrations, as they may not be returned.
- Articles should be typed on one side of the paper with wide margins and double spacing throughout, including abstracts, footnotes and references. Every page, including the title page, references, tables, etc., should be numbered in the upper right-hand corner. No reference should be made in the text to page numbers; if necessary, refer to sections instead. The senior author's surname should be typed in the upper left-hand corner of each page. Computer-printed scripts must be of at least letter quality.
- Electronic files should be included, in Word, WordPerfect or RTF. However the hard copy version will always be taken as definitive, and should contain print-outs of all figures, tables, etc.
- Articles should normally be organized in the following order:
 - Title page – which should comprise:
 - Title – which should be clear, descriptive and concise
 - Name(s) of author(s)
 - Affiliation(s)
 - Present address(es) of author(s)
 - Complete correspondence address to which the proofs should be sent
 - Keywords – up to six words in alphabetical order and suitable for indexing
 - Abstract (excluded from Short Communications)
 - Abbreviations – arranged alphabetically but including only those which are not in common use (e.g. excluding SI units). The decision as to which abbreviations to include within this list will finally lie with the editorial staff.
 - Introduction
 - Materials and methods
 - Results
 - Discussion
 - Conclusion – only if strictly necessary
 - Acknowledgements – including information on grants, support, etc.
 - References
 - Tables
 - Figure captions
- Titles and subtitles should not be run within the text. They should be typed on a separate line, without indentation.
- Système Internationale (SI) units should be used.
- Indications should always be given of the variability of the data – e.g. standard deviations.
- Underline only words that should be in italics. Avoid use of underlining to emphasise part of the text.
- If a special instruction to the copy editor or typesetter is written on the copy it should be encircled to indicate that the enclosed matter is not to be included in the text. When a typed character may have more than one meaning (e.g. the lower-case letter l may be confused with the number 1), a note should be inserted in a circle in the margin to make the meaning clear. If Greek letters or uncommon symbols are used, they should be written very clearly, and if necessary a note such as 'Greek lower-case chi' should be put in the margin and encircled.
- Tropical Animal Health and Production* reserves the right of returning to the author for revision any accepted typescripts and illustrations which are not in the form given in this guide.

Abstracts

- The abstract should be clear, descriptive and not longer than 200 words.
- The abstract should begin with the bibliographic entry by which the paper will be referenced.
- The bibliographic entry but no abstract will be included in Short Communications.

Tables

1. The same data should not be given more than once – i.e. it should not appear in both text and tables, or in both figures and tables. Adopt the most concise approach.
2. Authors should take account of the limitations set by the size and lay-out of the journal. Wide tables should be avoided. Interchanging columns and rows will often reduce the width of a table and allow it to be read without rotating the page.
3. Extensive data should be divided over two or more tables.
4. Tables should be numbered in Roman numerals according to their sequence in the text. Every table must be mentioned in the text.
5. Table footnotes should be indicated by superscript letters a, b, c etc.
6. Each table, together with a brief title, should be typed on a separate page and not included in the text.
7. Column headings should be brief but sufficiently explanatory. Standard abbreviations of units of measurement should be added between parentheses.
8. Vertical lines should not be used between columns. Leave some extra space instead.
9. Any explanation essential for understanding the table should be given as a footnote below the table.

Figures

1. The same data should not be given more than once – i.e. it should not appear in both text and figures, or in both figures and tables. Adopt the most concise approach.
2. Where appropriate, indications of the variability of the data should be given (e.g. standard error bars).
3. All figures (line drawings and photographs) should be submitted separately, unmounted and not folded. Glossy prints, laserprints or very high quality photocopies of line drawings are acceptable.
4. Figures should be numbered in Arabic numerals according to their sequence in the text. Reference must be made in the text to each figure.
5. Each figure should be identified on the reverse by its number and the name(s) of the author(s). An indication of the top of the figure should be given in all cases where doubt could arise.
6. Figures should be designed with the format of the page of the journal in mind.
7. Lettering on figures should be in black ink or applied by transfer. Make sure that the size of the lettering is big enough to allow for any reduction necessary to fit on the page. The height of capital letters should not be less than 2 mm after reduction. The lettering should be in English. Use the same kind of lettering throughout.
8. If a scale is needed for a figure, use a bar scale rather than a numerical scale that would need to be recalculated and changed after reduction.
9. Each figure should have a caption which should be self-explanatory without reference to the text. The captions should be typed on a separate sheet.
10. Drawn text on the figures should be kept to a minimum.
11. Photographs are only acceptable if they have good contrast and intensity. Sharp and glossy copies are required. Reproductions of photographs already printed cannot be accepted.
12. Colour illustrations cannot usually be included, unless the cost of their reproduction is paid for by the author.
13. Computer-generated figures must be of high quality, equivalent to that of competently drawn artwork.
14. Electronic versions of figures may be submitted as TIFF, EPS or JPEG files on 1.44MB floppy disc, ZIP disc or CD. A printout *must* also be enclosed.

References

1. All publications cited in the text should be presented in the list of references. The typescript should be carefully checked to ensure that the spelling of the authors' names and dates are exactly the same as in the reference list.
2. In the text, refer to the author's name (without initial) and year of publication, followed, if necessary, by a short reference to appropriate pages.
Examples: 'Peters (1985) has shown that'
'This is in agreement with results obtained later (Kramer, 1984, pp. 12–16)'
3. If reference is made in the text to a publication by three or more authors, the abbreviation *et al.* should be used. *All* names should be given in the list of references.
4. References cited together in the text should be arranged chronologically. The list of references should be arranged alphabetically by authors' surname(s) and chronologically by author. If an author in the list is also mentioned with co-authors the following order should be used: publications by the single author, arranged according to publication dates; publications of the same author with co-authors. Publications by the same author(s) in the same year should be listed as 1986a, 1986b, etc.
5. Use the following system for arranging each reference in the list:

ANEXO E – Comprovante de submissão do manuscrito intitulado “Genetic traceability of *Staphylococcus aureus* strains isolated from primiparous dairy cows mastitis, humans and environment in the Northeast region of Brazil”

15/01/2020

Submission Acknowledgement - Journal of dairy research



Thank you!

Thank you for submitting your research to the [Journal of Dairy Research](#)

Our office is not staffed every day, and we do not send autoreply emails.

Please do not resubmit; if you can see this page, we can see your manuscript!

Further acknowledgement should follow in a few days, but can take up to a week.

If you wish to add a Supplementary File, please do that now using [this link](#)

The purpose of a Supplementary File is to publish additional data, detailed materials and methods etc in support of the main manuscript.

We do NOT require a covering letter or any other justification statements apart from those already supplied with the submission. Please do not use the Supplementary File option for anything other than the intended purpose.

ANEXO F – Normas de submissão de manuscrito no periódico Journal of Dairy Research

General style of all manuscripts

Please consult the online guidance and refer to a recent issue to familiarize yourself with *Journal* conventions and layout. Attention to these and other details will speed publication. Manuscripts should be written in UK English using the spelling of the Concise Oxford Dictionary and should as far as possible be comprehensible to the non-specialist reader. They should be concise and focused on the scientific objectives. Research Papers and Research Communications must contain sufficient detail or appropriate cited methodologies to allow repetition of the work. Formatting should include double spaced and consecutively numbered lines, standard margins and an appropriate font of appropriate size. Do not hyphenate words at the end of a line unless a hyphen is to appear in the printed text.

Layout of Research Paper manuscripts

The manuscript should generally be divided as follows:

- **Cover sheet** should give the title of the article, names of the authors each with one forename, together with their affiliations, a shortened version of the title suitable as a heading, and the name, address and email of the author to whom correspondence and proofs should be sent.
- **Summary**, preferably not more than 300 words, should encapsulate the whole paper, showing clearly the new knowledge acquired. Individual results should not be given. The first line of the summary should identify the article as a Research Paper and present the objectives, preferably in the form of a hypothesis (eg *This Research Paper addresses the hypothesis that...*)
- **Keywords**: up to 5 keywords may be supplied
- **Introduction** should not have a heading. It should not contain a full review of the literature, but should help the non-specialist to understand why the subject of enquiry is interesting or important, why the authors have chosen the approach described and what the likely impact of the research will be. The objectives must be clearly stated, preferably in the form of a hypothesis.
- **Materials and Methods** section should contain adequate descriptions of procedures or appropriate references; sources of all materials (including address, with postal code) and sources or strains of animals and microorganisms should be indicated. Do not give detailed descriptions of published methods; refer to the original publication.
- **Results** should be as concise as possible, without repetition or inclusion of irrelevant material. Tables and illustrations should be used efficiently. All data reported must directly relate to the understanding of the research objectives. Supporting or confirmatory data should be presented separately as Supplementary Files.
- **Discussion** should not repeat the results but discuss their significance. Refer to existing or accepted knowledge in the present tense and the authors' work in the past tense; the difference in tense should clearly show the authors' contribution. A separate conclusion is not necessary but authors should summarize their main conclusions briefly at the end of the Discussion. A combined Results and Discussion is acceptable but not preferred.
- **Acknowledgements** of financial support, technical assistance and so on are given in a separate paragraph without heading. It is the responsibility of the authors to ensure that individuals or organizations acknowledged as providing materials or otherwise are willing to be identified.
- **References** must be consistent and must use the style described below.
- **Tables** and table legends, following the style described below.
- **Figure legends** sufficient to allow the figure to be understood without reference to the text
- **Figures** should be produced using an editable software and copied into the Word document.

Please remember that the complete manuscript should be submitted as a single document.

Layout of submitted Research Communication manuscripts

In general, follow the same format and layout as for a Research Paper. The Introduction will typically be shorter and the results and discussion are more likely to be combined into one section. The number of citations will be less, and presentation of data should be restricted to one or two figures and tables. Use of Supplementary Files for the presentation of supporting data is encouraged. The Summary should start with a sentence clearly identifying the article type and presenting the objectives (eg *This Technical Research Communication describes....*)

References

Refer to a recent issue and ensure that your reference citations comply with *Journal* style. References should be given in the text as Brown & Jones (1987) or (Schmidt, 1985; Nakamura et al.1989); the first author with et al. is used for papers with three or more authors. Where necessary, papers are distinguished as Lenoir (1988a), (Litov et al. 1990a, b). When several references appear together in the text, cite them in chronological order, and alphabetically within years. The Reference list at the end of the paper, which should begin on a fresh page, is given in strict alphabetical order and uses the minimum of punctuation. Each reference should contain authors' names, with initials (in capitals), the year, the title of the paper, the name of the journal in full, the volume and the page range. Titles of articles originally published in another language should be given in English translation, and this indicated by the use of square brackets. References to books should include the town of publication and the publisher, with editor(s) and volume and edition number where appropriate. Unpublished work should be given in the text (use authors' initials and surname) and not in the Reference list. You are reminded that it is your responsibility to check all references.

Data presentation

Choose the most economical form of data presentation, remembering that this could include data presented briefly in the text. For investigative research, avoid large tables and figures that are comprised mainly of data that do not differ significantly between treatments. For descriptive research, consider the use of Supplementary Files for all apart from the most important observations.

Tables

Tables should be numbered and carry headings enabling them to be understood without reference to the main text. Any abbreviations should be defined. Each Table should be typed separately at the end of the main text, but their approximate position should be indicated by a marginal mark (eg *Table 1 near here*). Symbols for footnotes should avoid use of *, **, etc, which should be used to indicate levels of significance.

Figures and Illustrations

Figures should be numbered and the combination of figure and legend should be comprehensible without reference to the main text. Figures must be prepared using an editable file format and then copied into the Word document. Data points should be indicated by clearly distinguishable symbols. Illustrations such as photographic images should be accompanied by a legend as above, with scale bars if appropriate. Colour figures and artwork submitted to the *Journal* will be published online free of charge. If you request colour figures in the printed version, you will be contacted by CCC-Rightslink who are acting on our behalf to collect Author Charges. Please follow their instructions in order to avoid any delay in the publication of your article.

Colour reproduction

To optimize the online colour reproduction, you will be given the opportunity to submit a colour graphic as either TIFF or EPS file, together with further instructions. It is your responsibility to ensure that any figures provided for colour online will reproduce well when converted to black and white for the print version.

Statistical treatment

Authors should, where possible, discuss their work with a statistician at an early stage and give attention to sample size. Individual results should not normally be given. The methods of statistical analysis should be clearly described; a suitable reference is adequate. Authors should make it clear whether they are quoting SED, SEM, SD, SE and so on. Any statement that two groups of values are different should be supported by the level of significance involved. Differences should not be claimed or implied if $P > 0.05$.

Gene Sequences

Original DNA sequences reported in the *Journal* must also be submitted to GenBank. Instructions can be found at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>

APÊNDICE

APÊNDICE A – Publicação da Cartilha “Mastite: Perguntas e Respostas”.



A obra “Mastite: Perguntas e Respostas” foi elaborada durante o período de mestrado e publicada pela Editora da UFRPE, nas formas impressa e eletrônica, com acesso disponível em: <http://www.editora.ufrpe.br/mastite>, destinando-se a orientar estudantes, técnicos e produtores rurais a respeito dos diversos aspectos que englobam a mastite em ruminantes, tais como: conceito, etiologia, impacto econômico, epidemiologia, patogenia, sinais clínicos, diagnóstico, riscos à saúde pública e profilaxia.