

# **Prevalência e resistência a antibióticos de estafilococos coagulase-positivos no leite de vacas leiteiras numa exploração da Ilha Terceira**

Dissertação de mestrado

João Luís Fagundes Barros

Mestrado em

**Engenharia Zootécnica**



Angra do Heroísmo  
[2022]

# **Prevalência e resistência a antibióticos de estafilococos coagulase-positivos no leite de vacas leiteiras numa exploração da Ilha Terceira**

Dissertação de Mestrado

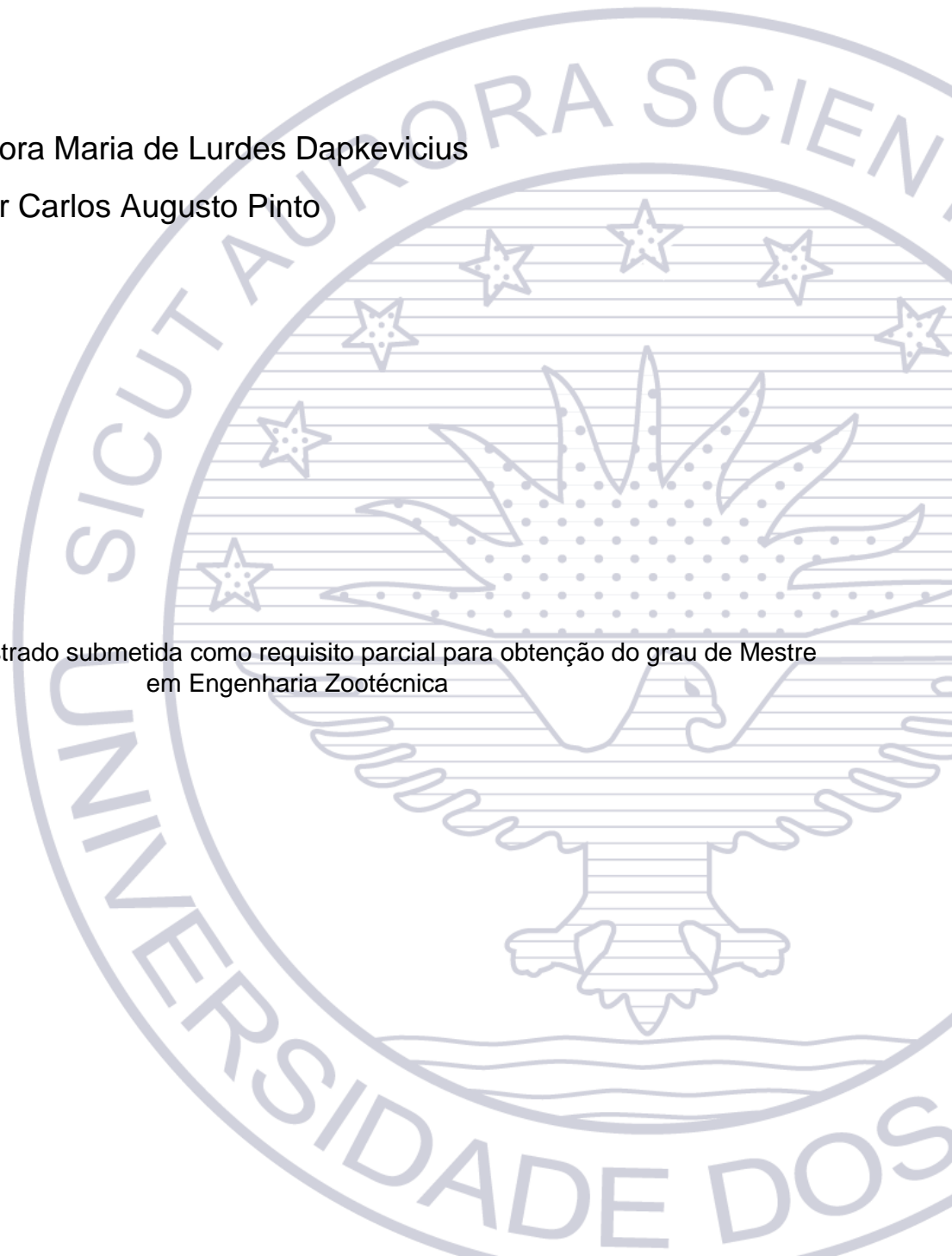
João Luís Fagundes Barros

## **Orientadores**

Professora Doutora Maria de Lurdes Dapkevicius

Professor Doutor Carlos Augusto Pinto

Dissertação de Mestrado submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Zootécnica



## **Agradecimentos**

Agradeço a todos aqueles que contribuíram para a realização da presente dissertação.

Em especial aos orientadores desta dissertação. À Professora Doutora Maria de Lurdes Dapkevicius pela orientação, apoio, disponibilidade, confiança, conhecimento na área da Microbiologia, e ilustre experiência laboratorial transmitida ao longo de todo o trabalho. Ao Professor Doutor Carlos Augusto Pinto, por toda a sua cooperação, toda a informação fornecida, pelo tempo disponibilizado, e por ter realizado a colheita das amostras de leite.

Ao Laboratório de Microbiologia, em especial à Dr.<sup>a</sup> Júlia Gomes, pela disponibilidade, paciência e amizade, por me ter proporcionado as condições necessárias à realização de todos os testes laboratoriais, assim como pela colaboração técnica na realização dos testes de formação de biofilme, de resistência à acrilflavina e fermentação anaeróbia do manitol.

Ao Professor Doutor Henrique Rosa pela incansável disponibilidade e ajuda na análise estatística e discussão de resultados da tese.

À Doutora Ana Margarida Batista Pereira pelo indispensável apoio na amostragem e na escrita da secção material e métodos da presente dissertação.

À Chegalvorada - Produção, Exploração E Gestão Agrícola, Unipessoal, Lda., seus respetivos corpos dirigentes e funcionários por permitirem a recolha das amostras de leite a partir de cada vaca leiteira, e pela cedência dos dados relativos a cada animal testado.

À Dr.<sup>a</sup> Vanessa Maria Toste Fagundes por toda a informação fornecida, por todos os esclarecimentos, conselhos e ensinamentos.

Aos meus colegas de turma que de várias formas me ajudaram e aconselharam.

E a todas as pessoas que direta ou indiretamente ajudaram na concretização deste trabalho, em especial à minha família.

## Resumo

Os estafilococos coagulase-positivos (CoPS) são importantes agentes causadores de mastite bovina contagiosa e patógenos relevantes para os seres humanos. Os bovinos leiteiros podem servir de reservatório de CoPS portadores de fatores de virulência e dotados de resistência a antibióticos relevantes do ponto de vista da medicina humana.

O objetivo principal deste trabalho foi estudar a prevalência e o perfil fenotípico de resistência a antibióticos de isolados de CoPS obtidos a partir de cada um dos quartos do úbere das 58 vacas em produção na exploração leiteira experimental da Universidade dos Açores.

As amostras de leite foram recolhidas assepticamente, após descartar os primeiros jatos, de cada quarto do úbere de todas as 58 vacas leiteiras em lactação. Foram efetuados testes californianos de mastite para cada quarto de úbere e foram obtidas contagens de células somáticas a partir dos registos da exploração. As amostras de leite de cada quarto de úbere de cada vaca foram plaqueadas em Baird-Parker Agar com gema de ovo e telurito para isolamento de CoPS. Todos os isolados CoPS foram testados quanto aos seus perfis de fatores de virulência e de resistência/sensibilidade a antibióticos clinicamente relevantes, pelo método de difusão em agar, seguindo os protocolos da CLSI e da CASFM. A resistência à meticilina (oxacilina) foi testada em Agar ORSAB.

Obteve-se 30 isolados a partir de 58 vacas, correspondendo a uma prevalência de CoPS de 12%. Destes, 10 isolados (todos provenientes do mesmo animal) foram preliminarmente identificados como *S. aureus*. Nenhum dos isolados obtidos cumpriu os critérios para serem considerados MRSA. No que toca aos fatores relacionados com a invasão dos tecidos do hospedeiro e com a produção de danos nas suas células, a produção de gelatinase foi observada em 50 % dos isolados, enquanto que a maioria apresentou beta-hemólise. Não foram observadas resistências à maioria dos antibióticos testados. Apenas foram encontradas resistências a 3 antibióticos pertencentes à classe dos beta-lactâmicos (penicilina, cefoxitina e oxacilina). A maioria dos isolados foram resistentes à penicilina, 50% foram resistentes à oxacilina e apenas 3% à cefoxitina. Devido ao baixo número de animais incluídos neste estudo, a análise estatística não revelou influência significativa de nenhum dos parâmetros estudados (produção de leite aos 305 dias, valor médio das C.C.S., n.º de lactações e dias em lactação à data da colheita) sobre a presença ou ausência de CoPS nas vacas.

A situação da exploração em estudo relativamente à prevalência de CoPS, à frequência dos fatores de virulência estudados e ao perfil de resistência a antibióticos clinicamente relevantes não foi preocupante. Contudo, a presença de uma percentagem considerável de isolados resistentes à meticilina (oxacilina) pode constituir uma ameaça por representarem um reservatório de determinantes genéticos de resistência a este antibiótico.

**Palavras-chave:** Mastite, estafilococos coagulase-positivos, fatores de virulência, resistências a antibióticos.

## Abstract

Coagulase-positive staphylococci (CoPS) are important agents of contagious bovine mastitis as well as relevant human pathogens. Dairy cows can act as a reservoir of CoPS that bear virulence factors and are resistant to antibiotics of importance for human medicine.

The main goal of this dissertation was to study the prevalence and the phenotypic antibiotic resistance profile of CoPS isolates obtained from each of the udder quarters of the 58 dairy cows in production at the experimental farm of University of the Azores.

Milk samples were aseptically collected from each udder quarter of all 58 lactating cows after discarding the first jets. Californian Mastitis Tests were performed on milk from each udder quarter and somatic cell counts were obtained from the farm's records. Aliquots of the milk samples from each quarter were plated out onto Baird-Parker Agar with egg yolk and tellurite to isolate CoPS. All CoPS isolates were tested to assess their phenotypic profiles of virulence factors and of antibiotic resistance/sensitivity. Antibiotic resistance/sensitivity was assessed by the agar diffusion method, in accordance with the CLSI and CASFM protocols. Methicillin (oxacillin) resistance was tested in ORSAB Agar.

Thirty CoPS isolates were obtained from the 58 cows under study, corresponding to a CoPS prevalence of 12%. Of these, 10 isolates (all from the same animal) were preliminarily identified as *S. aureus*. None of the obtained isolates fulfilled the criteria to be regarded as MRSA. Regarding the virulence factors associated with invasion of the cell's tissues and damage to the host's cells, gelatinase production was observed in 50% of the isolates, whereas most of them were beta-hemolytic. No resistance was observed against most of the tested antibiotics. Resistance was found only against three antibiotics, all belonging to the beta-lactamine class (penicillin, cefoxitin, and oxacillin). Most isolates were resistant to penicillin, 50% were resistant to oxacillin, but only 3% were resistant to cefoxitin. Due to the low number of animals included in this study, statistical analysis did not reveal significant influence of the parameters under study (milk production at 305 days, average SCC, number of lactations, and number of days into lactation at the sampling date) upon the presence/absence of CoPS in the milk.

The situation of the farm regarding CoPS prevalence, frequency of the virulence factors under study and antibiotic resistance against clinically relevant antibiotics was not, on itself, cause for concern. However, the presence of a considerable percentage of isolates that were resistant to methicillin (oxacillin) may constitute a threat since they represent a reservoir of genetic determinants of resistance to this antibiotic.

**Key words:** Mastitis, coagulase-positive staphylococci, virulence factors, resistance to antibiotic.

# Índice

Agradecimentos .....	i
Resumo .....	ii
Abstract.....	iii
Índice .....	iv
Lista de Figuras .....	vi
Lista de Quadros.....	vii
Abreviaturas.....	ix
I - Introdução .....	1
II – Objetivos .....	4
III – Revisão bibliográfica.....	5
3.1. – As mastites bovinas .....	5
3.2. - Os estafilococos coagulase-positivos .....	11
3.2.1. Patogénese das mastites causadas por estafilococos coagulase-positivos ....	12
3.2.2. - Fatores de virulência associados aos estafilococos coagulase-positivos. ...	15
3.2.3. - Prevenção das mastites causadas por estafilococos coagulase-positivos ...	19
3.3. - Quimioterapia antibacteriana de mastites bovinas .....	20
3.3.1. - Atuação a nível da parede celular .....	20
3.3.2. - Inibidores da síntese proteica.....	24
3.3.3. - Alteração das membranas celulares .....	26
3.3.4. - Inibição da síntese dos ácidos nucleicos.....	26
3.3.5. - Inibição de vias metabólicas não existentes nos eucariotas.....	27
3.4. - O fenómeno da resistência aos antibióticos.....	27
3.4.1. – O desafio do <i>S. aureus</i> metilino-resistente (MRSA).....	29
3.5. – A resistência a antibióticos e o conceito de “One Health” .....	31
IV – Materiais e métodos.....	33
4.1. – Design do estudo.....	33
4.1.1. - Caracterização da exploração .....	33
4.1.2. - Caracterização dos animais.....	33
4.2. – Descrição dos procedimentos de amostragem .....	36
4.2.1. - Exame da glândula mamária.....	37
4.2.2. - Recolha de leite.....	37
4.2.3. – Teste Californiano de Mastites.....	38
4.3. – Análise de amostras .....	39

4.3.1. – Isolamento de presumíveis <i>Staphylococcus aureus</i> .....	39
4.3.2. – Confirmação da identidade dos isolados .....	40
4.3.3. – Pesquisa fenotípica de fatores de virulência .....	45
4.3.4. - Estudo da sensibilidade/resistência a antibióticos .....	49
4.4. – Análise estatística .....	53
V - Resultados e Discussão .....	54
5.1. – Caracterização dos animais.....	54
5.2. - Caracterização bioquímica dos isolados.....	56
5.3. - Detecção de fatores de virulência.....	58
5.4. - Padrão de resistência/ sensibilidade aos antibióticos dos isolados em estudo ..	62
VI - Conclusões .....	65
VII - Referências bibliográficas .....	66
VIII – Anexos .....	82

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Proveniência da microbiota da glândula mamária .....	7
<b>Figura 2.</b> Colónia típica de <i>S. aureus</i> em Baird-Parker Agar. A colónia típica está assinalada com um círculo.....	39
<b>Figura 3.</b> Purificação de um isolado em Brain Heart Agar (BHA, AES Laboratoire, AEB150402, France), através da realização de estrias sucessivas. ....	40
<b>Figura 4.</b> Morfologia celular típica de <i>S. aureus</i> .....	41
<b>Figura 5.</b> Teste da catalase - resultados positivos.....	42
<b>Figura 6.</b> Resultados do teste da coagulase. Em cima, uma cultura coagulase-positiva. No meio um controlo positivo ( <i>S. aureus</i> ATCC 9144). Em baixo, uma cultura coagulase-negativa.....	43
<b>Figura 7.</b> Resultados do teste da fermentação do manitol. Três culturas positivas e uma cultura negativa para o processo de fermentação do manitol.....	44
<b>Figura 8.</b> Resultados do teste da DNase. À esquerda, o controlo positivo ( <i>S. aureus</i> ATCC 9144) e à direita uma cultura negativa para a DNase .....	46
<b>Figura 9.</b> Resultados do teste da gelatinase. Em baixo, uma cultura gelatinase positiva. Em cima, um controlo negativo (não inoculado). ....	47
<b>Figura 10.</b> Resultados do teste da resistência à oxacilina. Três culturas resistentes e uma cultura sensível à oxacilina.....	49
<b>Figura 11.</b> Resultado da determinação da concentração inibitória mínima à vancomicina pelo método de E-test. ....	52
<b>Figura A1.</b> Formulário de amostragem relativo à primeira colheita (01/02/2021) .....	82
<b>Figura A2.</b> Formulário de amostragem relativo à segunda colheita (28/10/2021).....	83
<b>Figura A3.</b> Formulário de amostragem relativo à terceira colheita (02/12/2021).....	84
<b>Figura A4.</b> Formulário de amostragem relativo à quarta colheita (01/02/2022).....	85
<b>Figura A5.</b> Formulário de amostragem relativo à quinta colheita (10/02/2022).....	86

## Lista de Quadros

<b>Quadro 3.1.</b> Composição da microbiota do leite provenientes de úberes saudáveis.....	8
<b>Quadro 3.2.</b> Exemplos de antibióticos de cada geração de Cefalosporinas .....	22
<b>Quadro 4.1.</b> Características das 58 vacas amostradas .....	34
<b>Quadro 4.2.</b> Registos de mastites clínicas nas vacas amostradas, e respetivas medicações. .....	35
<b>Quadro 4.3.</b> Princípios ativos dos produtos de higienização empregues. ....	37
<b>Quadro 4.4.</b> Grau de gelificação, numa escala de 0 a 5, feito corresponder à contagem de células somáticas. ....	38
<b>Quadro 4.5.</b> Lista dos antibióticos para a avaliação do perfil fenotípico de resistência/sensibilidade dos isolados obtidos.....	51
<b>Quadro 5.1.</b> Análise descritiva dos dados relativos à Produção de Leite (kg) aos 305 dias, ao valor médio das C.C.S., ao N° de lactações, e aos dias em lactação à data da colheita das vacas leiteiras negativas (CoPS -) e positivas (CoPS +) para estafilococos coagulase-positivos (CoPS) (mais parâmetros descritivos no Anexo B). ....	54
<b>Quadro 5.2.</b> Resultados da Análise de Variância dos dados relativos à Produção de Leite (kg) aos 305 dias das vacas leiteiras negativas e positivas para estafilococos coagulase-positivos (CoPS). ....	55
<b>Quadro 5.3.</b> Teste de Mann-Whitney U dos dados relativos ao N° de Lactações, aos dias em lactação na data da colheita e ao valor médio das C.C.S. das vacas leiteiras negativas e positivas para estafilococos coagulase-positivos (CoPS).. ....	56
<b>Quadro 5.4.</b> Caracterização bioquímica de isolados de estafilococos coagulase-positivos obtidos a partir do leite dos primeiros jatos de vacas de uma exploração pecuária da Ilha Terceira.....	58
<b>Quadro 5.5.</b> Detecção de fatores de virulência de isolados de estafilococos coagulase-positivos obtidos a partir do leite dos primeiros jatos de vacas de uma exploração pecuária da Ilha Terceira.....	60
<b>Quadro 5.6.</b> Padrão de resistência/sensibilidade aos antibióticos de isolados de estafilococos coagulase-positivos obtidos a partir do leite dos primeiros jatos de vacas de uma exploração pecuária da Ilha Terceira.....	62
<b>Quadro B1.</b> Análise descritiva dos dados relativos à Produção de Leite (kg) aos 305 dias das vacas leiteiras negativas e positivas para estafilococos coagulase-positivos (CoPS). .....	87

<b>Quadro B2.</b> Análise descritiva dos dados relativos ao valor médio das C.C.S. das vacas leiteiras negativas e positivas para estafilococos coagulase-positivos (CoPS). .....	88
<b>Quadro B3.</b> Análise descritiva dos dados relativos ao N° de Lactações das vacas leiteiras negativas e positivas para estafilococos coagulase-positivos (CoPS). .....	89
<b>Quadro B4.</b> Análise descritiva dos dados relativos aos Dias em leite à data da colheita das vacas leiteiras negativas e positivas para estafilococos coagulase-positivos (CoPS). .....	90
<b>Quadro C1.</b> Resultados dos testes morfológicos e fisiológicos dos isolados em estudo. ....	91
<b>Quadro C2.</b> Resultados Biofilmes às 24 horas.....	92
<b>Quadro C3.</b> Resultados Biofilmes às 48 horas.....	93
<b>Quadro D1.</b> Diâmetros (mm) de inibição obtidos no teste de resistência a antibióticos (Kirby-Bauer).....	94
<b>Quadro D2.</b> Resultados da determinação da concentração inibitória mínima (E-test)..	95

## Abreviaturas

°C - Grau Celsius

% - Por cento (Percentagem)

**ARG** - Genes de resistência aos antibióticos

**BHA** - *Brain Heart Agar*

**BHI** - *Brain-Heart Infusion*

**CA-MRSA** - MRSA associado à comunidade

**CASFM/EUCAST** - *Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie*

**CCS** – Contagem de células Somáticas

**CLSI** - *Clinical & Laboratory Standards Institute*

**CN/ha** - Cabeças normais/Hectare

**CoNS** - Estafilococos coagulase-negativos

**CoPS** - Estafilococos coagulase-positivos

**DNA** - Ácido desoxirribonucleico

**DNase** – Desoxirribonuclease

**DO** - Densidade ótica

**DOC** - Valor médio de DO obtido em todos os poços de controlo negativo (branco)

**g** - Gramas

**HA-MRSA** - MRSA associado ao ambiente hospitalar

**IITAA** - Instituto de Investigação e Tecnologias Agrárias e do Ambiente

**Kg** – Quilogramas

**LA-MRSA** - MRSA associado a animais de produção

**LPS** – Lipopolissacáridos

**Mg<sup>2+</sup>** - Magnésio

**MHA** - Mueller Hinton

**ml** – Mililitros

**mm** – Milímetros

**MRSA** - *Staphylococcus aureus* resistente à metilina

**NH<sup>3+</sup>** - Amoníaco

**ORSAB** - *Oxacilin Resistance Screening Agar Base*

**PBPs** - Proteínas de ligação à penicilina (*Penicillin binding Proteins*)

**PCR** – Reação em cadeia da polimerase (*polimerase chain reaction*)

**PMN** - Leucócitos neutrófilos polimorfonucleares

**R** – Resistente

**RAA** - Região Autónoma dos Açores

**RNA** - Ácido Ribonucléico

**r-RNA** - RNA Ribossômico

**S** – Sensível

**SCC*mec*** - Cassete Cromossômica Estafilocócica *mec*

**TCM** - Teste Californiano de Mastites

**VP** - *Voges-Proskauer*

**VRSA** - *S. aureus* resistentes à vancomicina

## I - Introdução

O setor primário nos Açores, tendo o leite como principal produto, tem uma expressão muito relevante na economia regional, representando 10% do total do Valor Acrescentado Bruto e abrangendo cerca de 10% da população empregada (SREA, 2021). Devido ao seu clima particularmente temperado, precipitações abundantes e solos férteis, a região gera uma aptidão excepcional para a produção de pastagem todo o ano, destinada ao pastoreio. É, por isso, a região mais adequada para a produção de leite em Portugal (Almeida *et al.*, 2020). Segundo dados do INE (2021), a Região Autónoma dos Açores em 2020 teve uma produção de 650 452 000 litros de leite de vaca, o que corresponde a 33,62 % da produção Nacional. Importa referir também que em 2020 foram produzidos 32 850 506 kg de queijo por unidade de produção, sendo um dos lacticínios mais produzidos na RAA (IAMA, 2021).

No entanto, a produção leiteira nos Açores atravessa um período crítico, atendendo à redução do preço do leite pago ao produtor, ao aumento dos custos de produção, ao fim do regime das quotas leiteiras europeias e à implementação de medidas para controlar o excesso de produção, bem como à própria insularidade e isolamento geográfico da região que implica custos de transporte significativos e à forte dependência de subsídios para garantir a sustentabilidade económica do setor (Almeida *et al.*, 2020). Uma das estratégias para aumentar o valor dos produtos lácteos açorianos, quer em termos quantitativos quer em termos qualitativos, passa pela prevenção das doenças dos efetivos leiteiros (Teixeira *et al.*, 2008).

A doença mais comum em efetivos leiteiros no mundo é a mastite bovina, uma inflamação do tecido da glândula mamária das vacas (Cheng *et al.*, 2020; Teixeira *et al.*, 2008). Para além de causar um impacto económico negativo à indústria leiteira, pode representar um risco para a saúde humana sob o ponto de vista epidemiológico (Azevedo *et al.*, 2016b; Pérez *et al.*, 2020).

Os estafilococos coagulase-positivos (COPs) são importantes agentes causadores de mastites bovinas a nível mundial (Krishnamoorthy *et al.*, 2021). As coagulases são fatores de virulência de importância central no género *Staphylococcus*. Contribuem para o desenvolvimento de pseudocápsulas que, por sua vez, promovem a formação de abscessos e a persistência dos estafilococos nos tecidos do hospedeiro, bem como a ocorrência de bacteremia e endocardite (Bonar *et al.*, 2018).

De todas as espécies de CoPS, o *Staphylococcus aureus* é um dos mais importantes agentes de mastites bovinas à escala mundial (Moon *et al.*, 2007). Devido aos seus fatores de virulência, o *S. aureus* ataca e danifica irreversivelmente o tecido da glândula mamária, afetando a produção de leite (Vasudevan *et al.*, 2003). A transmissão deste patógeno contagioso entre vacas, tem sido muito bem estudada, sabendo-se que está associado a elevadas perdas económicas e a baixas taxas de cura (Azevedo, *et al.* 2016b; Azevedo, *et al.* 2016). Costuma considerar-se que as mastites causadas por este agente bacteriano não respondem bem ao tratamento com antibióticos, quer estes sejam administrados por via parentérica ou por via intramamária (Moon *et al.*, 2007), não conseguindo evitar-se a persistência prolongada do patógeno nos tecidos infetados (Fluit, 2012). Dada a sua transmissibilidade entre animais, bem como a sua capacidade para realizar transferência horizontal de determinantes genéticos de resistência a antibióticos, a dita resistência pode espalhar-se facilmente em populações de *S. aureus* e doutros estafilococos coagulase-positivos. É, por isso, importante conhecer o perfil de resistência/sensibilidade das bactérias presentes nos rebanhos, se quisermos evitar a disseminação dos genes de resistência (Moon *et al.*, 2007). Em muitos estudos realizados nos primeiros anos do séc. XXI, observou-se uma elevada frequência de estirpes resistentes à penicilina, mas foram poucos os casos em que se detetou resistência a outros agentes microbianos (Stephan *et al.*, 2001, Werckenthin *et al.*, 2001, Erskine *et al.*, 2002, Vintov *et al.*, 2003).

A presença de estirpes resistentes aos antibióticos em animais não é apenas prejudicial para a saúde animal e para a economia. A presença destas estirpes no leite cru de animais saudáveis permite que estas cheguem à cadeia alimentar e que sejam transmitidas aos seres humanos, causando graves doenças infecciosas (Algammal *et al.*, 2020; Pérez *et al.*, 2020). Para enfrentar a resistência antimicrobiana, é muito importante a cooperação entre as autoridades de saúde e autoridades veterinárias na vigilância contínua da sensibilidade aos antibióticos e na implementação de medidas preventivas, tais como a sensibilização sanitária do público, a adoção de práticas gerais de higiene na produção animal, bem como a quarentena e práticas de biossegurança (Algammal *et al.*, 2020).

A elevada prevalência do *S. aureus* no leite dos tanques de ordenha na ilha de São Miguel (Açores), descrita nos trabalhos de Azevedo *et al.* (2016), demonstra que esta bactéria é um agente patogénico muito disseminado nas explorações da região e que pode

constituir um importante reservatório de resistências aos antibióticos. É, desta forma, importante avaliar esse aspecto mais aprofundadamente.

Os estafilococos coagulase-positivos podem ser portadores de numerosos fatores de virulência, que permitem que estas bactérias colonizem os seus hospedeiros e/ou causem danos nos seus órgãos ou tecidos. Os animais de produção, como as vacas leiteiras, podem constituir um reservatório destes microrganismos, funcionando os alimentos deles derivados como uma via potencial para a sua disseminação. O conhecimento do risco que os reservatórios zoonóticos destes estafilococos representam para a espécie humana baseia-se no conhecimento da prevalência dos diferentes tipos de fatores de virulência (González-Martin *et al.*, 2020) e é indispensável para se poder aplicar uma abordagem preventiva, baseada no conceito de *One Health*. Considera-se, além disso, que existe uma sinergia entre fatores de virulência e resistência a antibióticos, importando deste modo caracterizar as populações de estafilococos coagulase-positivos em circulação entre os bovinos do ponto de vista destes dois tipos de fatores (Pérez *et al.*, 2020).

## II – Objetivos

Em resposta ao aumento de preocupação, quer a nível veterinário, quer a nível de saúde pública, relativamente ao peso das mamites no bem-estar animal, nos aspectos económicos da produção de leite, e o seu papel como potencial reservatório de microorganismos virulentos e de determinantes genéticos de resistência a antibióticos para as populações humanas, este trabalho tem como principal objetivo alcançar uma melhor compreensão e caracterização deste problema atual, numa exploração leiteira na ilha Terceira.

Assim, os objectivos específicos desta dissertação são os seguintes:

- Proceder ao isolamento de estafilococos pertencentes ao complexo de espécies do *S. aureus* e de MRSA (Multiple-resistant *Staphylococcus aureus*) a partir de amostras de leite colhidas assepticamente de cada vaca leiteira durante a ordenha numa exploração leiteira da Ilha Terceira (Chegalvorada - Produção, Exploração E Gestão Agrícola, Unipessoal, Lda).
- Avaliar o perfil fenotípico dos isolados obtidos quanto à presença/ausência de fatores de patogenicidade (coagulase, hemólise, DNase, gelatinase, produção de biofilme).
- Avaliar o perfil fenotípico de resistência/sensibilidade dos isolados obtidos em relação a antibióticos relevantes em Medicina e em Medicina Veterinária.
- Analisar os resultados obtidos sob a perspetiva das características individuais de cada animal (estado do úbere, paridade, resultado do Teste Californiano de Mamites, historial clínico e de produção).

## III – Revisão bibliográfica

### 3.1. – As mastites bovinas

A mastite (mamite) bovina é uma resposta inflamatória da glândula mamária provocada por traumas físicos, irritações químicas ou infecções por microrganismos (Ashraf *et al.*, 2020; Gomes *et al.*, 2016). Caracteriza-se pelo movimento de leucócitos e proteínas séricas do sangue para o local da infecção (Addis *et al.*, 2016). É a doença mais comum e prevalente em efetivos leiteiros no mundo inteiro, de grande impacto no bem-estar animal e responsável por um impacto económico negativo à indústria leiteira, sob a forma de diminuição da quantidade e qualidade da produção de leite, envolvendo também custos acrescidos com medicamentos e tratamento veterinários, leite descartado, trabalho extra, perdas de potencial genético, morte e refugio dos animais (Azevedo *et al.*, 2016b; Khairullah *et al.*, 2020; Sharun *et al.*, 2021; Silva, 2012).

Um quarto do úbere infetado pode causar uma diminuição na produção de leite de 10% a 12% por vaca/lactação (Khairullah *et al.*, 2020). De acordo com Halasa *et al.* (2007), as perdas económicas devidas à diminuição da produção de leite são comparáveis com as perdas derivadas da necessidade de descartar o leite proveniente de vacas mamíticas. Para reduzir as perdas económicas, este leite descartado serve muitas vezes de alimento a bezerros, no lugar do leite de substituição, com o intuito de reduzir os custos. Todas estas considerações demonstram a dificuldade em calcular as perdas económicas resultantes das mastites. Por isso, os produtores de leite geralmente tendem a subestimar estes custos (Huijps *et al.*, 2008).

Para além do impacto económico, as mastites bovinas representam um risco para a saúde pública humana sob o ponto de vista epidemiológico. No leite mamítico, bem como nos produtos lácteos dele derivados, portadores de determinantes genéticos de virulência e de resistência a antibióticos, podem estar presentes microrganismos de elevado potencial patogénico para hospedeiros humanos (Hennekinne *et al.*, 2010).

No Arquipélago dos Açores, as mastites são um dos principais problemas do setor leiteiro, muito por influência do sistema peculiar de manejo das explorações leiteiras e da fragmentação das parcelas de pastagem, o que leva à utilização de sistemas de ordenha ao ar livre, móveis, que permitem a ordenha na própria pastagem, mas que obrigam à

transumância frequente do gado bovino. Para além disso, os tanques de transporte do leite não são, muitas vezes, refrigerados (Azevedo *et al.*, 2016b; Pacheco, 2015).

Com base no estado de inflamação, podemos classificar as mastites bovinas em 3 classes – mastites clínicas, subclínicas e crónicas (Cheng *et al.*, 2020).

As mastites clínicas são caracterizadas pela presença de alterações e anomalias evidentes no leite e no úbere (Cheng *et al.*, 2020). As vacas podem apresentar-se letárgicas, com pouco apetite, com febre e com vermelhidão e inchaço do úbere (Cobirka *et al.*, 2020; Gruet *et al.*, 2001). O primeiro sinal de inflamação na glândula mamária pode ser a deteção de contagens elevadas de células somáticas (>200.000 células/mL). Estas células presentes no leite são células de descamação dos tecidos do úbere e glóbulos brancos que penetram no tecido da glândula mamária para combater o processo de inflamação (Kalińska *et al.*, 2018). Estudos recentes sugerem ainda o uso de certas proteínas como marcadores para a deteção precoce das mastites (Addis *et al.*, 2016). Para além disso, o leite de um quarto afetado apresenta-se alterado, contendo flocos ou coágulos. As mastites clínicas podem ser ainda subdivididas em hiperagudas, agudas, e subagudas, consoante o grau de inflamação e os efeitos sistémicos que causam (Cheng *et al.*, 2020).

As mastites subclínicas são caracterizadas por não apresentarem manifestações clínicas. No entanto, a contagem de células somáticas aumenta e a produção de leite diminui (Cheng *et al.*, 2020; Teixeira *et al.*, 2008). São difíceis de detetar, ocorrem mais frequentemente do que a forma clínica e a sua duração é mais longa. Este tipo de infeção serve muitas vezes de reservatório a agentes patogénicos, contribuindo para a disseminação das infeções do úbere pelos outros animais do grupo (Cobirka *et al.*, 2020). As mastites subclínicas causam três vezes mais perdas de produção do que as mastites clínicas e são responsáveis por 60-70% das perdas económicas totais associadas a todos os tipos de mastites (Sharun *et al.*, 2021).

Já as mastites crónicas caracterizam-se por persistirem por longos períodos de tempo, com a ocorrência de surtos clínicos a intervalos irregulares, normalmente, sem grande intensidade (Cheng *et al.*, 2020; Teixeira *et al.*, 2008).

A origem das mastites é considerada multifatorial, com três principais fatores geralmente envolvidos: exposição aos microrganismos, atuação dos mecanismos de defesa do hospedeiro e condições ambientais (Zadoks *et al.*, 2001). Mais recentemente,

tem vindo a encarar-se as mastites como condições resultantes de uma disbiose, ou seja, de um desequilíbrio da microbiota da glândula mamária e não apenas o resultado de uma infecção primária (Oikonomou *et al.*, 2014). A fig. 1 mostra a proveniência da microbiota da glândula mamária.



**Figura 1.** – Proveniência da microbiota da glândula mamária

Tradicionalmente, pensava-se que a contaminação do leite pelas bactérias provinha de três fontes principais: o ambiente externo, a cavidade oral do bezerro e a pele da glândula mamária. No entanto, estudos como o de Addis *et al.* (2016), sustentam a hipótese de que a contaminação não é exclusivamente de origem externa, mas é também de proveniência endógena (migração de bactérias de outros locais do corpo para a glândula mamária). Como prova a esta teoria, é descrita a existência de uma via enteromamária, em que alguns microrganismos têm a capacidade de sair do lúmen intestinal, viajar através dos gânglios linfáticos mesentéricos e alcançar a glândula mamária. Embora o esclarecimento destes mecanismos careça de mais estudos, Perez *et al.* (2007) e Martín *et al.* (2004) pensam que podem estar implicadas nesta translocação de microrganismos células imunitárias, em particular as células dendríticas epiteliais. Estas células são capazes de abrir as junções entre os enterócitos e, com os seus dendritos, alcançar o lúmen sem danificar a integridade da barreira epitelial, recolhendo microrganismos, entre os quais bactérias intestinais. Estas células podem abrigar bactérias

vivas, que podem permanecer viáveis durante vários dias e serem, assim, transportadas para os gânglios linfáticos mesentéricos, alcançando a glândula mamária através do sistema linfóide (Addis *et al.*, 2016).

Os microrganismos que compõem a microbiota fundamental do leite saudável são os géneros *Faecalibacterium*, bactérias da família *Lachnospiraceae* (ainda não classificadas ao nível do género), *Propionibacterium* e *Aeribacillus*. Também são prevalentes na maioria das amostras de leite com baixas contagens de células somáticas *Bacteroides*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Anaerococcus*, lactobacilos, *Porphyromonas*, *Comamonas*, *Fusobacterium* e *Enterococcus* (Oikonomou *et al.* 2014). Em particular, a presença de certas bactérias, como as pertencentes ao antigo género *Lactobacillus* e ao género *Paenibacillus*, encontram-se associadas a úberes saudáveis (Oikonomou *et al.*). A microbiota do leite diferencia-se da microbiota da pele (tetos, úbere), varia conforme o tempo e o indivíduo (vaca) e é alterada conforme o estado de saúde do quarto (Andrews *et al.*, 2019). O Quadro 3.1. resume as conclusões de diferentes estudos relativos á composição da microbiota do leite de vacas saudáveis.

**Quadro 3.1.** - Composição da microbiota do leite provenientes de úberes saudáveis.

Estudos	Géneros predominantes
Kuehn <i>et al.</i>	<i>Ralstonia</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Sphingomonas</i> , <i>Stenotrophomonas</i> , <i>Psychrobacter</i> , <i>Bradyrhizobium</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Pelomonas</i> , <i>Staphylococcus</i>
Oikonomou <i>et al.</i>	<i>Propionibacterium</i> , <i>Aeribacillus</i> , <i>unclassified Lachnospiraceae</i> , <i>Faecalibacterium</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>unclassified Clostridiales</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Anaerococcus</i> , <i>unclassified Xanthomonadaceae</i> , <i>unclassified Bacteroidales</i> , <i>unclassified Bacteria</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Porphyromonas</i> , <i>Comamonas</i> , <i>Fusobacterium</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>unclassified Carnobacteriaceae</i> , <i>Asticcacaulis</i>
Zhang <i>et al.</i>	<i>Chryseobacterium</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Stenotrophomonas</i> , <i>Brevundimonas</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Sphingomonas</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Sphingobacterium</i> , <i>Helcococcus</i> , <i>Leucobacter</i> , <i>Butyrivibrio</i> , <i>Atopostipes</i> , <i>Bosea</i> , <i>Alcaligenes</i> , <i>Ruminococcus</i> , <i>Facklamia</i> , <i>Actinomyces</i> , <i>Sphingobium</i> , <i>Trueperella</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Comamonas</i> , <i>Megasphaera</i> , <i>Salinicoccus</i> , <i>Ochrobactrum</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Mogibacterium</i> , <i>Peptococcus</i> , <i>Succiniclasticum</i> , <i>Myroides</i>

Adaptado de Addis *et al.* (2016).

Num estudo realizado por Oikonomou *et al.* (2014), comparou-se a diferença entre a microbiota de quartos de úbere saudáveis e não saudáveis. Inesperadamente, os autores encontraram *Streptococcus uberis* e *Staphylococcus aureus* nas amostras provenientes de

úberes saudáveis, ainda que em menores proporções. É considerado inesperado pelos autores, uma vez que o *Strep. uberis* é reconhecido como um dos principais agentes patogénicos das mastites. Colocou-se então a hipótese de que o *Strep. uberis* pode, embora em pequenas proporções, fazer parte da microbiota normal do leite e as mastites serem causadas por uma disbiose, um desequilíbrio da microbiota normal do leite, que permitiria a esta bactéria patogénica tornar-se prevalente, quando em situações normais não o é.

Estudos realizados em mulheres permitiram compreender melhor o papel da microbiota nas infeções intramamárias e perceber o papel da microbiota normal dos hospedeiros enquanto reservatório de bactérias patogénicas implicadas em mastites. Estes estudos indicam que a suscetibilidade a mastites pode ser condicionada não só pela composição bacteriana do leite, ou pela exposição a agentes patogénicos específicos, mas também pela predisposição genética do animal e revelaram o papel da microbiota do trato gastrointestinal enquanto reservatório de bactérias implicadas nas mastites (Addis *et al.*, 2016).

O impacto desta disbiose (desequilíbrio da microbiota) inicia-se desde cedo na alimentação dos vitelos, durante o período de amamentação. A utilização de leite não vendável, para descartar, derivado de vacas com elevada contagem de células somáticas e/ou de vacas tratadas com antibióticos, para a alimentação dos vitelos é um fenómeno generalizado e pode parecer economicamente vantajoso para o agricultor (Addis *et al.*, 2016). No entanto, pode levantar algumas preocupações. Este leite residual pode ser fortemente desequilibrado em termos de microbiota e contaminado com agentes patogénicos (Barkema *et al.*, 2009), originando uma microbiota desequilibrada no trato intestinal do vitelo e, através das vias endógenas de migração de bactérias de outros locais do corpo para a glândula mamária, criar uma microbiota mamária que não se traduz numa boa saúde da futura vaca leiteira (Addis *et al.*, 2016).

A pasteurização deste leite poderá, contudo, atenuar estes inconvenientes (Addis *et al.*, 2016). Edrington *et al.*, (2012) avaliou amostras fecais de vitelos leiteiros de seis meses, alimentados com leites residuais pasteurizados e não pasteurizados. Concluíram que a diversidade bacteriana em termos do total do número de espécies diferentes foi maior nos bezerros alimentados com leite pasteurizado, embora tenha aumentado com a idade em ambos os grupos. Relativamente a microrganismos específicos, foi detetada *Salmonella* em concentrações mais elevadas nos bezerros alimentados com leite não

pasteurizado, aumentando a presença deste patógeno com a idade dentro mesmo grupo de animais. A detecção consistente de *Salmonella* apenas em bezerros jovens alimentados com leite residual não pasteurizado foi uma descoberta importante e permitiu concluir que a pasteurização do leite rejeitado pode ser uma forma de o tornar seguro para o consumo pelos vitelos.

No entanto, a pasteurização não elimina os resíduos de antibióticos que este leite mamático residual pode, muitas vezes, conter. A sua administração aos vitelos pode conduzir a um potencial enriquecimento dos genes de resistência aos antibióticos (ARG) na microbiota e criar no animal um “resistoma”. Futuramente, esta capacidade de resistência poderá ser transmitida a bactérias patogênicas, criando estirpes perigosas e resistentes que podem afetar quer a saúde animal, quer a saúde humana (Somme *et al.*, 2010).

Quer os vírus, quer as algas e os fungos podem ser agentes de mastites, no entanto são as bactérias os agentes infecciosos predominantes (Teixeira *et al.*, 2008). De acordo com a proveniência das bactérias, ou seja, as superfícies de onde estes agentes etiológicos foram isolados, e a forma como estes infetam o animal, podemos classificar as mastites bacterianas em contagiosas e ambientais (Lakew *et al.*, 2019; Teixeira *et al.*, 2008). As mastites contagiosas referem-se às que podem ser transmitidas de vaca para vaca, pelas máquinas de ordenha, pelas mãos do ordenhador e/ou através de tetos infetados (Silva, 2012). São exemplos de agentes patogênicos contagiosos o *S. aureus*, o *Streptococcus agalactiae* e espécies menos comuns como *Mycoplasma bovis*, bem como espécies do género *Corynebacterium* (Cheng *et al.*, 2020). Já as mastites ambientais são causadas por bactérias de origem ambiental que, normalmente, não colonizam a glândula mamária, mas que podem fazê-lo no caso de lhes ser facultado o acesso ao interior deste órgão (Silva, 2012). O *Strep. uberis* é um patógeno ambiental, associado a infeções subclínicas, que causa mastites recorrentemente (Abureema *et al.*, 2014). Em países com indústrias leiteiras mais desenvolvidas, a prevalência de mastites contagiosas diminuiu consideravelmente, comparativamente à incidência relativa de mastites ambientais, isto devido à melhoria constante das condições de higiene e à criação de programas de controlo das mastites nas explorações agrícolas (Sharun *et al.*, 2021).

A nível mundial, as bactérias do género *Staphylococcus* são consideradas o principal agente patogênico das mastites bovinas, seguindo-se os *Streptococcus* e a *Escherichia coli* (Krishnamoorthy *et al.*, 2021). O *S. aureus* é a espécie de *Staphylococcus*

mais comum e é conhecido por estar associado a várias formas de mastites clínicas e subclínicas (Algammal *et al.*, 2020; Cheng *et al.*, 2020). Num estudo realizado na ilha de São Miguel (Açores) por Azevedo *et al.* (2016), que teve como objetivo avaliar o grau de contaminação do leite do tanque por *Staphylococcus* spp. e bactérias coliformes, verificou-se que o *S. aureus* foi detetado em 59% das explorações investigadas.

Enquanto agente patogénico de mastites, o *S. aureus* desencadeia, na vaca, uma resposta imunitária mais suave, em comparação com a *E. coli* (Gilbert *et al.*, 2013). Este patógeno degrada e danifica irreversivelmente o tecido da glândula mamária devido a fatores de virulência de natureza proteica e, nalguns casos, enzimática (Vasudevan *et al.*, 2003). Está associado a baixas taxas de cura por antibióticos, levando geralmente a mastites crónicas que duram vários meses, tornando frequentemente necessário o abate do animal afetado (Cobirka *et al.*, 2020). O controlo, com sucesso, das mastites causadas por este patógeno, passa apenas pela prevenção de novas infeções e pelo abate de animais afetados (Cobirka *et al.*, 2020), sendo por isso muito importante a sua deteção precoce.

### **3.2. - Os estafilococos coagulase-positivos**

As bactérias do género *Staphylococcus* são bactérias Gram-positivas esféricas que ocorrem em cachos sob exame microscópico e são, com algumas exceções, catalase positivos (González-Martín *et al.*, 2020). Possuem uma vasta gama de fatores de virulência, isto é, de constituintes bacterianos que aumentam a sua capacidade de se estabelecerem e sobreviverem dentro do hospedeiro e contribuem, assim, para maiores danos no hospedeiro (Andrade *et al.*, 2021).

Com base no teste da coagulase, os estafilococos são geralmente diferenciados em dois grupos, os estafilococos coagulase positivos (CoPS) frequentemente associados a processos patológicos, e os estafilococos coagulase negativos (CoNS) que, embora sejam considerados como causas menos comuns de doenças em animais, o seu potencial zoonótico e a sua importância em medicina veterinária ainda não foram, cabalmente esclarecidos (Savini, 2018).

A coagulase é um fator de virulência de importância central no género *Staphylococcus*. Conduz à clivagem do fibrinogénio solúvel presente no plasma do hospedeiro, produzindo uma camada de fibrina à superfície da bactéria, protegendo-a da

fagocitose (Powers *et al.*, 2014). Ao reagir com a protrombina do sangue, a coagulase conduz à formação de estafilotrombina, um complexo que permite a conversão proteolítica do fibrinogénio a fibrina, causando a coagulação do plasma sanguíneo. A produção desta enzima, codificada pelo gene *coa*, é uma característica fenotípica crucial e o principal fator determinante para a identificação de espécies como o *S. aureus* (Andrade *et al.*, 2021; Dallal *et al.*, 2016).

Em bacteriologia veterinária, são geralmente reconhecidas as seguintes espécies de CoPS: *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius*, *S. pseudintermedius*, *S. delphini*, *S. hyicus*, *S. schleiferi*, *S. agnetis* e *S. chromogenes*, sendo as últimas quatro consideradas coagulase-variáveis, por possuírem estirpes coagulase-positivas e estirpes coagulase-negativas (De Buck *et al.*, 2021; Adkins *et al.*, 2017; Sasaki *et al.*, 2010). O *S. delphini* é uma das espécies de estafilococos que apresenta alguma especificidade quanto ao hospedeiro, não sendo correntemente isolado de bovinos (De Buck *et al.*, 2021). Relativamente ao *S. schleiferi*, é uma espécie que se encontra associada a infeções da pele e otites em animais e até, ocasionalmente, em seres humanos (De Buck *et al.*, 2021), e não foram encontradas referências a mastites causadas por esta espécie.

### **3.2.1. Patogénese das mastites causadas por estafilococos coagulase-positivos**

De todos, os *S. aureus* destacam-se como os agentes etiológicos mais prevalentes nas mastites contagiosas. Devido à sua elevada patogenicidade (elevado número de genes codificantes de fatores de virulência e de resistência a antibióticos) causa infeções crónicas, difíceis de tratar, de gravidade variável e com sintomatologia que pode ser localizada ou sistémica (Ibrahim *et al.*, 2022; Mahmoud *et al.*, 2015; Zafalon *et al.* 2008). Mas os estafilococos doutras espécies (estafilococos não-*aureus*) também podem ser importantes agentes patogénicos. Num estudo recente, Jenkins *et al.* (2019) identificaram 4 espécies de estafilococos adaptados ao úbere bovino, considerando duas delas como persistentes e contagiosas – o *S. chromogenes* (coagulase-variável) e o *S. simulans* (coagulase-negativo). O *S. chromogenes* tem sido apontado como a mais prevalente das espécies de estafilococos não-*aureus* em vacas e novilhas de leite. A infeção intramamária com *S. chromogenes* está associada a contagens de células somáticas elevadas e a mastite clínica. Parece apresentar maior tendência para causar infeções persistentes, com duração

que pode ser superior a 40 dias, do que outras espécies de estafilococos não-*aureus*. O papel que os diversos fatores de virulência desempenham nas infecções por *S. chromogenes* ainda não é bem conhecido. O *S. chromogenes* parece exercer uma influência negativa sobre a microbiota do úbere, reduzindo a sua diversidade e a estabilidade do microbioma deste órgão (De Buck *et al.*, 2021). As estirpes coagulase-positivas de *S. hyicus* parecem predominar nas fases finais da lactação e provocam infecções crônicas, de baixa gravidade. O *S. intermedius* tem baixa prevalência (Robertson *et al.*, 1996).

Há estudos que consideram que os estafilococos não-*aureus* são, nas explorações leiteiras atuais, a principal causa de infecções intramamárias (Piepers *et al.*, 2007; Timms *et al.*, 1987), apresentando prevalências especialmente elevadas nas infecções intramamárias em novilhas até à primeira lactação (De Buck *et al.*, 2021). Esta crescente importância dos estafilococos não-*aureus* poderá dever-se, pelo menos em parte, ao sucesso do controlo das infecções pelos patógenos clássicos (entre os quais o *S. aureus*), que poderá ter deixado aberto o caminho para patógenos emergentes (De Buck *et al.*, 2021). Em geral, os estafilococos não-*aureus* não são a principal causa de infecções intramamárias em explorações com contagens elevadas de células somáticas. Contrariamente ao que sucede nas infecções por *S. aureus*, as infecções por estafilococos não-*aureus* não parecem elevar consideravelmente estas contagens. Também não parecem afetar a produção leiteira, mas poderão afetar negativamente a qualidade do leite (De Buck *et al.*, 2021).

Em rebanhos que já têm as infecções intramamárias por *S. aureus* sob controlo, controlar as mastites clínicas e subclínicas por estafilococos não-*aureus* pode ser importante para conseguir reduzir ainda mais as contagens de células somáticas. Contudo, ainda não se sabe se as medidas aplicáveis ao controlo das mastites por *S. aureus* permitirão ou não controlar estes outros estafilococos, sendo necessário investigar melhor este aspeto (De Buck *et al.*, 2021).

Embora menos frequentemente do que o *S. aureus*, o *S. intermedius*, também tem sido isolado a partir do leite de animais com mastites. Os isolados de *S. intermedius* obtidos foram todos sensíveis à maioria dos antibióticos testados, incluindo às penicilinas (Getahun *et al.*, 2008).

O *S. agnetis* e o *S. hyicus* também têm sido associados a mastites bovinas, havendo dados que apontam para uma maior prevalência do primeiro destes estafilococos nas explorações leiteiras (Adkins *et al.*, 2017). O *S. hyicus* poderá, contudo, ter uma prevalência maior em explorações onde as infeções por *S. aureus* têm uma baixa incidência (Adkins *et al.*, 2017). O *S. hyicus* tem sido associado a infeções intramamárias crónicas, resultando em mastites subclínicas e em mastites clínicas de gravidade variável. Tem sido um dos organismos mais frequentemente isolados a partir das secreções da glândula mamária e da pele dos tetos de novilhas durante a primeira gravidez (Adkins *et al.*, 2017). O *S. agnetis* foi descrito muito recentemente por Taponen *et al.* (2012) e é difícil de distinguir laboratorialmente, com recurso a testes bioquímicos, do *S. hyicus*. A distinção entre as duas espécies pode ser feita com recurso a PCR multiplex (Adkins *et al.*, 2017).

O *S. pseudintermedius* é uma espécie de CoPS frequentemente associada a pioderma, otite e infeções do trato urinário de cães e gatos (Van Duijkeren *et al.*, 2011). Embora haja escassez de referências bibliográficas a mastites bovinas causada por *S. pseudintermedius*, num estudo realizado por Pilla *et al.* (2013) verificou-se uma prevalência muito baixa de quartos mamários infetados por esta bactéria, apesar da sua clara virulência, com uma resposta inflamatória relevante. Esta espécie caracteriza-se por possuir uma capacidade significativa de produzir biofilmes, um fator de virulência importante no estabelecimento de infeções intramamárias em vacas leiteiras (Pilla *et al.*, 2013).

A identificação correta da espécie de *Staphylococcus* implicada é importante do ponto de vista da gestão das mastites. Dependendo do plano de prevenção e controlo das mastites, as vacas diagnosticadas com *S. aureus* devem ser manuseadas de forma diferente daquelas em que foi diagnosticada a presença de estafilococos coagulase-negativos. Em relação às primeiras, deve considerar-se o uso de antibióticos intramamários, a separação destas vacas das restantes vacas lactantes do rebanho, a alteração da ordem de ordenha para evitar a propagação, a reavaliação dos métodos de controlo de moscas e, eventualmente, o abate (Ryman *et al.*, 2021).

Para diferenciar as espécies coagulase-positivas podemos adicionalmente aplicar o teste da produção de acetoína, característica chave para identificação da espécie *S. aureus*. A deteção da produção de acetoína é habitualmente feita pelo teste de Voges-Proskauer (VP). Um teste de VP positivo indica a presença de *S. aureus*, enquanto que

um resultado negativo que se trata de *S. intermedius* ou *S. hyicus*. Embora seja um teste de fácil execução e de baixo custo, tem a desvantagem da obtenção morosa dos resultados, devido à incubação prolongada, dificultando a sua aplicação rotineira no diagnóstico de mastites (Brito *et al.*, 2002).

Para a diferenciação destas espécies, Roberson *et al.* (1992) recomendaram a realização de um teste adicional – o teste de resistência à acrilflavina. Num estudo realizado por Brito *et al.* (2002), observou-se que todas as amostras de *S. aureus* foram resistentes à acrilflavina, enquanto as amostras de *S. hyicus* foram sensíveis, indicando assim a possibilidade e necessidade de se avaliar a sensibilidade à acrilflavina como teste adicional, para além dos testes da coagulase e da acetoina, para diferenciar os CoPS isolados de mastites bovinas. O teste de sensibilidade à acrilflavina tem a vantagem de ser um método rápido e simples, não exigindo grandes recursos laboratoriais (Brito *et al.*, 2002).

O teste da fermentação anaeróbica do manitol é também uma característica chave para a identificação da espécie *S. aureus*, que pode ser usado em complementaridade aos testes da coagulase, acetoina e resistência à acrilflavina (Brito *et al.*, 2002).

### **3.2.2. - Fatores de virulência associados aos estafilococos coagulase-positivos.**

Os estafilococos coagulase-positivos podem ter uma grande variedade de fatores de virulência (Almeida, 2009). Entre estes fatores, para além da coagulase anteriormente discutida, está a produção da catalase, fator este que é comum a todos os estafilococos. Os leucócitos neutrófilos polimorfonucleares (PMN), constituintes fundamentais do sistema imunitário inato, representam um aspeto importante da defesa do hospedeiro contra as infeções estafilocócicas. Os PMN destroem os estafilococos, habitualmente, através da exposição das células bacterianas fagocitadas à ação fortemente oxidante do peróxido de hidrogénio (Mandell, 1975). A catalase é uma proteína hémica enzimática produzida pelos estafilococos, que decompõe o peróxido de hidrogénio em água e oxigénio, neutralizando assim os seus efeitos bactericidas no interior dos leucócitos (Alfarela, 2020; Mandell, 1975; Reiner, 2010). A produção desta enzima pelas bactérias é considerada um dos mecanismos que os estafilococos virulentos têm para resistir á

destruição por estes fagócitos (Mandell, 1975). O teste da catalase é essencial para diferenciar as famílias *Micrococcaceae* e *Staphylococcaceae* (catalase positivas), de outros cocos Gram-positivos, pertencentes às famílias *Streptococcaceae*, como os *Streptococcus*, e *Enterococcus* (catalase negativos) (Reiner, 2010).

Entre os restantes fatores de virulência, destaca-se a produção de hemolisinas, proteínas bacterianas que têm como função ajudar o patógeno a obter nutrientes a partir dos tecidos do hospedeiro (Dinges *et al.*, 2000). As hemolisinas diferem entre si de acordo com a sua ação lítica sobre os eritrócitos. Na patogénese das infeções intramamárias, as mais importantes são as alfa- e beta-hemolisinas. A beta-hemolisina é uma esfingomielinase dependente do  $Mg^{2+}$  que degrada a esfingomielina presente na membrana celular, o que instabiliza esta estrutura celular, tornando-a suscetível aos efeitos de certos fatores ambientais adversos, tais como variações de temperatura, mudanças de pH e/ou da e carga iónica (Marques *et al.*, 2013; Sabini *et al.*, 2001). A alfa-hemolisina é um dos principais fatores de patogenicidade do *S. aureus*. Quando integrada nas membranas celulares dos mamíferos, forma heptâmeros cilíndricos, originando poros de diversos tamanhos com conseqüente alteração da permeabilidade seletiva. Provoca, assim, lise osmótica das células atingidas, formação de vacúolos e afeta as enzimas mitocondriais, interferindo com a produção de ATP. Laboratorialmente, a presença destes dois tipos de hemolisinas (hemólise) é detetada com recurso a meios de cultura aos quais é adicionado sangue. Estes testes laboratoriais permitem distinguir três tipos de hemólise. Os dois primeiros, beta- e alfa-hemólise, correspondem, respetivamente, à lise total das hemácias por ação das beta-hemolisinas e à degradação parcial das hemácias pelas alfa-hemolisinas. O último tipo, a gama-hemólise, corresponde, na verdade à ausência de hemólise (Silva *et al.*, 2012).

A capacidade de as bactérias degradarem o colagénio dos tecidos do hospedeiro constitui também um fator de virulência por lhes permitir disseminarem-se mais facilmente. Esta capacidade colagenolítica deriva da produção de uma enzima hidrolítica extracelular – a gelatinase – que é detetada laboratorialmente através do teste com o mesmo nome (Cruz *et al.*, 2012). A hidrólise da gelatina é detetada utilizando um meio de cultura à base de gelatina que, quando inoculado por picada com uma bactéria gelatinase positiva, irá apresentar liquefação após o período de incubação necessário. Como a gelatina é digerida, deixa de ser capaz de formar um gel estável e o meio permanece líquido quando submetido a baixas temperaturas, dentro de um frigorífico ou

num banho de gelo. Este teste permite distinguir o *S. aureus*, patogénico (gelatinase-positivo) de outros estafilococos, como o *S. epidermidis*, não patogénico (gelatinase-negativo) (Cruz *et al.*, 2012).

Outro dos fatores de virulência dos CoPS é a sua capacidade de formarem biofilmes. Para além dos biofilmes por COPS poderem constituir um grave problema na segurança e produção de alimentos, são um dos principais fatores de virulência em vários tipos de infeções (Alfarela, 2020). Os biofilmes são comunidades multicelulares, tipicamente rodeadas por uma matriz extracelular que fornece estrutura e proteção à comunidade. A alteração morfológica e metabólica que os microrganismos sofrem quando vivem nos biofilmes aumenta o seu sucesso na colonização do hospedeiro, torna mais forte a sua resistência e tolerância a uma série de antibióticos e a outros agentes antimicrobianos, aumentando ainda a sua a capacidade para se esquivarem às defesas do hospedeiro (Alfarela, 2020; O'Toole, 2010). Os mecanismos moleculares que induzem a formação de biofilmes variam muito entre espécies e até entre diferentes estirpes da mesma espécie (Alfarela, 2020). Mesmo considerando apenas quatro dos modelos bacterianos mais conhecidos (*E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus*, e *Bacillus subtilis*) as discrepâncias entre os processos envolvidos são vastas. No caso do *S. aureus*, a maioria das estirpes utiliza um polímero de N-acetil glucosamina (PNAG) para formar o biofilme. Outro mecanismo alternativo baseia-se na capacidade do *S. aureus* expressar uma variedade de proteínas de adesão (adesinas) que permitem às suas células fixarem-se e colonizarem diferentes superfícies (López *et al.*, 2010).

É ainda considerado um fator de virulência a capacidade que os CoPS têm de produzir a enzima desoxirribonuclease (DNase), capaz de degradar o ácido desoxirribonucleico (DNA) (Alfarela, 2020; Weckman *et al.*, 1957). Em estudos preliminares observou-se que as estirpes coagulase positivas evidenciaram atividade DNase muito superior às estirpes coagulase negativas, estabelecendo-se assim uma estreita correlação de interesse prático entre a atividade da coagulase e a da DNase. A produção de DNase é, assim, um potencial critério de patogenicidade mais fiável do que outras reações fisiológicas habitualmente examinadas, tais como a fermentação do manitol, a gelatinase, a hemólise, ou a produção de pigmento dourado (Weckman *et al.*, 1957). O teste da DNase é normalmente usado na identificação do *S. aureus* e na sua diferenciação em relação a outros estafilococos negativos para a DNase, como o *S.*

*epidermidis*. Pode também ser utilizado na detecção da atividade de DNase noutros tipos de microrganismos (Alfarela, 2020).

Para além do seu impacto na saúde, bem-estar e produtividade do animal, os *S. aureus* associados às mastites bovinas podem produzir enterotoxinas estafilocócicas, que são responsáveis por intoxicações alimentares e pela síndrome do choque tóxico nos seres humanos (Moon *et al.*, 2007). Não são, contudo, a única espécie de *Staphylococcus* capaz de produzir estas toxinas. Outras espécies de estafilococos coagulase-positivos, além do *S. aureus*, tais como o *S. hyicus* e o *S. intermedius*, são também produtoras de enterotoxinas (Valle *et al.*, 1990).

A capacidade de produção de uma ou mais enterotoxinas é observável em 30 a 50% das estirpes de *S. aureus*. A coprodução de diferentes tipos de toxinas desempenha um papel importante na patogénese das mastites causadas por estes agentes. Refai *et al.* (1998) demonstrou a relação e a associação entre a produção de enterotoxinas, a atividade enzimática, e a resistência a vários antibióticos, principalmente nas espécies produtoras de diferentes tipos de enterotoxinas simultaneamente. Constatou-se em vários estudos a presença de enterotoxinas estafilocócicas no leite e em produtos lácteos. Takeuchi *et al.*, 1998 demonstrou que 75,4% dos isolados de *S. aureus* obtidos a partir de tanques de expansão utilizados para o arrefecimento e armazenagem de leite tinham a capacidade de produzir enterotoxinas. Já Ng *et al.* (1993) constataram no seu estudo que 32,5% dos isolados de *S. aureus* provenientes de amostras de leite fresco produziam enterotoxinas. A possibilidade de eliminação das toxinas estafilocócicas dos alimentos contaminados através de processos como a pasteurização ou esterilização industrial, ainda não está claramente compreendida, sendo escassas as referências sobre este assunto (Fagundes, *et al.*, 2004).

Todos os fatores de virulência destes agentes patogénicos são fundamentais na adesão da bactéria ao epitélio da glândula mamária e subsequente colonização, conduzindo à sua persistência nos tecidos do hospedeiro (Ibrahim *et al.*, 2022).

### **3.2.3. - Prevenção das mastites causadas por estafilococos coagulase-positivos**

Existem vários fatores de risco conhecidos que se sabe estarem associados à invasão da glândula mamária pelos estafilococos coagulase-positivos e consequentemente inflamação. Podem ser fatores de risco associados ao animal (raça, idade, fase da lactação, morfologia e lesões do úbere e tetos, higiene do úbere e tetos, estado de nutrição, genética, ocorrência de outras doenças), fatores de risco ambientais (higiene e manejo das instalações e da ordenha, estação do ano) e fatores de risco relacionados com o agente patogénico. Conhecer e identificar todos estes fatores de risco é importante para o desenvolvimento de programas de prevenção e controlo das mastites (Cheng *et al.*, 2020; Pacheco, 2015). A prevenção de mastites por estafilococos coagulase-positivos consiste principalmente em minimizar e eliminar as condições que contribuem para que as bactérias penetrem e contaminem a glândula mamária (Petersson-Wolfe *et al.*, 2010). O uso de luvas pelos ordenhadores; descartar os primeiros jatos de leite de cada quarto; lavar os tetos com uma solução higienizante, caso se encontrem muito sujos; usar baixos volumes de água; emergir o teto num desinfetante testado, antes e pós ordenha; examinar as extremidades dos tetos em busca de fissuras ou lesões que permitam a entrada de bactérias causadoras de mastite; lavar as tetinas com agente desinfetante adequado após cada ordenha e secar; estabelecer uma hierarquia de ordenha em que as vacas não infetadas na primeira lactação sejam ordenhadas antes das vacas mais velhas e portadoras de mastites subclínicas; proceder à manutenção das máquinas de ordenha; são algumas das medidas preventivas que podem aplicar-se para o controlo das mastites (Cheng *et al.*, 2020; Pacheco, 2015; Petersson-Wolfe *et al.*, 2010). Além disso, a suplementação da dieta com vitamina E e selénio, vitamina A e beta-caroteno, bem como garantir um teor equilibrado de cobre e zinco na dieta das vacas leiteiras aumentam a resistência do animal a este tipo de infeções (Petersson-Wolfe *et al.*, 2010).

Já o tratamento é feito com uso de antibióticos por via intramamária e permite a obtenção de bons resultados na cura das vacas (Cheng *et al.*, 2020; Teixeira *et al.*, 2008).

Pensa-se que 80% dos antibióticos utilizados em gado leiteiro em todo o mundo são administrados para o controlo e tratamento de mastites (Saini *et al.*, 2012; Ganda *et al.*, 2016). A eficácia do tratamento em geral depende da deteção atempada do agente patogénico envolvido e do antibiótico selecionado (Owens *et al.*, 1997; Sol *et al.*, 2000;

Gillespie *et al.*, 2002). O antibiótico adequado é aquele que é capaz de interferir nas funções vitais da bactéria, sem comprometer as células do hospedeiro (Silver, 2011). Segundo Bartlett *et al.* (1992) não é possível identificar a presença de um agente bacteriano em 10 a 40% dos casos de mastite, por isso, nestes casos, os antibióticos são provavelmente inúteis. Em alguns casos muito graves, o isolamento e o abate do animal afetado poderão ser as melhores opções.

### **3.3. - Quimioterapia antibacteriana de mastites bovinas**

Os antibióticos convencionais são compostos químicos naturais, produzidos por microrganismos, ou sintéticos que inibem o crescimento e a sobrevivência de outros microrganismos (Walsh, 2016). Têm sido fulcrais no tratamento e prevenção de infecções humanas e atualmente são também largamente utilizados na produção animal (Ben *et al.*, 2019). Os antibióticos podem ser classificados em diferentes classes consoante os seus mecanismos de ação sobre célula bacteriana (Kapoor *et al.*, 2017).

#### **3.3.1. - Atuação a nível da parede celular**

A maioria das células bacterianas são envolvidas por uma camada rígida de peptidoglicano, que as protege da lise osmótica resultante dos meios hipotónicos em que muitas vivem e das condições ambientais frequentemente difíceis em que elas se encontram. Para sua própria sobrevivência, as bactérias sintetizam o peptidoglicano através das enzimas PBPs (proteínas de ligação à penicilina), transglicosilases e transpeptidases (Etebu *et al.*, 2016). Estas últimas duas enzimas desempenham papéis muito fulcrais ao permitirem a ligação cruzada da porção D-alanil-alanina da cadeia de peptídeos a resíduos de glicina na presença de proteínas de ligação à penicilina (PBPs). Esta ligação cruzada reforça a parede celular das células bacterianas (Kappor *et al.*, 2017).

#### **Antibióticos beta-lactâmicos**

Os beta-lactâmicos são um grupo de antibióticos que se caracterizam por possuir um anel beta-lactâmico, constituído por 3 átomos de carbono e um de nitrogénio, podendo apresentar diversos radicais substituintes que o tornam ativo. O anel beta-lactâmico

determina o mecanismo de ação destes antibióticos, sendo este a nível da parede celular com a inibição da síntese do peptidoglicano (Azevedo, 2014). As PBP interagem com o anel beta-lactâmico que, por imitar a porção D-alanina da cadeia polipeptídica do peptidoglicano, as bloqueia e indisponibiliza para a síntese de novas porções da parede celular. A ausência das ligações químicas do peptidoglicano induzidas pelos antibióticos beta-lactâmicos, causa a rotura da parede celular, e conseqüentemente, a lise celular (Kappor *et al.*, 2017). Para além da elevada eficácia terapêutica que os antibióticos beta-lactâmicos têm devido ao seu mecanismo de ação, estes antibióticos estão também associados a baixa toxicidade direta, uma vez que nas células humanas, eucarióticas, não está presente a parede celular que é o seu alvo de atuação (Azevedo, 2014). As bactérias podem adquirir resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos através da produção de beta-lactamases, enzimas capazes de destruir o anel beta-lactâmico (Salazar, 2011).

Apesar de todos os antibióticos beta-lactâmicos possuírem o anel beta-lactâmico, podemos estabelecer várias classes nesta família de antibióticos, consoante a sua estrutura química, espetros de ação e resistência às beta-lactamases. Os membros desta classe são as penicilinas, as cefalosporinas, os monobactâmicos e os carbapenemos (Alfarela, 2020; Azevedo, 2014).

Na estrutura geral das **penicilinas**, o anel beta-lactâmico apresenta-se fundido com um anel tiazolidínico contendo uma cadeia lateral (Gonçalves, 2019). São dos antibióticos mais importantes e foram os primeiros a serem desenvolvidos e aplicados no tratamento de doenças infecciosas. São eficazes contra vários bacilos, cocos Gram-positivos e Gram-negativos. No entanto, atualmente têm a desvantagem de serem suscetíveis à ação das beta-lactamases e serem rapidamente eliminadas pelo organismo. Por este motivo, foram sintetizadas novas moléculas menos sensíveis à ação das penicilinas, adicionando-lhes um composto volumoso, de forma a proteger o anel beta-lactâmico. Assim, nasceram a meticilina, a nafcilina, as isoxazolilpenicilinas, as aminopenicilinas, as ureidopenicilinas e as carboxipenicilinas (Azevedo, 2014).

No grupo das **cefalosporinas**, o anel beta-lactâmico encontra-se fundido com um anel di-hidrotiazínico, e contém dois radicais principais (Gonçalves, 2019). As cefalosporinas podem dividir-se em 5 grupos de acordo com a sua atividade antimicrobiana, denominados cefalosporinas de 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup> e 5<sup>a</sup> geração. As cefalosporinas de 1<sup>a</sup> geração apresentam um espectro de atuação mais estreito, sendo mais ativas sobre bactérias Gram-positivas. As cefalosporinas de 2<sup>a</sup> geração são menos ativas

contra bactérias Gram-positivas, mas são mais eficazes em bactérias Gram-negativas produtoras de beta-lactamases. As de 3ª geração apresentam um espectro de atividade mais alargado contra bactérias Gram-negativas do que as de 1ª e 2ª geração, no entanto são menos ativas para Gram-positivas. As cefalosporinas de 4ª geração apresentam a mesma atividade para bactérias Gram-negativas, mas são mais ativas sobre bactérias Gram-positivas, comparativamente às de 3ª geração. São também mais resistentes à degradação por beta-lactamases. A 5ª e última geração, tem enorme potencial devido ao seu espectro de ação contra bactérias multirresistentes como os estafilococos meticilino-resistentes e são ligeiramente diferentes dos restantes beta-lactâmicos no que toca aos mecanismos de ação (Azevedo, 2014; Climeni, 2009; Salazar, 2011). No Quadro 3.2. expõem-se alguns exemplos de antibióticos de cada geração de cefalosporinas.

**Quadro 3.2.** - Exemplos de antibióticos de cada geração de Cefalosporinas.

1ª Geração	2ª Geração	3ª Geração	4ª Geração	5ª Geração
Cefalotina	Cefamandol	Cefotaxima	Cefepime	Ceftaroline
Cefaloridina	Cefaclor	Cefsulodina	Cefpiroma	Ceftobiprole
Cefradina	Cefuroxima	Ceftazidima		
Ceradoxil	Cefonicida	Cefoperazona		
Cefazolina	Cefoxitina	Ceftiaxona		
Cefalexina	Cefotetan	Cefixima		
Cefatrizina				

Adaptado de Azevedo, (2014).

No tratamento de mastites subclínicas em bovinos, sendo as bactérias Gram-positivas as principais causadoras, as cefalosporinas de 1ª geração são as mais indicadas. Não são tóxicas nem irritantes, persistindo após a aplicação em concentrações terapêuticas por um mínimo de 48 horas (Climeni, 2009). A utilização extensiva de cefalosporinas de 3ª geração em bovinos leiteiro para a prevenção e tratamento de mastites e outras doenças pode resultar no surgimento de *Enterobacteriaceae* produtoras de beta-lactamases de espectro alargado (ESBL Ent) (Balemi *et al.*, 2021).

Os **monobactams** são os únicos antibióticos beta-lactâmicos caracterizados por apresentarem o grupo 2-oxoazetidina-1-sufónico na sua estrutura. Embora não apresentem atividade contra cocos Gram-positivos, são ativos contra bactérias Gram-negativas aeróbia facultativas e possuem elevada estabilidade face à maioria das beta-lactamases (Azevedo, 2014).

Os **carbapenemos** apresentam-se com uma ligação insaturada do anel  $\beta$ -lactâmico a um anel de 5 membros, similar ao anel das penicilinas, e possuem ainda um grupo hidroxietil com configuração trans na cadeia lateral (Azevedo, 2014). Esta configuração química permite um maior espectro de ação contra as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, uma elevada penetração dos canais formados pelas porinas e uma grande resistência contra a maioria das beta-lactamases (Bradley *et al.*, 1999). No entanto, o uso inapropriado desta classe importante de antibióticos provocou um aumento da prevalência de estirpes resistentes esta família de antibióticos, devido à disseminação de carbapenemases localizadas em plasmídeos, que hidrolisam quase todos os tipos de  $\beta$ -lactâmicos, incluindo os carbapenemos (Queenan *et al.*, 2007).

### **Glicopéptidos**

Os antibióticos glicopeptídicos (vancomicina e teicoplanina) são constituídos por um peptídeo cíclico de 7 aminoácidos, aos quais estão ligados 2 açúcares, daí o nome glicopéptidos (Kang *et al.*, 2015). Eles não interagem nem bloqueiam nenhuma das enzimas envolvidas na síntese do peptidoglicano, mas ligam-se à porção correspondente à D-alanina, inibindo a utilização deste substrato pelas transglicosilases e transpeptidases que sintetizam o peptidoglicano (González *et al.*, 2010). Com o surgimento de bactérias multirresistentes, como os *Staphylococcus* meticilino-resistentes (MRSA), os antibióticos da classe dos glicopéptidos, representados principalmente pela vancomicina, são as principais alternativas terapêuticas para as infecções por agentes patogênicos Gram-positivos, como *Enterococcus* spp., *Clostridium difficile*, *S. aureus* e MRSA (Alfarela, 2020; González *et al.*, 2010). Comparativamente com as bactérias Gram-positivas, as bactérias Gram-negativas possuem uma parede celular mais resistente à atuação destes antibióticos, devido à camada externa de lipopolissacáridos, o que as torna intrinsecamente mais resistentes a estes medicamentos (González *et al.*, 2010). A vancomicina e a teicoplanina têm propriedades químicas e microbiológicas muito semelhantes, no entanto a teicoplanina tem uma semivida mais longa e é muito mais comum encontrar resistência a este antibiótico do que à vancomicina em estafilococos coagulase-negativos (Kang *et al.*, 2015). O primeiro caso de *S. aureus* resistente à vancomicina (VRSA) foi relatado em 2002. O VRSA transporta o operão *vanA* que codifica a hidrólise dos precursores d-ala-d-ala e a síntese do precursor d-ala-d-lactato, impedindo a ligação à vancomicina. No entanto, a incidência de VRSA tem sido, devido

à aptidão limitada dos plasmídeos enterocócicos do *S. aureus* para disseminarem o operão *vanA* (Vestergaard *et al.*, 2019).

### 3.3.2. - Inibidores da síntese proteica

Para se iniciar a síntese proteica, o DNA bacteriano é primeiramente copiado para uma molécula de RNA mensageiro através da enzima RNA polimerase, um processo conhecido como transcrição. Depois, nos ribossomas, a sequência de codões do RNA mensageiro é convertida na sequência de aminoácidos que compõem a proteína codificada, processo este que se designa por tradução. O ribossoma bacteriano 70S é composto por duas subunidades, nomeadamente a 30S que contém a porção 16s, codificada por um gene localizado no cromossoma bacteriano, e a 50S. É nestas subunidades que alguns antimicrobianos atuam, inibindo a síntese proteica (Alfarela, 2020; Etebu, *et al.*, 2016; Kapoor *et al.*, 2017). As principais classes de antibióticos inibidores da síntese proteica com interesse para este trabalho são os aminoglicosídeos, as tetraciclina, os macrólidos, as lincosaminas, as estreptograminas e as oxazolidinonas.

Os **aminoglicosídeos** são moléculas com carga positiva que interagem com o r-RNA 16S da subunidade ribossomal 30s, causando uma leitura errada na sequência de aminoácidos, o término prematuro da tradução, e a produção de proteínas que destroem a membrana celular, com a conseqüente morte celular. Para alcançar o ribossoma, onde atuam, estes antibióticos têm de atravessar o citoplasma, o que exige energia e oxigénio. Por esta razão, os aminoglicosídeos atuam meramente em condições aeróbicas (Kapoor *et al.*, 2017). Os aminoglicosídeos são particularmente potentes contra membros da família *Enterobacteriaceae*, incluindo *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella aerogenes* e *Enterobacter cloacae*. Apresentam também boa atividade contra o *S. aureus*, incluindo as estirpes resistentes à metilina e à vancomicina (VRSA) (Krause *et al.*, 2016).

Os antibióticos **tetraciclínicos** são bem conhecidos pelo seu amplo espectro de atividade, abrangendo uma vasta gama de bactérias Gram-positivas e negativas, espiroquetas, bactérias intracelulares obrigatórias, bem como protozoários parasitas. Ligam-se aos ribossomas bacterianos e interagem com o r-RNA 16S da subunidade ribossômica 30S, impedindo a tradução (Kapoor *et al.*, 2017; Grossman, 2016). A absorção da tetraciclina em células Gram-negativas, como a *E. coli*, ocorre passivamente

através dos poros OmpF e OmpC exteriores da membrana, muito provavelmente sob a forma de quelato Mg<sub>2</sub>p. A dissociação da tetraciclina do Mg<sub>2</sub>p permite que a forma fraca lipofílica, não carregada, se difunda através da membrana interna até ao citoplasma, onde pode ser complexada com magnésio. A absorção para o citoplasma é parcialmente dependente da energia, envolvendo difusão passiva, mas também por transporte ativo (Grossman, 2016). A resistência adquirida pelas bactérias à tetraciclina tem sido atribuída quer ao seu efluxo ativo, quer à proteção do seu alvo estrutural – o ribossoma bacteriano (Vestergaard *et al.*, 2019).

Os **macrólidos**, **lincosaminas** e **estreptograminas**, apresentam um mecanismo de ação semelhante. Estas classes de antibióticos afetam a fase inicial da síntese proteica. O seu alvo celular é a região 23S do r-RNA, localizado na subunidade ribossômica 50S, resultando num desprendimento prematuro das cadeias polipeptídicas, que ficam, assim, incompletas (Kapoor *et al.*, 2017). As bactérias podem adquirir resistência aos macrólidos, lincosamidas, e estreptograminas através da mutação do local alvo destes antibióticos – a porção 23S do RNA ribossômico bacteriano, por modificação do sítio alvo enzimático, por inativação enzimática do antibiótico e por efluxo ativo (Vestergaard *et al.*, 2019).

As **oxazolidinonas** são um novo grupo de antibióticos sintéticos. São ativos contra um amplo espectro de bactérias Gram-positivas, incluindo MRSA e VRSA. As oxazolidinonas atuam inibindo a subunidade ribossomal 50s, interferindo com a síntese proteica e inibindo, desta forma, o crescimento bacteriano. A linezolida, a primeira oxazolidinona disponível, já ganhou protagonismo na medicina devido às suas propriedades e à sua capacidade de penetração e acumulação nos tecidos, incluindo ossos, pulmões, hematomas e líquido cefalorraquidiano. A atividade da oxazolidinona não é afetada pela resistência das bactérias a outros inibidores da síntese proteica, no entanto, já foram relatados casos (raros) de resistência às oxazolidinonas devidas a alterações do r-RNA 23S (Bozdogan *et al.*, 2004).

### 3.3.3. - Alteração das membranas celulares

As polimixinas são os principais antibióticos que atuam desestabilizando a membrana citoplasmática das bactérias (Nogueira *et al.*, 2016). São moléculas surfactantes, constituídas por grupos básicos ( $\text{NH}_3^+$ ) e uma cadeia lateral de ácidos gordos (Franco *et al.*, 2015). Interagem com os lipopolissacarídeos (LPS) da membrana externa da parede celular Gram-negativa, desestabilizando-a, o que promove o aumento da permeabilidade e a libertação de componentes celulares, levando à morte da célula bacteriana (Nogueira *et al.*, 2016). Nos últimos anos, o uso das polimixinas reemergiu como terapia de resgate no tratamento de bacilos Gram-negativos multirresistentes.

Já existem relatos de resistência adquirida de bactérias Gram-negativas às polimixinas, no entanto, o mecanismo de resistência carece de mais estudos, pois não está completamente clarificado (Carvalho *et al.*, 2014).

### 3.3.4. - Inibição da síntese dos ácidos nucleicos

As **quinolonas** e **fluoroquinolonas** representam um grupo de antibióticos sintéticos, quimicamente semelhantes, altamente eficazes no tratamento de uma série de infecções de origem bacteriana, cuja atividade antibacteriana consiste em interferir com a síntese dos ácidos nucleicos, bloqueando a replicação dos mesmos. Os seus alvos são as enzimas topoisomerase II e topoisomerase IV das bactérias. Ao perturbarem as atividades destas enzimas, afetam negativamente a RNA polimerase o que, por sua vez, impede a síntese do RNA e a replicação do DNA (Etebu, *et al.*, 2016). O principal alvo destes antibióticos nas bactérias Gram-positivas é a topoisomerase IV, conferindo-lhes a grande afinidade por esta enzima uma maior potência contra bactérias Gram-positivas. A toxicidade seletiva deste tipo de antibióticos deve-se ao fato de as células dos mamíferos possuírem topoisomerase II, que tem menor afinidade pelas quinolonas do que a topoisomerase IV, presente nas células bacterianas (Kapoor *et al.*, 2017). O uso difundido de quinolonas, logo desde sua descoberta, contribuiu para o aumento crescente da incidência de estirpes resistentes. A resistência às quinolonas surgiu devido a mutações cromossômicas nos genes que codificam as enzimas topoisomerase II e topoisomerase IV. Além disso, pode ocorrer a redução da sua acumulação no interior da célula

bacteriana, quer devido à redução da permeabilidade na membrana externa a este antibiótico, quer à hiperexpressão das bombas de efluxo (Souza *et al.*, 2010).

### **3.3.5. - Inibição de vias metabólicas não existentes nos eucariotas**

As bactérias podem sintetizar o seu próprio ácido fólico, mas os eucariotas não conseguem fazê-lo. Há, por isso, antibióticos que tiram partido desta diferença metabólica entre as células do hospedeiro e as do agente infeccioso bacteriano. As **sulfonamidas** e o **trimetoprim** são antibióticos que inibem etapas distintas da síntese do ácido fólico. A ação antibacteriana das sulfonamidas baseia-se na inibição competitiva da enzima dihidropteroato sintetase (enzima bacteriana responsável pela ligação do ácido para-aminobenzoico ao difosfato dihidropteróico), inibindo a síntese do ácido fólico. O trimetoprim é um inibidor competitivo, potente e seletivo da enzima dihidrofolato redutase (enzima que reduz o ácido di-hidrofolóico a tetrahidrofolóico), interferindo com a síntese do ácido fólico. É um antibiótico que exerce um efeito sinérgico quando utilizado com uma sulfonamida (Alfarela, 2020; Franco *et al.*, 2015; Kapoor *et al.*, 2017). Quando em combinação, as sulfonamidas e o trimetoprim, que atuam em etapas diferentes da mesma via biossintética, atuam sinergicamente com baixas taxas de mutação (Kapoor *et al.*, 2017).

## **3.4. - O fenómeno da resistência aos antibióticos**

A resistência aos antibióticos é um processo natural que tem sido observado desde que os primeiros antibióticos foram descobertos, sendo que os genes que conferem a resistência a certas bactérias precedem em muito a utilização terapêutica deste tipo de medicamentos (O'Neill, 2016).

No entanto, o uso excessivo de antimicrobianos e a intensa pressão seletiva dos mesmos sobre a microbiota animal e dos ambientes agrícolas veio aumentar a taxa de aparecimento e disseminação de estirpes resistentes a antibióticos. Esta crescente resistência e a carência de novos antimicrobianos que possam combater as estirpes resistentes tem vindo a ser um problema atual (Abdi *et al.*, 2021; O'Neill, 2016;)

As bactérias podem ganhar resistência antimicrobiana (RAM) através de quatro principais mecanismos moleculares: modificação do alvo, modificação ou inativação enzimática do antibiótico, redução da absorção do medicamento pelas bactérias através da alteração da permeabilidade da membrana e do aumento do efluxo do composto (Alfarela, 2020; Laws *et al.*, 2019). Uma mesma bactéria pode possuir vários destes mecanismos, o que lhe permite adquirir uma elevada resistência a diversos antibióticos em simultâneo (Laws *et al.*, 2019).

Costuma classificar-se a RAM em RAM inata e RAM adquirida (Palma *et al.*, 2020). A RAM inata (resistência intrínseca) é o resultado de um processo evolutivo longo e lento, através do qual algumas bactérias adquirem uma insensibilidade inerente a certas classes de antibióticos, por possuírem naturalmente qualquer dos mecanismos acima referidos, sem estarem sujeitas à pressão artificial de seleção representada pelo tratamento antimicrobiano. É necessária para a sobrevivência e evolução de microrganismos patogénicos e não patogénicos em ambientes dinâmicos (Palma *et al.*, 2020; Laws *et al.*, 2019;). Os principais mecanismos da resistência bacteriana intrínseca dependem da impermeabilidade da célula bacteriana à molécula do antibiótico (por exemplo, propriedades físico-químicas das moléculas, presença de bombas de efluxo etc.), da falta das moléculas alvo ou da inativação do antibiótico por meio de enzimas. A RAM adquirida é o resultado de uma adaptação “rápida”, resultante de uma pressão seletiva artificial – o tratamento antimicrobiano (Palma *et al.*, 2020).

A resistência aos antibióticos é transmitida entre bactérias através de evolução vertical (endógena) e evolução horizontal (exógena). A evolução vertical envolve a ocorrência de uma mutação espontânea do genoma bacteriano que confira à bactéria e à sua descendência uma maior resistência a um determinado composto. Este processo é muitas vezes gradual. A evolução horizontal envolve a transferência de um gene de resistência de uma bactéria resistente para uma bactéria sensível, através de mecanismos como a conjugação, a transdução e a transformação (Laws *et al.*, 2019). A conjugação envolve a transferência de plasmídeos de resistência (R) (Alfarela, 2020; Laws *et al.*, 2019). Os plasmídeos são como um importante reservatório de genes de resistência que podem ser fácil e eficazmente propagados, mesmo entre bactérias pertencentes a espécies e géneros diferentes. São responsáveis pela maior parte da propagação da resistência aos antibióticos (Palma *et al.*, 2020). A transformação envolve a alteração do genoma

bacteriano através da captação e incorporação do DNA exógeno. Por fim, a transdução implica a transferência de DNA bacteriano através de um vetor viral (Laws *et al.*, 2019).

Estes mecanismos de transferência podem conduzir a consequências devastadoras, uma vez que um mecanismo de resistência adquirido por bactérias menos problemáticas pode propagar-se para bactérias mais perigosas (Laws *et al.*, 2019).

Os perfis de resistência a antibióticos no género *Staphylococcus* parecem ser dependentes da espécie, mas há ainda falta de estudos sobre o perfil de resistência a antibióticos dos estafilococos não-*aureus* para que se possa esclarecer mais cabalmente esta relação. O *S. chromogenes*, por exemplo, parece ter uma menor prevalência de fenótipos e de genótipos resistentes a antibióticos do que outras espécies de estafilococos não-*aureus* (Buck *et al.*, 2021).

### **3.4.1. – O desafio do *S. aureus* meticilino-resistente (MRSA)**

Vários estudos indicam a crescente resistência dos estafilococos coagulase-positivos aos antibióticos, especialmente à penicilina. Foi detetada uma elevada percentagem de isolados de *S. aureus* resistentes à penicilina em todos os países europeus, com exceção da França, em que a percentagem foi inferior a 10% (Hendriksen *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2015).

Com a utilização excessiva e irracional da penicilina a partir da década de 50, a maioria (94%) das estirpes de *S. aureus* tornaram-se resistentes à penicilina e seus derivados, devido à produção da enzima  $\beta$ -lactamase (Algammal *et al.*, 2020; Guo *et al.*, 2020). Mais tarde, para contornar o problema, foi desenvolvida uma nova penicilina semissintética – a meticilina – resistente à ação das  $\beta$ -lactamases produzidas pelo *S. aureus*.

Porém, acabaram por surgir também relatos de estirpes de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA - Multiple-resistant *Staphylococcus aureus*) (Gelatti *et al.*, 2009). Este mecanismo de resistência à meticilina deve-se a uma proteína de ligação à penicilina modificada (PBP2a), plenamente funcional, mas que tem uma baixa afinidade pelos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (Gelatti *et al.*, 2009; Khairullah *et al.*, 2020). A forma mais segura de comprovar esta resistência é através da deteção por PCR do gene *mecA*, que codifica a PBP2a, responsável por conferir a (Algammal *et al.*, 2020; Cheng *et al.*, 2020;

Khairullah *et al.*, 2020), embora tenha sido desenvolvido um meio de cultura diferencial, o meio de ORSAB, que permite a detecção preliminar da resistência à meticilina por intermédio da resistência a outro antibiótico do mesmo tipo, a oxacilina (Simor *et al.*, 2001). Podem ser distinguidos padrões fenotípicos e moleculares entre *S. aureus* sensível à meticilina (MSSA) e *S. aureus* resistente à meticilina MRSA (Algammal *et al.*, 2020).

Para além da resistência à meticilina, as estirpes MRSA são também resistentes à cefoxitina (Algammal *et al.*, 2020) e tornaram-se rapidamente as mais frequentemente identificadas em muitas partes do mundo, incluindo a Europa, Estados Unidos, Norte de África, Médio Oriente e Ásia Oriental (Mediavilla *et al.*, 2012).

Como a resistência do *S. aureus* à meticilina e a taxa de infeção por MRSA têm aumentado a nível mundial, a quimioterapia anti-infeciosa com antibióticos  $\beta$ -lactâmicos tornou-se cada vez mais difícil (Algammal *et al.*, 2020; Khairullah *et al.*, 2020). Existem tratamentos alternativos que implicam a utilização de vancomicina, daptomicina e linezolida, embora muitos estudos tenham ilustrado a resistência de estirpes de MRSA que também resistem a estes antibióticos de nova geração (Algammal *et al.*, 2020).

De acordo com a sua proveniência, as estirpes de MRSA podem ser classificadas em MRSA adquirido no hospital (HA-MRSA) e MRSA adquirido na comunidade (CA-MRSA) (Algammal *et al.*, 2020; Guo *et al.*, 2020). Enquanto agente infeccioso, o CA-MRSA causa geralmente infeções ligeiras, tais como infeções comunitárias da pele e tecidos moles, mas é considerado preocupante, pois a morbidade destas infeções tem vindo a aumentar em todo o mundo e o tratamento empírico das infeções estafilocócicas é apenas realizado com antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos, aos quais estas estirpes são resistentes. A CA-MRSA é geneticamente diferente da HA-MRSA por possuir um elemento genético denominado cassete cromossómica estafilocócica *mec* (*SCCmec*) (Algammal *et al.*, 2020; Gelatti *et al.*, 2009).

Um terceiro tipo de MRSA é o MRSA associado à pecuária (LA-MRSA), que afeta um amplo leque de animais domésticos (Algammal *et al.*, 2020). A incidência de MRSA em animais foi relatada pela primeira vez na Bélgica, nos anos 70, em vacas leiteiras (Khairullah *et al.*, 2020). Atualmente a colonização do úbere das vacas leiteiras por MRSA é frequente e resulta em mamite subclínica com graves perdas económicas (Algammal *et al.*, 2020).

Estas estirpes produzem infeções com uma variedade de aspetos em variadas espécies de animais domésticos e pecuários, sendo principalmente descrita como causadora de mamites em vacas leiteiras (Pérez *et al.*, 2020).

As estirpes de MRSA em animais não são apenas prejudiciais para a saúde animal e a economia. A elevada prevalência de MRSA no leite cru de animais clinicamente saudáveis, o contacto direto de animais infetados com veterinários e agricultores constituem também uma grande ameaça para a saúde pública, uma vez que as estirpes virulentas de MRSA podem chegar à cadeia alimentar e ser transmitidas aos seres humanos causando doenças graves (Algammal *et al.*, 2020; Pérez *et al.*, 2020). O MRSA pode induzir no ser humano doenças infecciosas de elevada gravidade, tais como endocardite piogénica, pneumonia supurativa, otite média, osteomielite, infeções piogénicas da pele e dos tecidos moles, bem como artrite séptica (Gajdács *et al.*, 2019).

É por isso muito importante a cooperação entre as autoridades de saúde e autoridades veterinárias na vigilância contínua da sensibilidade a este antibiótico, fundamental para o desenvolvimento de estratégias de tratamento das infeções por MRSA. Para além disso são necessárias outras medidas para a prevenção das infeções por MRSA, tais como a sensibilização sanitária pública, práticas gerais de higiene veterinária, bem como a implementação de quarentena dos animais infetados e de medidas de biossegurança (Algammal *et al.*, 2020).

A monitorização dos padrões de RMA dos isolados bacterianos dos ambientes agrícolas e, em especial, dos casos de mastite é essencial, quer na decisão do tratamento, quer para determinar potenciais reservatórios de resistência nas explorações leiteiras (Abdi *et al.*, 2021).

### **3.5. – A resistência a antibióticos e o conceito de “One Health”**

A rede complexa de interações que ocorrem entre espécies bacterianas de diversos “ambientes” facilitam o fluxo génico, propagando a resistência antimicrobiana entre animais, humanos e meio ambiente, causando problemas à escala global (Palma *et al.*, 2020). Para enfrentar a resistência antimicrobiana, numerosos países e várias agências internacionais incluíram agora nos seus planos de ação uma abordagem coordenada e multi-sectorial chamada de *One Health*, um conceito que se baseia na interdependência mútua entre pessoas e animais, no reconhecimento de que partilham o mesmo ambiente e muitas doenças infecciosas, e na adoção de políticas e programas em que múltiplos sectores trabalham em conjunto para alcançar melhores resultados de saúde pública. Neste conceito de *One Health* faz sentido abordar o problema da resistência aos

antibióticos como sendo um problema ecológico que se caracteriza por interações complexas, envolvendo diversas populações microbianas que afetam a saúde dos seres humanos, dos animais e do ambiente (Collignon, 2019).

## **IV – Materiais e métodos**

### **4.1. – Design do estudo**

Foi realizado um estudo de corte transversal numa exploração bovina leiteira, envolvendo 58 vacas saudáveis e em lactação à data da colheita. A recolha das amostras, leite, ocorreu num período de quatro meses, entre outubro de 2021 e fevereiro de 2022, em 5 sessões, cada uma envolvendo 10 a 15 vacas. A amostragem foi realizada durante a ordenha da tarde (16:00 h).

#### **4.1.1. - Caracterização da exploração**

O ensaio foi realizado numa exploração de bovinos leiteiros da ilha Terceira (Chegalvorada - Produção, Exploração E Gestão Agrícola, Unipessoal, Lda), exploração criada na década de 1970 para dar apoio ao Departamento de Ciências Agrárias e do Ambiente no Campus de Angra do Heroísmo da Universidade dos Açores. Está localizada em Achada, Porto Judeu, Angra do Heroísmo (38,6979° N 27,1708°O) a uma altitude média de 370 metros em relação ao nível do mar. A exploração conta com uma área de 46,72 hectares (aproximadamente 467 alqueires). Contém uma sala de ordenha mecânica, em dupla espinha (4×4), um pavilhão com viteleiro, estábulo de recria e acabamento de animais, bem como parques de alimentação. A exploração possuía, no período da realização do estudo, um encabeçamento médio de 1,5 CN/ha, com uma média de 40 a 50 vacas leiteiras em ordenha, criadas em regime de pastoreio semi-extensivo, sendo 70% de raça Tipo Frísia e 30% da raça Jersey. No ano de 2021, esta exploração obteve uma produção acumulada de 443 927 litros de leite.

#### **4.1.2. - Caracterização dos animais**

Neste estudo foram incluídas 58 vacas em lactação, com idades compreendidas entre 2 a 8 anos de idade. O Quadro 4.1. apresenta as características das 58 vacas amostradas.

**Quadro 4.1.** - Características das 58 vacas amostradas.

<b>Vaca</b>	<b>Raça</b>	<b>Idade à data da colheita</b>	<b>N.º de lactações na colheita</b>	<b>Dias em lactação na colheita</b>	<b>Produção de Leite (Kg) aos 305 dias</b>
0367	Tipo Frísia	8 Anos, 7 Meses e 11 Dias.	6	305	10633
0398	Tipo Frísia	7 Anos, 10 Meses e 7 Dias.	6	85	8014
0457	Tipo Frísia	8 Anos, 0 Meses e 18 Dias.	5	239	9482
0508	Tipo Frísia	2 Anos, 6 Meses e 16 Dias.	1	126	7889
0509	Tipo Frísia	2 Anos, 6 Meses e 12 Dias.	1	92	6209
0513	Tipo Frísia	2 Anos, 3 Meses e 25 Dias.	1	66	6317
0517	Tipo Frísia	2 Anos, 5 Meses e 9 Dias.	1	36	6213
0525	Tipo Frísia	2 Anos, 3 Meses e 17 Dias.	1	26	11030
1999	Tipo Frísia	6 Anos, 6 Meses e 14 Dias.	3	222	7455
3756	Tipo Frísia	2 Anos, 7 Meses e 12 Dias.	1	208	7151
3757	Jersey	2 Anos, 9 Meses e 15 Dias.	1	118	5718
3763	Tipo Frísia	2 Anos, 8 Meses e 28 Dias.	1	172	6400
3765	Tipo Frísia	2 Anos, 5 Meses e 28 Dias.	1	66	7922
3772	Tipo Frísia	2 Anos, 7 Meses e 3 Dias.	1	108	7292
3775	Jersey	2 Anos, 6 Meses e 24 Dias.	1	36	6363
4001	Jersey	3 Anos, 6 Meses e 25 Dias.	2	14	7170
4007	Tipo Frísia	3 Anos, 7 Meses e 20 Dias.	2	127	6616
4018	Tipo Frísia	3 Anos, 2 Meses e 21 Dias.	1	227	8297
4020	Tipo Frísia	3 Anos, 1 Meses e 11 Dias.	1	279	7168
4307	Tipo Frísia	4 Anos, 8 Meses e 13 Dias.	2	487	10705
4325	Jersey	4 Anos, 0 Meses e 24 Dias.	2	209	5449
5238	Tipo Frísia	2 Anos, 3 Meses e 2 Dias.	1	117	6857
5556	Tipo Frísia	7 Anos, 2 Meses e 8 Dias.	4	340	11026
6172	Tipo Frísia	6 Anos, 0 Meses e 9 Dias.	4	226	8153
6182	Jersey	6 Anos, 2 Meses e 8 Dias.	4	209	8497
6187	Tipo Frísia	5 Anos, 9 Meses e 22 Dias.	3	423	10069
6203	Tipo Frísia	5 Anos, 8 Meses e 28 Dias.	4	265	9067
6263	Jersey	4 Anos, 4 Meses e 9 Dias.	2	400	7376
6265	Jersey	4 Anos, 3 Meses e 11 Dias.	2	35	7693
6336	Tipo Frísia	5 Anos, 5 Meses e 18 Dias.	3	27	9816
6343	Tipo Frísia	5 Anos, 2 Meses e 24 Dias.	3	274	7750
6350	Jersey	5 Anos, 0 Meses e 11 Dias.	3	151	7152
6356	Tipo Frísia	4 Anos, 11 Meses e 19 Dias.	3	231	8156
6362	Tipo Frísia	4 Anos, 11 Meses e 5 Dias.	3	81	8158
6363	Tipo Frísia	5 Anos, 1 Meses e 14 Dias.	3	173	8707
6364	Tipo Frísia	5 Anos, 1 Meses e 7 Dias.	2	370	9198
6365	Jersey	4 Anos, 10 Meses e 20 Dias.	3	114	7180
6367	Jersey	5 Anos, 0 Meses e 0 Dias.	3	35	6827
6368	Jersey	4 Anos, 9 Meses e 29 Dias.	3	209	7948
6369	Tipo Frísia	5 Anos, 0 Meses e 6 Dias.	3	183	6279

Vaca	Raça	Idade à data da colheita	N.º de lactações na colheita	Dias em lactação na colheita	Produção de Leite (Kg) aos 305 dias
6385	Tipo Frísia	4 Anos, 5 Meses e 1 Dias.	3	206	7858
7131	Tipo Frísia	3 Anos, 10 Meses e 20 Dias.	2	103	7984
7142	Tipo Frísia	3 Anos, 10 Meses e 10 Dias.	2	102	10126
7146	Jersey	3 Anos, 9 Meses e 15 Dias.	2	127	6217
7214	Tipo Frísia	3 Anos, 1 Meses e 12 Dias.	1	312	8021
7215	Tipo Frísia	3 Anos, 4 Meses e 11 Dias.	1	392	7334
7218	Tipo Frísia	3 Anos, 2 Meses e 22 Dias.	2	15	8364
7219	Tipo Frísia	2 Anos, 10 Meses e 13 Dias.	1	209	7216
7226	Tipo Frísia	2 Anos, 8 Meses e 6 Dias.	1	216	7156
7228	Tipo Frísia	2 Anos, 8 Meses e 22 Dias.	1	150	5575
7819	Tipo Frísia	3 Anos, 8 Meses e 29 Dias.	2	119	6816
7821	Tipo Frísia	3 Anos, 8 Meses e 29 Dias.	2	181	5933
7822	Tipo Frísia	3 Anos, 10 Meses e 25 Dias.	2	307	6594
8379	Frísia	6 Anos, 8 Meses e 19 Dias.	5	44	9920
9311	Tipo Frísia	4 Anos, 11 Meses e 14 Dias.	2	254	7417
9326	Frísia	4 Anos, 7 Meses e 7 Dias.	2	272	7838
9330	Frísia	4 Anos, 6 Meses e 0 Dias.	2	246	6628
9847	Tipo Frísia	5 Anos, 8 Meses e 25 Dias.	3	145	8926

No geral, as vacas amostradas encontravam-se saudáveis, com poucos registos de mastites clínicas. No Quadro 4.2. estão representados todos os casos de mastites clínicas existentes nas vacas amostradas durante o período de realização do estudo, bem como as medicações administradas. À data da colheita, todas as situações de mastite clínica encontravam-se resolvidas.

**Quadro 4.2.** - Registos de mastites clínicas nas vacas amostradas, e respetivas medicações.

Vaca	Registo	Dt. intervenção	Nome do medicamento	QTd.	Intervalo Segurança Max. (Leite)
6363	Retenção Placentária e Mamite	21/08/2021	Recocam (100ml)	18 CC	3 dias
			YMCP-Fresh CoW (pasta)	1 INJ	
			Terramicina Intra-Uterina	2 CP	
			Cruxial 10% (100ml)	39 CC	
			Bioestrovect (20ml)	5 CC	
			Vitalbion (100ml)	10 CC	
			Kexxtone (cx. 40 bolos)	1 UN	
			Selepherol (100 ml)	20 CC	
6369	Mamite	08/11/2021	Rimadyl Bovinos (50ml)	20 CC	0 dias
3763	Mamite ambiental	08/11/2021	Rimadyl Bovinos (50ml)	20 CC	0 dias

Vaca	Registo	Dt. intervenção	Nome do medicamento	QTd.	Intervalo Segurança Max. (Leite)
3772	Mamite	02/03/2022	Dinalgen 150 (100ml)	45 CC	0 dias
			Hemosilate (20ml)	20 CC	
3772	Mamite	07/03/2022	Cobactan 2,5% (100ml)	100 CC	5 dias
			Melovem 3% (100ml)	24 CC	
			Rimadyl Bovinos (50ml)	20 CC	
3772	Mamite	14/03/2022	Vetacort (50ml)	50 CC	4 dias
3772	Mamite	19/03/2022	Rimadyl Bovinos (50ml)	22 CC	0 dias

A ordenha das vacas é realizada duas vezes ao dia, uma de manhã (6:30h) e uma de tarde (16:00h). No período entre ordenhas as vacas permanecem no pasto, alimentando-se *ad libitum* de erva fresca, maioritariamente plantas das espécies *Lolium multiflorum*, *Lolium perenne*, *Bromus catharticus*, e trevos, geralmente *Trifolium repens*. Ademais, a sua alimentação é suplementada, no momento da ordenha, com 200 g por litro de leite/dia de concentrado comercial. No inverno e no verão, para cobrir necessidades nutricionais, é fornecida silagem de erva e de milho.

## 4.2. – Descrição dos procedimentos de amostragem

O procedimento normal de ordenha inclui várias ações de limpeza e desinfecção que visam garantir a segurança do leite, bem como a saúde dos animais. Após a entrada dos animais na sala de ordenha, os primeiros jatos de leite são rejeitados, através de ordenha manual e cada um dos tetos do ubere é embebido, momentaneamente, numa solução desinfetante (PREFOAM+, Kersia, 072P0 PRT, France). Após alguns minutos, as tetinas são acopladas. Quando a ordenha termina, os tetos são embebidos noutra solução desinfetante (FILMADINE, Kersia, 070L0 PRT, France). Entre cada animal, as tetinas são submersas numa solução de (PERFO GRIF, Kersia, 0322S PRT, France) para desinfecção do equipamento. As fezes e urina do chão são regularmente limpas com jatos de água, entre a entrada de cada lote de animais. No final da ordenha a máquina de ordenha é limpa e desinfetada com (HYPROCLOR ED, HYPRED, UN1719, France) a uma concentração de 0,5%, a uma temperatura de 60°C durante 5 a 10 minutos. Semanalmente todo o equipamento de ordenha é limpo e desinfetado com (HYPRACID, HYPRED, UN3264, France) a uma concentração de 0,5% a uma temperatura de 60°C durante 10 minutos. Toda a instalação da sala de ordenha é lavada e desinfetada com (HYPRED FORCE 7,

Kersia, Espanha). O Quadro 4.3. indica os princípios ativos dos produtos de higienização empregues.

**Quadro 4.3.** - Princípios ativos dos produtos de higienização empregues.

<b>Produtos de higienização</b>	<b>Princípios ativos</b>
PREFOAM +	Ácido láctico a 1%
FILMADINE	Ácido láctico a 8%
PERFO GRIF	Ácido peracético a 1,25%
HYPROCLOR ED	Hipoclorito de sódio + soda cáustica a 0,5%
HYPRACID	Ácido fosfórico a 0,5%
HYPRED FORCE 7	Glutaraldeído + composto de amónio quaternário

#### **4.2.1. - Exame da glândula mamária**

Os animais em estudo foram clinicamente examinados a fim de detetar qualquer anomalia visível, inflamações, inchaço, dor, vermelhidão em cada teto e quarto do úbere no momento da recolha da amostra. Alterações morfológicas foram registadas quando presentes. Alterações na cor, odor e consistência do leite foram registadas, se presentes. Para o registo dos dados do exame da glândula mamária, utilizou-se o formulário apresentado no Anexo A.

#### **4.2.2. - Recolha de leite**

A recolha de leite para o ensaio foi realizada antes dos procedimentos normais da ordenha, anteriormente referidos. Após a entrada dos animais, os primeiros jatos de leite foram rejeitados. Em seguida, as aberturas dos tetos foram desinfetadas com algodão embebido em álcool etílico 70% (v/v). Seguidamente, as amostras de leite de cada quarto foram recolhidas assepticamente para tubos cónicos de plástico com 50 mL de volume, estéreis. Os frascos com as amostras foram identificados corretamente, mantidos em gelo em caixas de material isotérmico (isopor) e transportados para o Laboratório de Microbiologia na Faculdade de Ciências Agrárias e Ambiente da Universidade dos Açores em Angra do Heroísmo, imediatamente após o término da recolha. Todas as amostras foram processadas imediatamente após a chegada ao laboratório.

### 4.2.3. – Teste Californiano de Mastites

Seguindo o protocolo descrito por Balemi *et al.* (2021) a estimativa da contagem das células somáticas (CCS) no leite foi efetuada com recurso ao Teste Californiano de Mastites (TCM). O TCM é um dos testes mais usados no campo para o diagnóstico de mastite subclínica, e um indicador indireto do CCS no leite. Em resumo, foram recolhidos jatos de leite de cada um dos quartos funcionais do úbere diretamente a câmara correspondente da pá de TCM. Um volume igual de reagente TCM (KerbaTEST, KERBL, Alemanha) foi adicionado a cada câmara e misturado cuidadosamente, rodando suavemente a pá num movimento circular num plano horizontal durante 10 segundos à temperatura ambiente. O reagente do TCM tem uma ação detergente que provoca a lise das células e a gelificação do DNA livre. Pela observação da consistência é possível estimar a quantidade de células presentes no leite (Patrício *et al.*,2013).

O grau de gelificação foi avaliado numa escala de 0 a 5, e feito corresponder à contagem de células somáticas, de acordo com o Quadro 4.4.

**Quadro 4.4.** - Grau de gelificação, numa escala de 0 a 5, feito corresponder à contagem de células somáticas.

<b>Pontuação</b>	<b>Formação de gel</b>	<b>CCS x10<sup>3</sup></b>
<b>0</b>	Líquido, sem alteração da viscosidade	0 - 200
<b>1</b>	Ligeiro precipitado que tende a desaparecer com o movimento da pá	150 - 500
<b>2</b>	Precipitado moderado, que não gelifica com o movimento da pá	400 – 1000
<b>3</b>	Formação de gel moderada	800 – 5000
<b>4</b>	Formação de gel bem distinta, que tende a aderir à pá; toma forma convexa na zona central da pá	> 5000
<b>5</b>	Formação de gel bem distinta associado a visíveis alterações do leite (sangue ou muco)	> 5000

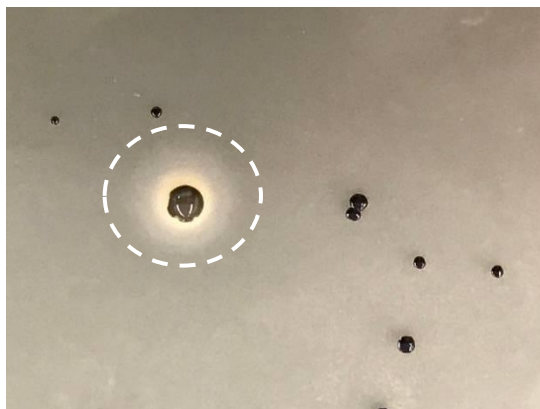
## 4.3. – Análise de amostras

### 4.3.1. – Isolamento de presumíveis *Staphylococcus aureus*

#### 4.3.1.1. Isolamento primário

A pesquisa de presumíveis *S. aureus* foi feita por plaqueamento à superfície de 100 µL de cada amostra de leite em Baird-Parker Agar (BPA, Biokar Diagnostics, BK055HA, France) com gema de ovo e telurito de sódio (Biokar Diagnostics, BS06008, France). A incubação das placas foi feita a  $35\pm 2$  °C, por 48 h. Foi preparada uma placa por cada amostra de leite, correspondente a um quarto do úbere de cada vaca em estudo.

Neste meio, a microbiota de acompanhamento é inibida pela presença de cloreto de lítio ( $5\text{ gL}^{-1}$ ) e de telurito de potássio ( $0,105\text{ gL}^{-1}$ ). O sistema inibidor do meio impede o desenvolvimento da maioria dos outros microrganismos presentes na amostra. Contudo, podem ocasionalmente observar-se micrococcos (colónias de cor castanha), leveduras (colónias brancas), *Bacillus* ou *Proteus* (colónias castanhas, desprovidas de brilho). As colónias de *S. aureus* distinguem-se destas por apresentam cor negra, devida à redução do telurito a telureto e encontram-se rodeadas por halos translúcidos devidos à proteólise da gema de ovo. Podem surgir zonas opacas no interior destes halos, que se devem à ação da lecitinase estafilocócica sobre a lecitina presente na gema de ovo (Biokar Diagnostics, 2016; Santos, 2008). Mostra-se, na Figura 2, o aspeto de uma colónia típica de *S. aureus* neste meio de cultura.



**Figura 2.** – Colónia típica de *S. aureus* em Baird-Parker Agar. A colónia típica está assinalada com um círculo.

#### 4.3.1.2. – Purificação e armazenagem dos isolados

Cada colónia seleccionada foi purificada em Brain Heart Agar (BHA, AES Laboratoire, AEB150402, France), através da realização de estrias sucessivas (Fig. 3). Quando os isolados cumpriam os requisitos de pureza (uniformidade da morfologia das colónias e da morfologia celular), foram repicados para rampas de BHA e para tubos de Brain Heart Infusion (BHI, OXOID LTD., CM1135, England). Após incubação por 48h a 37°C, as rampas foram armazenadas a 2 – 4°C, constituindo o *stock* de culturas a utilizar nos trabalhos seguintes. Os tubos de BHI foram incubados por 18 – 24h a 37°C. Após a incubação, homogeneizou-se o conteúdo de cada tubo no vórtex e retirou-se 800 µL de cada cultura para cada um de quatro criotubos contendo 200 µL de glicerol. Os criotubos foram depositados na coleção de culturas do IITAA, onde se encontram armazenados a –80°C.



**Figura 3.** – Purificação de um isolado em Brain Heart Agar (BHA, AES Laboratoire, AEB150402, France), através da realização de estrias sucessivas.

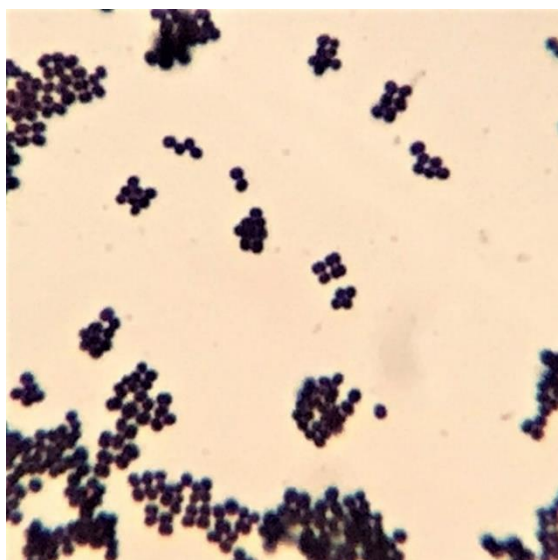
#### 4.3.2. – Confirmação da identidade dos isolados

Em concordância com o previsto na norma ISO 6888-1:2021 (ISO, 2021), a confirmação preliminar da identidade dos isolados foi feita através da determinação da morfologia celular, da reação ao Gram (em esfregaços corados pelo método de Gram), da catalase e da coagulase. Adicionalmente, testou-se ainda a fermentação do manitol (Kateete *et al.*, 2010).

Antes de realizar cada um destes testes, procedeu-se, para cada isolado, a três repicagens sucessivas em BHI, com incubação nas condições anteriormente indicadas. Sempre que o protocolo experimental exigia volumes consideráveis de inóculo, foram preparadas culturas em placas de BHA, incubadas nas condições anteriormente descritas.

#### 4.3.2.1. – Coloração de Gram

Procedeu-se à preparação de um esfregaço de cada cultura em estudo, fixou-se pelo calor e realizou-se a sua coloração pelo método de Gram, seguindo o protocolo da American Society for Microbiology (Smith *et al.*, 2005). Em cada lâmina, para além da cultura em estudo, preparou-se também um esfregaço com uma bactéria Gram-negativa (*Escherichia coli* ATCC 25922) e com uma bactéria Gram-positiva (*S. aureus* ATCC 9144), que funcionaram como controlo do processo de descoloração. Depois de coradas, as lâminas foram observadas ao microscópio ótico de fundo claro (Leica, CME). Fotografaram-se campos representativos de cada lâmina com uma câmara OMAX A3550S, nas quais se procedeu à medição do diâmetro das células, após calibração com um micrómetro American Optical de 10  $\mu\text{m}$  (divisões de 0,1  $\mu\text{m}$ ), tendo sido feita a captura de imagens, com auxílio do *software* ToUp View (OMAX) na ampliação de 1000 $\times$  e a medição do diâmetro das células de cada isolado.



**Figura 4.** – Morfologia celular típica de *S.aureus*

O *S. aureus* é Gram-positivo, pelo que assume coloração roxa no método de Gram e a morfologia celular típica é a de cocos, com aproximadamente 0,5 a 1,5  $\mu\text{m}$  de

diâmetro, que aparecem isolados, aos pares, em pequenas cadeias e, frequentemente, agrupados em agregados irregulares (estafilococos) (Fig. 4) (Rodrigues *et al.*, 2012).

#### 4.3.2.2. – Teste da catalase

A partir de cada isolado, previamente cultivado em placa de BHA, retirou-se uma amostra de uma colônia isolada e colocou-se numa placa de Petri limpa e seca. Sobre a amostra deixou-se cair uma gota de peróxido de hidrogénio a 30% e observou-se se ocorria (reação positiva) ou não (reação negativa) a formação de bolhas. Para além das culturas em estudo, fez-se também o teste da catalase com o *S. aureus* ATCC 9144 e com o *Streptococcus pyogenes* ATCC19615, que funcionaram, respetivamente, como controlos positivo e negativo.

O *S. aureus* produz a enzima catalase em abundância que, ao interagir com o peróxido de hidrogénio, resulta na produção e libertação de oxigénio molecular ( $2\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Catalase} \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ ), fato evidenciado pela rápida formação de efervescência (Alfarela, 2020; Mandell, 1975; Reiner, 2010). Mostra-se, na Figura 5, a formação imediata de bolhas, indicando que o isolado em estudo é catalase-positivo.

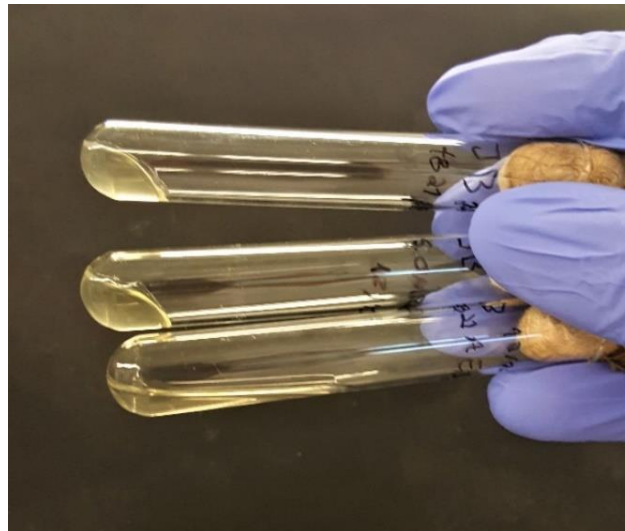


**Figura 5.** - Teste da catalase - resultados positivos

#### 4.3.2.3. – Teste da coagulase

Em tubos de ensaio de 100 × 10 mm, colocou-se 300 µL de plasma de coelho reconstituído (Biokar Diagnostics, BR00208, France), aos quais se adicionaram 100 µL de cultura em BHI (16 – 18 h) do organismo em estudo. Para além das culturas em estudo, preparou-se também um tubo com uma bactéria coagulase-positiva (*S. aureus* ATCC 9144) e um tubo não inoculado (branco), que funcionaram como controlo do processo de coagulação. Os tubos foram incubados a 37 °C realizando-se leituras ao fim de 1, 4 e 24 h de incubação.

A formação de coágulo indica tratar-se de uma cultura coagulase-positiva, (Zurita *et al.*, 2010). Mostram-se, na Figura 6, resultados do teste da coagulase de uma cultura coagulase-positiva e de uma cultura coagulase-negativa.



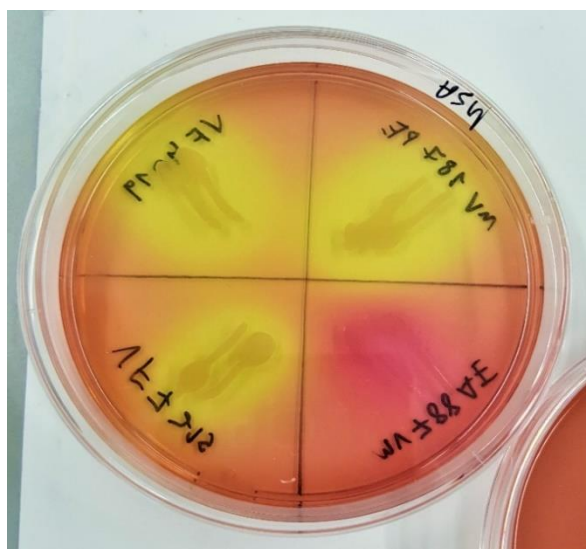
**Figura 6.** – Resultados do teste da coagulase. Em cima, uma cultura coagulase-positiva. No meio um controlo positivo (*S. aureus* ATCC 9144). Em baixo, uma cultura coagulase-negativa.

#### 4.3.2.4. – Fermentação anaeróbia do manitol

A partir de culturas em BHI, com 16 – 18h, inoculou-se os isolados em estudo em meio de Manitol Sal Agar (BioKar Diagnostics, BK030HA, France). Foram inoculados, no máximo, quatro organismos por placa, com a inclusão de um controlo positivo (*S. aureus* ATCC 9144) e de uma placa não inoculada, que funcionaram como controlo do processo de fermentação. A incubação das placas foi feita anaerobicamente a 37 °C, por 24 h. Para a obtenção de condições anaeróbias, as placas foram colocadas em jarras de

anaerobiose, nas quais se inseriu uma cuvete Anaerocult A (Merck, 113829, Germany) e uma fita indicadora de anaerobiose (Anaerotest Strips, Millipore 1.32371, Alemanha).

O *S. aureus* tem a capacidade de fermentar o manitol em meio contendo 7,5% de cloreto de sódio, o que resulta na produção de colônias amarelas e na formação de halo amarelo no meio circundante, devido ao decréscimo do pH, como demonstrado na Figura 7. Colônias de microrganismos que não fermentam o manitol produzem colônias vermelhas e sem alteração na cor do indicador vermelho de fenol (Shields *et al.*, 2006).



**Figura 7.** – Resultados do teste da fermentação do manitol. Três culturas positivas e uma cultura negativa para o processo de fermentação do manitol.

#### **4.3.2.5. - Teste de resistência à acrilflavina**

Seguindo o protocolo descrito por Brito *et al.* (2002), a partir de cada cultura, fez-se uma suspensão prévia de modo a obter o grau de turvação necessário, equivalente a 0,5 na escala de McFarland. A determinação do grau de turvação foi feita com o auxílio de um densitômetro (Densimat, BioMérieux, 011081, France). Cada amostra foi inoculada em placas de BPA, com acrilflavina, numa concentração final de  $7 \mu\text{g mL}^{-1}$ , e em placas de BPA sem acrilflavina. Após 24 e 48 horas de incubação a  $37^\circ\text{C}$ , realizaram-se as leituras. Foram consideradas sensíveis as amostras que apresentaram crescimento apenas nas placas sem acrilflavina.

#### **4.3.2.6. - Teste de Voges-Proskauer (produção de acetoína)**

Neste teste, seguiu-se o esquema proposto por Brito *et al.*, (2002). A produção de acetoína foi detetada em tubos com meio de MR-VP (Merck, VM325212, Alemanha), um caldo à base de pepton e glicose. Após 48 horas de incubação a 37°C realizou-se a primeira leitura, retirando-se 1,0 mL da cultura e adicionando-se 0,6 mL de  $\alpha$ -naftol a 5% (p/v) em álcool absoluto e 0,2 mL de hidróxido de potássio a 40% (p/v). Os tubos com resultado negativo foram deixados à temperatura ambiente e após doze dias fez-se uma segunda leitura de maneira semelhante à primeira.

#### **4.3.2.7. – Morfologia e pigmentação das colónias em BHA**

Observou-se o aspeto visual das colónias dos isolados obtidos, em BHA, após incubação a 37°C, por 24h. Em BHA, as colónias típicas de *S. aureus* são grandes, arredondadas, com 1 a 4 mm de diâmetro, cremosas, com a coloração que pode variar de acinzentado a amarelado devido à presença característica de pigmentos carotenoides na membrana citoplasmática (Rodrigues *et al.*, 2012).

#### **4.3.3. – Pesquisa fenotípica de fatores de virulência**

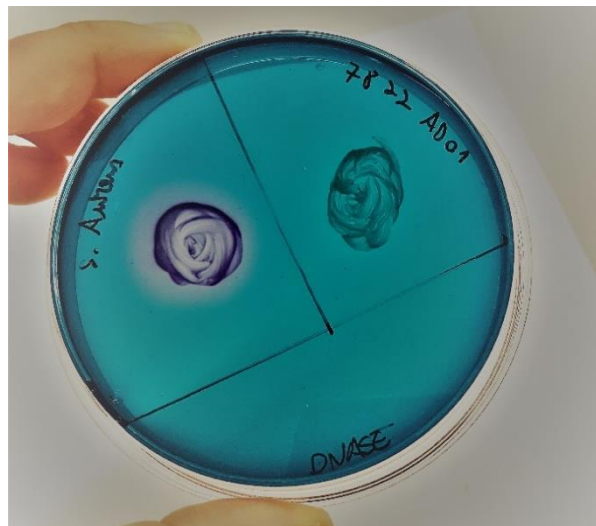
Para além dos testes da catalase e da coagulase, utilizados como elementos para a identificação de estafilococos, foram também pesquisados outros fatores de virulência – produção de DNase, liquefação da gelatina (teste da gelatinase) e reação em Agar Sangue (hemólise).

Antes de realizar cada um destes testes, procedeu-se, para cada isolado, a três repicagens sucessivas em BHI, com incubação nas condições anteriormente indicadas. Sempre que o protocolo experimental exigia volumes consideráveis de inóculo, foram preparadas culturas em placas de BHA, incubadas nas condições anteriormente descritas.

#### 4.3.3.1. – Teste da DNase

A partir de cada cultura em placa de BHA, semeou-se uma amostra em forma de botão em meio de DNase Agar com azul de toluidina (Fluka Analytical, D2560, Switzerland). Inoculou-se um máximo de quatro organismos por placa, com a inclusão de um controlo positivo (*S. aureus* ATCC 9144), e de uma placa não inoculada, que funcionaram como controlos. A incubação das placas foi feita a 37 °C, por 24 h.

A produção de um halo cor-de-rosa em redor do crescimento obtido indica que os microrganismos são capazes de degradar o ácido desoxirribonucleico (DNA) e consideram-se positivos para a DNase, como demonstrado na Figura 8. Os organismos negativos para a DNase não exibem qualquer halo cor-de-rosa nem zona transparente em volta das colónias (Alfarela, 2020). Neste teste, o controlo positivo utilizado foi o *S. aureus* ATCC 9144.



**Figura 8.** – Resultados do teste da DNase. À esquerda, o controlo positivo (*S. aureus* ATCC 9144) e à direita uma cultura negativa para a DNase.

#### 4.3.3.2. – Teste da gelatinase

Para preparação do meio de cultura misturaram-se todos os ingredientes [peptona – 5,0 g (Merck, 1.07214, Germany); Extrato de carne – 3,0 g (AES Laboratories, AEB171206, France); Gelatina – 120,0 g; Merck, 4078, Germany)] em 1000 mL de água destilada, e aqueceu-se até à dissolução. Distribuiu-se 3 ml de meio em tubos de 13 × 100

mm. Após autoclavar a 121 °C, durante 15 minutos, deixou-se arrefecer os tubos na posição vertical e armazenou-se a 2 – 3 °C até serem utilizados (Cruz *et al.*, 2012).

Utilizando inóculo abundante de cada isolado, obtido a partir de uma cultura em placa de BHA, incubada por 24 h a 37 °C, inoculou-se um tubo de gelatina por isolado, através de 4 picadas centrais. Preparou-se também um tubo de gelatina com uma bactéria gelatinase positiva (*S. aureus* ATCC 9144) e um tubo não inoculado (branco), que funcionaram como controlo. Os tubos foram incubados a 37 °C durante uma semana, fazendo leituras diárias.

Para fazer as leituras, imergiu-se os tubos num banho de gelo picado por 15 – 30 min. Após este tempo, e como demonstrado na Figura 9, se não ocorreu solidificação da gelatina, considerou-se que esta foi digerida e já não é capaz de gelificar, sendo o resultado do teste positivo. Se a gelatina solidificar, o resultado considera-se negativo (Cruz *et al.*, 2012).



**Figura 9.** – Resultados do teste da gelatinase. Em baixo, uma cultura gelatinase positiva. Em cima, um controlo negativo (não inoculado).

#### **4.3.3.3. - Produção de $\beta$ -Hemólise**

Em meio de agar-sangue, preparado com Tryptose Blood Agar Base (Oxoid, CM0233, England) ao qual se adicionou 7% de sangue de carneiro desfibrinado (Termo Scientific, SR0051C, Netherlands), inoculou-se culturas em BHI, incubadas por 24 h a 37 °C, dos isolados em estudo. Foram inoculados, no máximo, quatro isolados por placa, com a inclusão da bactéria *S. aureus* ATCC 9144 como controlo não  $\beta$ -hemolítico, de um

controle  $\beta$ -hemolítico (*Strep. pyogenes* ATCC 19615), e de uma placa não inoculada. A incubação das placas foi feita a 37 °C, por 48 h em condições de anaerobiose. Para a criação de anaerobiose nas jarras de 2,5 L (Merck, 116387, Germany), recorreu-se ao kit Anaerocult A (Merck, 113829, Germany).

Registou-se o tipo de hemólise produzido ( $\beta$ =beta-hemólise, halo incolor ao redor da colónia;  $\alpha$ =Alfa-hemólise, halo esverdeado ao redor da colónia;  $\gamma$ =gama-hemólise, ausência de halo ao redor da colónia) (Silva *et al.*, 2012).

#### 4.3.3.4 – Produção de biofilme

A formação de biofilme foi avaliada em placas de microtitulação de 96 poços durante 24 e 48 horas, de acordo com o protocolo descrito por O'Toole (2010).

A partir de cada cultura em placa de BHI, fez-se uma suspensão prévia em meio de Luria Bertani (Merck, VM882485 915, Alemanha) de modo a obter o grau de turvação necessário, equivalente a 0,5 na escala de McFarland. A determinação do grau de turvação foi feita com o auxílio de um densitómetro (Densimat, BioMérieux, 011081, France). Pipetou-se 200  $\mu$ L de cada suspensão para cada 4 poços da microplaca de 24 h e para a microplaca de 48 h. Prepararam-se também 3 poços com um controlo positivo (*S. aureus* ATCC 9144) e 3 poços não inoculados (branco), que funcionaram como controlo. Após a incubação na estufa por 24 h e 48 h, para remover as células desagregadas e componentes do meio, os poços foram cuidadosamente lavados com água destilada e secos à temperatura ambiente. De seguida, para fixar o biofilme, cada poço foi coberto com 250  $\mu$ L de álcool a 96% durante 15 minutos. Depois de secos, os biofilmes foram corados com 200  $\mu$ L de cristal violeta a 0,1%. Após 5 min, para remover o excesso de cristal violeta, submergiram-se as placas em água destilada e deixou-se secar durante a noite. No dia seguinte adicionou-se 125  $\mu$ L de ácido acético a 30% e transferiu-se 125  $\mu$ L de cada poço para uma nova placa. Procedeu-se então à medição da densidade ótica a 570 nm ( $DO_{570}$ ) num leitor de placas de microtitulação (FLUOstar Omega, BMG Labtech GmbH, 415-1744, Alemanha).

Com base na  $DO_{570}$ , as estirpes foram classificadas nas seguintes categorias (Ribeiro, *et al.*, 2018):

- ( $DO \leq DOC$ ) não produtor de biofilme

- (DOC < DO ≤ 2×ODC) fraco
- (2×DOC < DO 4×ODC) moderado
- (4×DOC < DO) forte,

sendo DOC o valor médio de DO obtido em todos os poços que continham o controlo negativo branco (branco).

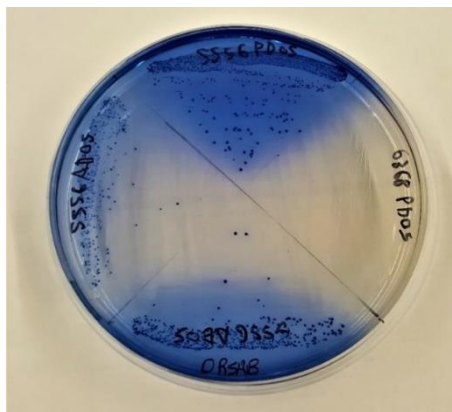
#### 4.3.4. - Estudo da sensibilidade/resistência a antibióticos

##### 4.3.4.1. - Pesquisa da sensibilidade/resistência à oxacilina

A resistência de *S. aureus* à meticilina (MRSA) foi determinada indiretamente utilizando o meio seletivo e diferencial Oxacillin Resistance Screening Agar (OXOID, CM1008, Inglaterra) que permite rastrear a resistência à oxacilina (Simor *et al.*, 2001).

Em meio ORSAB, inocularam-se com uma ansa os isolados em estudo, provenientes de culturas em BHI, incubadas a 37 °C, por 24 h. Foi inoculado um máximo de quatro isolados por placa, com a inclusão do *S. aureus* ATCC 9144 e de uma placa não inoculada, que funcionaram como controlos. A incubação das placas foi feita a 37 °C, e os resultados foram lidos após 24 e 48 h.

As colónias que, em meio ORSAB, apresentaram uma coloração azul intensa em fundo incolor, como demonstrado na Figura 10, são consideradas colónias de bactérias resistentes à oxacilina. A coloração azul das colónias de isolados resistentes à meticilina provém da presença do azul de anilina, um indicador de atividade lipolítica, no meio de cultura (Alfarela, 2020).



**Figura 10.** – Resultados do teste da resistência à oxacilina. Três culturas resistentes e uma cultura sensível à oxacilina.

#### **4.3.4.2. - Estudo da sensibilidade/resistência a antibióticos pelo método de Kirby-Bauer**

Para a avaliação do perfil fenotípico de resistência/sensibilidade dos isolados obtidos, realizaram-se antibiogramas pelo método de Kirby-Bauer, de acordo com o protocolo descrito pela *Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie* (CASFM/EUCAST, 2022).

A partir de cada cultura em placa de BHA, fez-se uma suspensão prévia em solução salina, esterilizada, a 0,85%, de modo a obter a turvação suficiente para permitir a formação de um tapete contínuo de crescimento bacteriano à superfície do agar a utilizar neste ensaio. Para os isolados em estudo, o grau de turvação necessário equivalia a 1,0 na escala de McFarland. A determinação do grau de turvação foi feita com o auxílio de um densitômetro (Densimat, BioMérieux, 011081, France).

Cada cultura foi semeada uniformemente, com o auxílio de uma zaragatoa embebida na suspensão previamente preparada, em meio de Mueller-Hinton agar (MHA, Biokar Diagnostics, BK048HA, France) e foram distribuídos discos dos antibióticos em estudo à superfície de cada placa inoculada, usando aplicadores em plástico e uma pinça esterilizada. Foi colocado um máximo de quatro discos de antibióticos por placa, de modo a evitar a sobreposição das zonas de inibição. As placas foram incubadas a  $35\pm 2$  °C. Após 24 h de incubação, procedeu-se à medição dos diâmetros de inibição observados. No caso da linezolida, foi feita uma segunda leitura às 48 h de incubação, para despistagem de resistência induzida (CASFM/EUCAST, 2022).

Os resultados deste teste foram interpretados comparando o valor do diâmetro do halo de inibição formado por cada antibiótico com os critérios publicados pela *Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie* (CASFM/EUCAST, 2022) e pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2021). Desta forma, os isolados bacterianos foram classificados como sensíveis (S) ou resistentes (R) a cada um dos antibióticos estudados. Para o controlo de qualidade dos antibiogramas, utilizou-se o *S. aureus* ATCC 25923 (CLSI, 2021).

Juntamente com o *S. aureus* ATCC25923, cada isolado foi submetido, sempre em duplicado, a 19 agentes antimicrobianos previstos pela CASFM/EUCAST (2022) e aos

três agentes antimicrobianos previstos no CLSI (2021) para o tratamento de mastites bovinas, todos eles representados no Quadro 4.5.

**Quadro 4.5.** - Lista dos antibióticos para a avaliação do perfil fenotípico de resistência/sensibilidade dos isolados obtidos.

Nome Antibiótico	Abr.	Dose (ug)	Tipo	Mecanismo de atuação	Referencias	Limites Críticos
Ceftarolina	CPT 30	30	Beta-Lactaminas	Atuação a nível da parede celular	(Bush <i>et al.</i> , 2016)	(CASFM/EUCAST, 2022)
Cefoperazona	CEP 30	30				(CLSI, 2021)
Cefoxitina	FOX 30	30				(CASFM/EUCAST, 2022)
Ceftiofur	EFT 30	30				(CLSI, 2021)
Penicilina G	P1	1U				(CASFM/EUCAST, 2022)
Penicilina/ Novobiocina	PNV 40	41	Beta-Lact. + aminocumarinas	Inibição da síntese dos ácidos nucleicos	(Flatman <i>et al.</i> , 2006)	(CLSI, 2021)
Canamicina	K 30	30	aminoglicósidos	Inibição da síntese proteica	(Garneau-Tsodikova <i>et al.</i> , 2016)	(CASFM/EUCAST, 2022)
Tobramicina	TOB 30	30				(CASFM/EUCAST, 2022)
Gentamicina	CN10	10				(CASFM/EUCAST, 2022)
Norfloxacina	NOR 10	10	Quinolonas	Inibição da síntese dos ácidos nucleicos	(Fàbrega <i>et al.</i> , 2009)	(CASFM/EUCAST, 2022)
Moxifloxacina	MXF 5	5				(CASFM/EUCAST, 2022)
Cloranfenicol	C 30	30	Fenicóis	Inibição da síntese proteica	(Dinos <i>et al.</i> , 2016)	(CASFM/EUCAST, 2022)
Eritromicina	E 15	15	Macrolidos	Inibição da síntese proteica	(Dinos, 2017)	(CASFM/EUCAST, 2022)
Minociclina	MH 30	30	Tetraciclina	Inibição da síntese proteica	(Chopra <i>et al.</i> , 2001)	(CASFM/EUCAST, 2022)
Tetraciclina	TE 30	30				(CASFM/EUCAST, 2022)
Rifampicina	RD 5	5	Rifamicinas	Inibição da síntese dos ácidos nucleicos	(Adams <i>et al.</i> , 2021)	(CASFM/EUCAST, 2022)
Mupirocina	MUP 200	200	Ácidos monocarboxícos	Inibição da síntese proteica & Inibição da síntese dos ácidos nucleicos	(Parenti <i>et al.</i> , 1987)	(CASFM/EUCAST, 2022)
Quinupristina-dalfopristina	QD 15	15	Estreptograminas	Inibição da síntese proteica	(Johnston <i>et al.</i> , 2002)	(CASFM/EUCAST, 2022)
Linezolida	LZD 10	10	Oxazolidinonas	Inibição da síntese proteica	(Shinabarger, 1999)	(CASFM/EUCAST, 2022)
Ácido fusídico	FD 50	50	Fusidanos	Inibição da síntese proteica	(Long <i>et al.</i> , 2021)	(CASFM/EUCAST, 2022)
Trimetoprim	W 5	5	Inibidores da síntese do ácido fólico	Inibição de vias metabólicas	(Minato <i>et al.</i> , 2018)	(CASFM/EUCAST, 2022)
Sulfametoxazole /trimetoprim	SXT 25	25				

#### 4.3.4.3. - Determinação da concentração inibitória mínima de alguns antibióticos pelo método de E-test

O método de E-test foi realizado através da aplicação no agar de tiras de plástico contendo um gradiente pré-definido de concentrações crescentes de antibióticos (Weller *et al.*, 1997).

Cada cultura foi semeada em meio de MHA de acordo com a metodologia descrita para o teste de Kirby-Bauer e, com o auxílio de uma pinça esterilizada, foram dispostas nas placas tiras de E-test de vancomicina (VA, bioMérieux, 412488, France) e de teicoplanina (TP bioMérieux, 412461, France). Foi colocada apenas uma tira de E-test por cada placa. As placas foram incubadas a  $35\pm 2$  °C durante 24 horas.

A concentração inibitória mínima obteve-se tomando o número localizado no ponto de interseção entre a fita de E-test e a zona de inibição do crescimento do microrganismo, que adota uma forma elíptica, como demonstrado na Figura 11. Para determinar a resistência/sensibilidade dos isolados em estudo em relação a estes antibióticos, comparou-se os valores obtidos com os critérios publicados pela CASFM/EUCAST (2022), permitindo classificar isolados bacterianos como sensíveis (S) ou resistentes (R).



**Figura 11.** – Resultado da determinação da concentração inibitória mínima à vancomicina pelo método de E-test.

#### **4.4. – Análise estatística**

Os dados foram inicialmente organizados no programa *Microsoft Excel*® e posteriormente tratados estatisticamente com recurso ao programa IBM SPSS (versão 24). Os dados relativos à produção de leite (kg) aos 305 dias foram previamente sujeitos ao teste de *outliers* e aos testes de normalidade e homogeneidade de variâncias, tendo-se verificado ausência de *outliers* e o cumprimento dos pressupostos da estatística paramétrica. Posteriormente foram sujeitos a estatística descritiva (média, mediana, variância, desvio padrão, valores máximo e mínimo, intervalo de variação e amplitude interquartílica). A comparação dos dois grupos de animais (negativos ou positivos à CoPS) foi feita com recurso a análise de variância (ANOVA) para o caso da produção de leite aos 305 dias e ao teste de Mann-Whitney para o número de lactações, a C.C.S. e os dias em lactação à data da colheita.

## V - Resultados e Discussão

### 5.1. – Caracterização dos animais

Os resultados acerca do valor médio das C.C.S., do N° de Lactações e dos dias em lactação na data da colheita estão expressos no Anexo B e no Quadro 5.1.

Analisando o Quadro 5.1, verifica-se que as vacas leiteiras negativas e positivas para estafilococos coagulase-positivos (CoPS) tiveram produções de leite (kg) aos 305 dias muito semelhantes ( $7\ 757 \pm 191$  kg vs  $7\ 954 \pm 658$  kg, respetivamente). A média geral da produção de leite (kg) aos 305 dias de todos os animais (ambos os grupos) foi de 7 781 kg, com o valor mínimo de 5 449 e o máximo de 11 030 kg.

**Quadro 5.1.** - Análise descritiva dos dados relativos á Produção de Leite (kg) aos 305 dias, ao valor médio das C.C.S., ao N° de lactações, e aos dias em lactação à data da colheita das vacas leiteiras negativas (CoPS -) e positivas (CoPS +) para estafilococos coagulase-positivos (CoPS) (mais parâmetros descritivos no Anexo B).

	CoPS -			CoPS +			Média Total		
	N	Média	Erro padrão	N	Média	Erro padrão	N	Média	Erro padrão
Produções de leite (kg)	51	7757,7	191,14	7	7954,6	1743,07	58	7781,5	1399,42
Valor médio das C.C.S. (x1000)		173,3	37,54		312,5	114,44		190,08	273,515
N° de Lactações		2,24	0,187		2,71	0,286		2,29	1,284
Dias em lactação		173,3	15,56		239,0	43,0		181,26	112,57

A ausência de diferenças estatisticamente significativas ( $P = 0,730$ ; Quadro 5.2) das produções de leite (kg) aos 305 dias entre estes dois grupos de animais poderá ser devida ao baixo número de animais em teste. Neste contexto, o estudo sugere a execução de um novo ensaio, semelhante, mas com maior número de animais.

**Quadro 5.2.** - Resultados da Análise de Variância dos dados relativos á Produção de Leite (kg) aos 305 dias das vacas leiteiras negativas e positivas para estafilococos coagulase-positivos (CoPS).

### ANOVA

Leite (Kg)					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	238550,129	1	238550,129	,120	,730
Within Groups	111389550,3	56	1989099,113		
Total	111628100,4	57			

Os resultados referentes ao valor médio das Células Somáticas demonstram que o grupo das vacas leiteiras positivas para CoPS (CoPS+), apresentou uma média de 312,5 ± 114,44 C.C.S. (×1000), que é superior à média do grupo das vacas leiteiras negativas (CoPS-) para CoPS 173,3 ± 37,54 C.C.S (×1000).

No que toca ao n.º de lactações, no grupo das vacas leiteiras CoPS-, a média dos 51 animais foi de 2.24 ± 0,187 lactações e, no grupo das vacas leiteiras CoPS+, a média dos 7 animais foi de 2.71 ± 0,286 lactações.

Relativamente aos dias em lactação à data da colheita, observou-se que o grupo das vacas leiteiras CoPS+ apresentaram uma média de dias em lactação superior relativamente ao grupo das vacas leiteiras CoPS- (239 ± 43,0 dias vs 173,3 ± 15,56 dias, respetivamente).

No entanto, o teste de Mann-Whitney U (Quadro 5.3) revelou um valor de significância elevado tanto para o valor médio das C.C.S. (P = 0,156), para o n.º de Lactações (P = 0,133), como para os dias em lactação á data da colheita (P = 0,124), logo as diferenças observadas não foram estatisticamente significativas, provavelmente dado o número reduzido de réplicas utilizado. Ficam registados os valores a título informativo.

**Quadro 5.3.** - Teste de Mann-Whitney U dos dados relativos ao Nº de Lactações, aos dias em lactação na data da colheita e ao valor médio das C.C.S. das vacas leiteiras negativas e positivas para estafilococos coagulase-positivos (CoPS).

**Test Statistics<sup>a</sup>**

	C.C.S	NºLactações	Dias em leite á data da colheita
Mann-Whitney U	119,000	118,000	114,000
Wilcoxon W	1445,000	1444,000	1440,000
Z	-1,420	-1,501	-1,540
Asymp. Sig. (2-tailed)	,156	,133	,124
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,162 <sup>b</sup>	,155 <sup>b</sup>	,129 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: CoPS

b. Not corrected for ties.

## 5.2. - Caracterização bioquímica dos isolados

Só foram considerados os isolados que eram estafilococos Gram-positivos, catalase-positivos e coagulase-positivos (dados não apresentados), tendo sido excluídos do estudo, por estarem fora dos objetivos propostos, todos os isolados que não possuíam estas características. Os resultados dos restantes testes empregues para a caracterização dos 30 isolados considerados apresentam-se no Quadro 5.4 e no Anexo C. Vinte e nove dos isolados em estudo foram capazes de fermentar anaerobiamente o manitol e produziram pigmento alaranjado. Mais de metade eram produtores de acetoína (Voges-Proskauer positivos) e cerca de um terço eram resistentes à acrilflavina.

A distinção entre as diferentes espécies de CoPS e, em especial a identificação da eventual presença de *S. aureus*, é importante para permitir delinear estratégias de controlo das mastites nos rebanhos. De acordo com o esquema de identificação proposto por Brito *et al.* (2002), esta distinção pode ser feita através de quatro testes de execução relativamente simples e rápida, sendo o *S. aureus* alfa-hemolítico, produtor de acetoína (VP+), positivo para a fermentação anaeróbica do manitol e resistente à acrilflavina. Deste modo, apenas os isolados 5556AD01, 5556AD02, 5556AD03, 5556AD04, 5556AD05, 5556AE01, 5556AE02, 5556AE03, 5556AE04, 5556AE05 podem ser considerados como pertencentes à espécie *S. aureus* com alguma segurança. A frequência

de *S. aureus* foi então de 33,33% entre os 30 isolados de estafilococos coagulase-positivos. É de notar que todos estes isolados provêm do mesmo animal, uma vaca da raça Tipo Frísia com 4 lactações, com uma produção de 11 026 Kg leite aos 305 dias, tendo-se identificado a presença do *S. aureus* em ambos os quartos dianteiros do úbere.

No rebanho em estudo, isolaram-se CoPS a partir de 12,07% das vacas. Na maioria dos casos, a infeção atingiu apenas um dos quartos do úbere. A prevalência de isolados de *S. aureus* nas 58 vacas leiteiras em estudo correspondeu apenas a 1,72%, muito menos que a prevalência de 36% obtida por Ibrahim *et al.* (2022). A baixa prevalência de isolados de *S. aureus*, pode dever-se ao esforço e seriedade que esta exploração tem no desenvolvimento adequado de programas e medidas de prevenção e controlo das mastites, incluindo no normal procedimento de ordenha várias ações de limpeza e desinfeção que visam garantir a segurança do leite, bem como a saúde e bem-estar dos animais. A exploração realiza pré e pós-*dip* dos tetos com ácido láctico a 1 e 8%, respetivamente, bem como a desinfeção das tetinas da máquina de ordenha com ácido peracético a 1,25%. O ingrediente ativo da solução de desinfeção das tetinas da máquina de ordenha (ácido peracético) não é muito eficaz na remoção dos biofilmes produzidos pelo *S. aureus* (Lee *et al.*, 2014). A desinfeção pré-ordenha dos tetos é eficaz no controlo de mastites causadas por agentes infecciosos ambientais, como a *E. coli* ou o *Strep. uberis*, mas não no controlo das mastites contagiosas. A desinfeção pós-ordenha, contudo, é particularmente eficaz no controlo de infeções mamárias pelo *S. aureus*, especialmente nos casos em que este é transmitido ao animal pelo(s) ordenhador(es) ou pelo equipamento de ordenha (Fitzpatrick *et al.*, 2021). As soluções para a desinfeção de tetos à base de ácido láctico, especialmente quando este é combinado com outros princípios ativos (clorexidina, por ex.), são eficazes no combate a este agente de mastites contagiosas (Fitzpatrick *et al.*, 2022). Assim, a rotina de desinfeção dos tetos utilizada na exploração poderá ser um dos fatores que estão na base do sucesso do controlo das mastites por *S. aureus*.

Os restantes isolados poderão pertencer a outra espécie de estafilococos coagulase-positivos, tais como *S. intermedius* e *S. hyicus*, ou poderão, nalguns casos, corresponder a *S. aureus* atípicos. Para uma identificação mais segura, será necessário, em trabalhos futuros, realizar mais testes bioquímicos/fisiológicos e/ou genéticos (sequenciação do DNA codificante do r-RNA 16S).

**Quadro 5.4.** - Caracterização bioquímica de isolados de estafilococos coagulase-positivos obtidos a partir do leite dos primeiros jatos de vacas de uma exploração pecuária da Ilha Terceira.

Isolados	Fermentação anaeróbia do manitol	Pigmentação laranja	Resistência à acriflavina	Voges-Proskauer
7821PE02	+	+	-	-
6356AD02	-	+	-	-
5556AD01	+	+	+	+
5556AD02	+	+	+	+
5556AD03	+	+	+	+
5556AD04	+	+	+	+
5556AD05	+	+	+	+
5556PD01	+	+	-	+
5556PD02	+	+	-	+
5556PD03	+	+	-	+
5556PD04	+	+	-	+
5556PD05	+	+	-	+
5556AE01	+	+	+	+
5556AE02	+	+	+	+
5556AE03	+	+	+	+
5556AE04	+	+	+	+
5556AE05	+	+	+	+
6368PD01	+	+	-	-
6368PD02	+	+	-	-
6368PD03	+	+	-	-
6368PD04	+	+	-	-
6368PD05	+	+	-	-
7822AD01	-	+	-	+
6367PD01	+	+	-	+
6367PD02	+	+	-	-
6367PD03	+	+	-	-
6367PD04	+	+	-	-
6367PD05	+	+	-	-
6364PD01	+	-	-	-
6364PD02	+	-	-	-

### 5.3. - Detecção de fatores de virulência

São diversos os fatores de virulência que o *S. aureus* pode apresentar, alguns deles relacionados com a gravidade da infecção intramamária das vacas. É através da expressão de fatores de virulência que o *S. aureus* evita as respostas imunitária e inflamatórias do

hospedeiro, permitindo a adaptação do microrganismo às mudanças microambientais que se lhe deparam no decorrer da infecção e aumentar assim as suas probabilidades de sobrevivência (Pérez *et al.*, 2020). Embora todos os isolados em estudo fossem coagulase-positivos, uns possuíram mais fatores de virulência do que outros.

Conforme disposto no Quadro 5.5 e no Anexo C, 80% dos 30 isolados em estudo apresentaram capacidade de produção de DNase, sendo DNase+ 50% (5/10) dos isolados identificados como *S. aureus* e 95% (19/20) dos estafilococos não-aureus. Podemos verificar que outras espécies para além de *S. aureus* apresentaram frequentemente uma clara atividade de DNase. Do ponto de vista da virulência, a DNase é importante para o estabelecimento da infecção na glândula mamária e é considerada um fator de virulência tão relevante para a patogénese dos estafilococos quanto a coagulase (Marques *et al.*, 2013), podendo a sua presença na maioria dos isolados obtidos neste estudo indicar uma elevada capacidade para a colonização do hospedeiro, uma vez que este grupo de enzimas está envolvido na maturação de biofilmes em bactérias Gram-positivas (Haas *et al.*, 2014).

Relativamente ao teste da gelatinase, os resultados mostram que 50% dos isolados coagulase-positivos em estudo têm a capacidade de produzir a enzima gelatinase, capaz de degradar o colagénio dos tecidos do hospedeiro, permitindo-lhes disseminarem-se mais facilmente (Al-Khafaji *et al.*, 2013). Nenhum dos isolados de *S. aureus* foi positivo no teste da gelatinase, indicando uma baixa capacidade de disseminação.

No que toca à produção de hemólise, 93,33% dos isolados avaliados apresentaram hemólise total, é resultante da atividade de beta-hemolisinas, enzimas que degradam a esfingomielina presente na membrana celular das hemácias, tornando-as suscetíveis aos efeitos de certos fatores ambientais adversos (Marques *et al.*, 2013; Sabini *et al.*, 2001). Verificou-se que 100% dos isolados de *S. aureus* foram capazes de produzir beta-hemólise. A elevada percentagem de isolados produtores de beta-hemólise torna-se preocupante, uma vez que este fator de virulência assume uma elevada importância na patogénese das infeções mamárias (Marques *et al.*, 2013). Já os restantes 6,67% dos isolados não produziram nenhum tipo de hemólise (gama-hemólise). Nenhum dos isolados em estudo apresentou hemólise parcial (alfa-hemólise).

**Quadro 5.5.** - Detecção de fatores de virulência de isolados de estafilococos coagulase-positivos obtidos a partir do leite dos primeiros jatos de vacas de uma exploração pecuária da Ilha Terceira.

Isolados	DNase	Gelatinase	Hemólise	Biofilme 24 h	Biofilme 48 h
7821PE02	+	+	$\beta$	Moderado	Forte
6356AD02	+	+	$\gamma$	Moderado	Forte
5556AD01	-	-	$\beta$	Forte	Forte
5556AD02	-	-	$\beta$	Forte	Moderado
5556AD03	-	-	$\beta$	Forte	Forte
5556AD04	-	-	$\beta$	Forte	Forte
5556AD05	-	-	$\beta$	Forte	Forte
5556PD01	+	-	$\beta$	Forte	Forte
5556PD02	+	-	$\beta$	Forte	Forte
5556PD03	+	-	$\beta$	Moderado	Forte
5556PD04	+	-	$\beta$	Moderado	Forte
5556PD05	+	+	$\beta$	Forte	Forte
5556AE01	+	-	$\beta$	Forte	Forte
5556AE02	+	-	$\beta$	Moderado	Forte
5556AE03	+	-	$\beta$	Moderado	Moderado
5556AE04	+	-	$\beta$	Moderado	Moderado
5556AE05	+	-	$\beta$	Moderado	Moderado
6368PD01	+	+	$\beta$	Moderado	Moderado
6368PD02	+	+	$\beta$	Moderado	Moderado
6368PD03	+	+	$\beta$	Moderado	Moderado
6368PD04	+	+	$\beta$	Forte	Moderado
6368PD05	+	+	$\beta$	Forte	Moderado
7822AD01	-	-	$\gamma$	Forte	Forte
6367PD01	+	+	$\beta$	Forte	Forte
6367PD02	+	+	$\beta$	Forte	Forte
6367PD03	+	+	$\beta$	Forte	Forte
6367PD04	+	+	$\beta$	Forte	Forte
6367PD05	+	+	$\beta$	Forte	Forte
6364PD01	+	+	$\beta$	Moderado	Forte
6364PD02	+	+	$\beta$	Forte	Fraco

$\beta$ =beta-hemólise;  $\gamma$ =gama-hemólise; Forte ( $4 \times \text{DOC} < \text{DO}$ ); Moderado ( $2 \times \text{DOC} < \text{DO} < 4 \times \text{DOC}$ ); Fraco ( $\text{DOC} < \text{DO} \leq 2 \times \text{DOC}$ ).

No Quadro 5.5 verifica-se que todos os isolados testados foram capazes de formar biofilme em grau fraco, moderado ou forte, segundo a classificação proposta por (Ribeiro, *et al.*, 2018).

Às 24 horas, 40% dos isolados (12 isolados) apresentaram grau moderado para a formação de Biofilme, e 60% (18 isolados) apresentaram grau forte. Já às 48 horas, 30% (9 isolados) exibiram grau moderado, 66,67% (20 isolados) grau forte e 3,33% (1 isolado)

grau fraco. Esta variação na formação de biofilme entre as 24 horas e as 48 horas pode ter sido devida a erros técnicos durante a elaboração do teste. Considerando que as diversas estirpes têm diferentes capacidades de adesão aos vários substratos durante o procedimento de lavagem, pode-se ter dado a rutura e a queda de porções da camada de biofilme (Alfarela, 2020). Fatores como pH, mudanças de temperatura, tipo de superfície, disponibilidade de nutrientes são também fatores relevantes que influenciam a formação de biofilme (Abdallah *et al.*, 2014).

Dos 10 isolados considerados como pertencentes à espécie *S. aureus* 60% apresentaram grau Forte, 40% grau moderado e 0% grau fraco para a formação de biofilme. Estes resultados vão ao encontro dos resultados apresentados por Bissong *et al.* (2020), na África do Sul, em que 90,9% dos isolados de *S. aureus*, de amostras de leite não pasteurizado, eram produtores de biofilme. Melo *et al.* (2012) também verificaram que 98,9 % dos isolados de *S. aureus* no leite bovino proveniente de quartos com mastite subclínica foram capazes de produzir biofilmes. A elevada frequência de *S. aureus* como grande potencial formador de biofilme torna-se preocupante uma vez que a formação de biofilme aumenta a virulência do *S. aureus*, contribuindo para o seu sucesso na colonização do hospedeiro. Além disso, confere-lhe uma maior tolerância aos antibióticos, aos desinfetantes e às condições ambientais desfavoráveis (Ibrahim *et al.*, 2022), permitindo-lhe persistir melhor no ambiente da exploração.

Devido à sua elevada patogenicidade (presença de genes codificantes de fatores de virulência e de resistência a antibióticos) e capacidade de induzir infeções crónicas de longa duração, o *S. aureus* ainda é a bactéria mais importante e frequente associada à mastite bovina à escala mundial (Ibrahim *et al.*, 2022; Pérez *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2012). No entanto, os resultados do presente estudo mostram que algumas espécies estafilococos não-*aureus* podem ter o mesmo potencial agressivo com base na produção de DNase, gelatinase, hemólise e biofilme. Assim sendo, para o desenvolvimento adequado de programas de prevenção, tratamento e controlo das mastites, torna-se também importante conhecer e identificar os fatores de virulência das espécies não-*aureus*, especialmente quando em combinação com padrões de resistência aos antibióticos.

## 5.4. - Padrão de resistência/ sensibilidade aos antibióticos dos isolados em estudo

Um total de 30 isolados de estafilococos coagulase-positivos foram caracterizados quanto ao seu perfil fenótipo de resistência a antibióticos. Observou-se que os isolados de CoPS eram sensíveis à maioria dos antibióticos testados. Conforme disposto no Quadro 5.6 e no Anexo D, 90% (27 isolados) dos isolados eram resistentes à penicilina, 50% (15 isolados) à oxacilina/meticilina e 3,3 % (1 isolado) à cefoxitina. A resistência à oxacilina/meticilina ocorreu simultaneamente com a resistência à penicilina em 47% dos isolados (14 isolados). O único isolado resistente à cefoxitina também apresentou simultaneamente resistência à penicilina e à oxacilina/meticilina. Todos os isolados resistentes a mais do que um antibiótico provinham de três dos quartos do úbere de um único animal. Dos isolados considerados como pertencentes à espécie *S. aureus* 90% (9 isolados) foram resistentes à penicilina. Todos estes isolados apresentaram resistência à oxacilina/meticilina (10 isolados), mas nenhum foi considerado resistente à cefoxitina. A resistência simultânea à oxacilina/meticilina e à penicilina ocorreu em 90% dos isolados de *S. aureus* (9 isolados).

**Quadro 5.6.** - Padrão de resistência/sensibilidade aos antibióticos de isolados de estafilococos coagulase-positivos obtidos a partir do leite dos primeiros jatos de vacas de uma exploração pecuária da Ilha Terceira.

Código do isolado	Antibióticos		
	Resistência à oxacilina	Penicilina G (1 U)	Cefoxitina (30 ug)
6368PD01	S	R	S
6368PD02	S	R	S
6368PD03	S	R	S
6368PD04	S	R	S
6368PD05	S	R	S
6367PD01	S	R	S
6367PD02	S	R	S
6367PD03	S	R	S
6367PD04	S	R	S
6367PD05	S	R	S
5556AE01	R	S	S
5556AE02	R	R	S
5556AE03	R	R	S
5556AE04	R	R	S
5556AE05	R	R	S

Código do isolado	Resistência à oxacilina	Penicilina G (1 U)	Cefoxitina (30 ug)
5556AD01	R	R	S
5556AD02	R	R	S
5556AD03	R	R	S
5556AD04	R	R	S
5556AD05	R	R	S
5556PD01	R	R	S
5556PD02	R	R	S
5556PD03	R	R	S
5556PD04	R	R	S
5556PD05	R	R	R
7821PE02	S	R	S
6356AD02	S	R	S
7822AD01	S	R	S
6364PD01	S	S	S
6364PD02	S	S	S

A elevada frequência de resistência à penicilina já era esperada, uma vez que entre os vários beta-lactâmicos, é a penicilina que tem sido amplamente utilizada quer para tratamento quer para prevenção de mastites bovinas em explorações leiteiras há mais de 50 anos, fato considerável para favorecer o aparecimento da resistência antimicrobiana contra este medicamento (Molineri, *et al.*, 2021). A elevada frequência de resistência à penicilina vai de encontro aos resultados apresentados por Algamal *et al.* (2020b), em que 64,3% das estirpes de *S. aureus* encontradas em amostras de leite de animais em lactação de diferentes explorações localizadas na Província de Ismailia (Egipto), eram resistentes à penicilina. Bissong, *et al.* (2020) também verificou que no Sul de Africa 77,9% dos isolados de *S. aureus* no leite bovino eram resistentes à Penicilina. Em todos os países da Europa foi detetada uma elevada frequência de resistência à penicilina em isolados de *S. aureus*, com exceção da França em que a percentagem foi inferior a 10% (Hendriksen *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2015). O insucesso do tratamento da mastite subclínica com penicilina ficou a dever-se principalmente à ação enzimática das beta-lactamases pelo *S. aureus*, que causa a destruição do anel beta-lactâmico inativando a ação deste antibiótico (Algamal *et al.*, 2020b).

Embora haja muitas resistências à penicilina entre os isolados incluídos neste estudo, a situação não é preocupante, uma vez que os isolados são sensíveis à maioria dos restantes antibióticos em estudo, com exceção de algumas resistências à oxacilina/meticilina.

Não foram detetados isolados que pelo seu perfil de resistência possam ser classificados *Staphylococcus aureus* multirresistentes (MRSA) contudo, a existência de uma percentagem ainda apreciável de isolados resistentes à oxacilina/meticilina, embora ainda não configure uma situação preocupante, significa que estes genes já se encontram em circulação entre a microbiota dos animais, podendo futuramente vir a causar problemas.

## VI - Conclusões

A situação da exploração em estudo relativamente à prevalência de CoPS, à frequência dos fatores de virulência estudados e ao perfil de resistência a antibióticos clinicamente relevantes não foi preocupante. Contudo, a presença de uma percentagem considerável de isolados resistentes à oxacilina pode constituir uma ameaça por representarem um reservatório de determinantes genéticos de resistência a este antibiótico, que podem ser transmitidos a outros microrganismos por troca horizontal de genes. Por este motivo, deve continuar-se a monitorizar a situação relativa à resistência a antibióticos, alargando o âmbito do estudo a outras explorações, incluindo um número maior de animais e recorrendo a metodologias que permitam pesquisar a presença de determinantes genéticos de resistência aos antibióticos beta-lactâmicos. Conhecer a identidade dos CoPS implicados nas infeções mamárias é importante para delinear estratégias para o seu controlo. Assim, recomenda-se que sejam realizados testes bioquímicos e fisiológicos adicionais, complementados pela sequenciação de porções conservadas do genoma (como o DNA codificante do r-RNA 16S) para obter uma identificação segura, ao nível da espécie, dos CoPS isolados neste estudo. Por outro lado, uma vez que as mastites são atualmente entendidas como situações de disbiose da microbiota mamária, importaria também proceder ao estudo da ecologia microbiana do leite dos primeiros jatos por métodos independentes do cultivo, de modo a obter dados que permitam conhecer melhor o impacto real dos CoPS sobre a saúde do úbere.

## VII - Referências bibliográficas

Abdallah, M.; Chataigne, G.; Ferreira-Theret, P.; Benoliel, C.; Drider, D.; Dhulster, P.; Chihib, N. E. (2014). Effect of growth temperature, surface type and incubation time on the resistance of *Staphylococcus aureus* biofilms to disinfectants. *Applied microbiology and biotechnology*. 98(6): 2597-2607.

Abdi, R. D.; Gillespie, B. E.; Ivey, S.; Pighetti, G. M.; Almeida, R. A.; Dego, K. O. (2021). Antimicrobial resistance of major bacterial pathogens from dairy cows with high somatic cell count and clinical mastitis. *Animals*. 11(1): 131.

Abureema, S.; Smooker, P.; Malmø, J.; Deighton, M. (2014). Molecular epidemiology of recurrent clinical mastitis due to *Streptococcus uberis*: evidence of both an environmental source and recurring infection with the same strain. *Journal of Dairy Science*. 97: 285-90.

Addis, M.F.; Tanca, A.; Uzzau, S.; Oikonomou, G.; Bicalhod, R.C.; Moronide, P. (2016). The bovine milk microbiota: insights and perspectives from -omics studies. *Molecular BioSystems*. 12: 2359-2372.

Adkins, P. R. F.; Middleton, J. R.; Calcutt, M. J.; Stewart, G. C.; Fox, L. K. (2017). Species identification and strain typing of *Staphylococcus agnetis* and *Staphylococcus hyicus* isolates from bovine milk by use of a novel multiplex PCR assay and pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology*. 55(6): 1778-1788.

Al-Khafaji, M. H.; Flayyih, M. T.; Sabah, M. A. (2013). Isolation, Identification and Detection of Some Virulence Factors of *Staphylococci* in milk and cheese in Baghdad. *Iraqi Journal of Science*. 54(4): 1057-1067.

Alfarela, C.S. (2020). *Prevalência da resistência a antibióticos de Staphylococcus spp. isolados de asininos da raça Mirandesa: uma abordagem One Health*. Dissertação de Mestrado em Biologia Clínica Laboratorial. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Vila Real. 64p.

Algammal, A.M.; Hetta, H.F.; Elkelish, A.; Alkhalifah, D.H.H.; Hozzein, W.H.; Batiha, G.E.; Nahhas, N.E.; Mabrok, M.A. (2020). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): One Health Perspective Approach to the Bacterium Epidemiology, Virulence

Factors, Antibiotic-Resistance, and Zoonotic Impact. *Infection and Drug Resistance*. 13: 3255–3265.

Algammal, A. M., Enany, M. E., El-Tarabili, R. M., Ghobashy, M. O., & Helmy, Y. A. (2020)b. Prevalence, antimicrobial resistance profiles, virulence and enterotoxins-determinant genes of MRSA isolated from subclinical bovine mastitis in Egypt. *Pathogens*. 9(5): 362.

Almeida, A.M.; Alvarenga, P.; Figueiro, D. (2020). The dairy sector in the Azores Islands: possibilities and main constraints towards increased added value. *Tropical Animal Health and Production*. 53(1): 40.

Almeida, L.M. (2009). *Fatores de virulência e genes regulatórios agr de Staphylococcus aureus e outras espécies coagulase positivas isoladas de mastites bovina e ovina*. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo. Faculdade de ciências Farmacêuticas. São Paulo. 111p.

Andrade, N.C.; Laranjo, M.; Costa, M.M.; Queiroga, M.C. (2021). Virulence Factors in Staphylococcus Associated with Small Ruminant Mastitis: Biofilm Production and Antimicrobial Resistance Genes. *Antibiotics*. 10: 633.

Andrews, T.; Neher, D. A.; Weicht, T. R.; Barlow, J. W. (2019). Mammary microbiome of lactating organic dairy cows varies by time, tissue site, and infection status. *PLoS One*. 14(11): e0225001.

Ashraf, A.; Imran, M. (2020). Causes, types, etiological agents, prevalence, diagnosis, treatment, prevention, effects on human health and future aspects of bovine mastitis. *Animal Health Research Reviews* 1–14.

Azevedo, C.; Pacheco, D.; Soares, L.; Romão, R.; Moitoso, M.; Maldonado, J.; Guix, R.; Simões, J. (2016). Prevalence of contagious and environmental mastitis-causing bacteria in bulk tank milk and its relationships with milking practices of dairy cattle herds in São Miguel Island (Azores). *Tropical Animal Health Production*. 48: 451–459.

Azevedo, C.; Pacheco, D.; Soares, L.; Moitoso, M.; Maldonado, J.; Guix, R.; Simões J. (2016b). Prevalence of bovine milk pathogens in Azorean pastures: mobile versus fixed milking machines. *Veterinary Record Open*. 3(1): e000181.

- Azevedo, S. M. M. (2014). *Farmacologia dos antibióticos beta-lactâmicos*. Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas. Faculdade de Ciências da Saúde. Universidade Fernando Pessoa. Porto. 70p.
- Balemi, A.; Gumi, B.; Amenu, K.; Girma, S.; Gebru, M.; Tekle, M.; Ríus, A.A.; D'Souza, D.H.; Agga, G.E.; Dego, O.K. (2021). Prevalence of Mastitis and Antibiotic Resistance of Bacterial Isolates from CMT Positive Milk Samples Obtained from Dairy Cows, Camels, and Goats in Two Pastoral Districts in Southern Ethiopia. *Animals*. 11(6): 1530.
- Barkema, H.W.; Green, M.J.; Bradley, A.J.; Zadoks, R.N. (2009). Invited review: The role of contagious disease in udder health. *Journal of Dairy Science*. 92(10): 4717-4729.
- Bartlett, P.C., Miller, G.Y., Lance, S.E.; Heider, L.E. (1992). Clinical mastitis and intramammary infections on Ohio dairy farms. *Preventive Veterinary Medicine*. 12: 59–71.
- Ben, Y.; Fu, C.; Hu, M.; Liu, L.; Wong, M.H.; Zeng, C. (2019). Human health risk assessment of antibiotic resistance associated with antibiotic residues in the environment: A review. *Environmental Research*. 169: 483-493.
- Biokar Diagnostics. (2016). *Baird-Parker Agar with egg yolk tellurite*. Technical data sheet. Beauvais. France.
- Bissong, M. E. A.; Ateba, C. N. (2020). Genotypic and phenotypic evaluation of biofilm production and antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from milk, North West Province, South Africa. *Antibiotics*. 9(4): 156.
- Bonar, E.; Międzobrodzki, J.; Władyka, B. (2018). The *Staphylococcal* Coagulases. *Pet-To-Man Travelling Staphylococci*. 95–102. Consultado em 8 de outubro de 2022. disponível em: doi:10.1016/b978-0-12-813547-1.00007-8
- Bozdogan, B.; Appelbaum, P. C. (2004). Oxazolidinones: activity, mode of action, and mechanism of resistance. *International journal of antimicrobial agents*. 23(2): 113-119.
- Bradley, J. S.; Garau, J.; Lode, H.; Rolston, K. V. I.; Wilson, S. E.; Quinn, J. P. (1999). Carbapenems in clinical practice: a guide to their use in serious infection. *International journal of antimicrobial agents*. 11(2): 93-100.

- Brito, M. A. V. P.; Campos, G. M. D. M.; Brito, J. R. F. (2002). Esquema simplificado para identificação de estafilococos coagulase-positivos isolados de mastite bovina. *Ciência Rural*. 32: 79-82.
- Buck, J.; Ha, V.; Naushad, S.; Nobrega, D. B.; Luby, C.; Middleton, J. R.; Vlieghe, S.; Barkema, H. W. (2021). Non-aureus Staphylococci and bovine udder health: current understanding and knowledge gaps. *Frontiers in veterinary science*. 8: 658031.
- Carvalho, V.N.; Cogo, L.L. (2014). Resistência às polimixinas em bactérias Gram-negativas: uma revisão microbiológica. *Visão Acadêmica*. 15(1): 119- 129.
- CASFM/EUCAST, (2022) *Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Recommandations 2022*. V.1.0. Mai. Société Française de Microbiologie. Strasbourg. França.
- Cheng, W.N.; Han, S.G. (2020). Bovine mastitis: risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments - A review. *Asian-Australasian-Journal of Animal Sciences*. 33 (11): 1699-1713.
- Climeni, B.S.O.; Dellalibera, F. L.; Monteiro, M. V.; Bazan, C. T.; Pereira, D. M. (2009). Cefalosporinas: sua origem, uso e função em animais de grande e pequeno porte. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*. 12: 1-8.
- CLSI, (2021). M100. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 32 th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, PA.
- Cobirka, M.; Tancin, V.; Slama, P. (2020). Epidemiology and classification of mastitis. *Animals*. 10(12): 2212.
- Collignon, P.J.; McEwen, S.A. (2019). One Health—Its Importance in Helping to Better Control Antimicrobial Resistance. *Tropical Medicine and Infectious Disease*. 4(1): 22.
- Cruz, T. E. E.; Torres, J. M. O. (2012). Gelatin Hydrolysis Test Protocol. American Society for Microbiology, *ASMMicrobe Library*.
- Dallal, M.M.S.; Khoramizadeh, M.R.; Amiri, S.A.; Yaraghi, A.A.S.; Fard, R.M.N. (2016). Coagulase gene polymorphism of *Staphylococcus aureus* isolates: A study on dairy food products and other foods in Tehran, Iran. *Food Sci. Hum. Wellness*. 5: 186–190.

- De Buck, J.; Há, V.; Naushad, S.; Nobrega, D.B.; Luby, C.; Middleton, J.R.; De Vliegher, S.; Barkema, H.W. (2021). Non-aureus Staphylococci and Bovine Udder Health: Current Understanding and Knowledge Gaps. *Front. Vet. Sci.* 8:658031.
- Dinges, M.M.; Orwin, P.M.; Schlievert, P.M. (2000). Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology Review.* 13: 16-34.
- Edrington, T.S.; Dowd, S.E.; Farrow, R.F.; Hagevoort, G.R.; Callaway, T.R.; Anderson, R.C.; Nisbet, D.J. (2012). Development of colonic microflora as assessed by pyrosequencing in dairy calves fed waste milk. *Journal of Dairy Science.* 95: 4519–4525.
- Erskine, R. J.; Walker, R. D.; Bolin, C. A.; Bartlett, P. C.; White, D. G. (2002). Trends in antibacterial susceptibility of mastitis pathogens during a seven-year period. *Journal of Dairy Science.* 85(5): 1111-1118.
- Etebu, E.; Arikekpar, I. (2016). Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. *International Journal of Applied Microbiology and Biotechnology Research.* 4: 90-101.
- Fagundes, H.; Oliveira, C. A. F. (2004). Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. *Ciência Rural.* 34: 1315-1320.
- Fluit, A. C. (2012). Livestock-associated *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology and Infection,* 18(8): 735-744.
- Fitzpatrick, S.R.; Garvey, M; Flynn, J.; O’ Brien, B.; Gleeson, D. (2022) Use of different methods for the evaluation of teat disinfectant products. *Journal of Applied Animal Research.* 50: 31-38.
- Fitzpatrick, S.R.; Garvey, M.; Flynn, J.; O’Brien, B.; Gleeson, D. (2021). The effect of disinfectant ingredients on teat skin bacteria associated with mastitis in Irish dairy herds. *Irish Veterinary Journal.* 74: 1.
- Franco, J. M. P. L.; Mendes, R.; Cabral, F.; Menezes, C. D. A. (2015). O papel do farmacêutico frente à resistência bacteriana ocasionada pelo uso irracional de antimicrobianos. *Rev. Semana Acadêmica. Fortaleza.* 1(72): 1-17.
- Gajdács, M. (2019). The continuing threat of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics.* 8(2): 52.

- Ganda, E.K.; Bisinotto, R.S.; Lima, S.F.; Kronauer, K.; Decter, D.H.; Oikonomou, G.; Schukken, Y.H.; Bicalho, R.C. (2016). Longitudinal metagenomic profiling of bovine milk to assess the impact of intramammary treatment using a third-generation cephalosporin. *Scientific Reports*. 6: 33–38.
- Gelatti, L. C.; Bonamigo, R. R.; Becker, A. P.; d’Azevedo, P. A. (2009). *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina: disseminação emergente na comunidade. *Anais brasileiros de dermatologia*. 84(5): 501-506.
- Getahun, K.; Kelay, B.; Bekana, M.; Lobago, F. (2008). Bovine mastitis and antibiotic resistance patterns in Selalle smallholder dairy farms, central Ethiopia. *Tropical Animal Health and Production*. 40(4): 261-268.
- Gilbert, F.B.; Cunha, P.; Jensen, K.; Glass, E.J.; Foucras, G.; Granié, C.R.; Rupp, R.; Rainard, P. (2013). Differential response of bovine mammary epithelial cells to *Staphylococcus aureus* or *Escherichia coli* agonists of the innate immune system. *Veterinary Research*. 44: 40.
- Gillespie, B.E.; Moorehead, H., Lunn, P.; Dowlen, H.H.; Johnson, D.L.; Lamar, K.C.; Lewis, M.J.; Ivey, S.J.; Hallberg, J.W.; Chester, S.T.; Oliver, S.P. (2002). Efficacy of extended pirlimycin hydrochloride therapy for treatment of environmental *Streptococcus* spp and *Staphylococcus aureus* intramammary infections in lactating dairy cows. *Veterinary Therapeutics*. 3: 373–380.
- Gomes, F.; Henriques, M. (2016). Control of bovine mastitis: old and recent therapeutic approaches. *Current Microbiology*. 72: 377-82.
- Gonçalves, C. M. D. A. (2019). *A importância clínica dos antibióticos β-lactâmicos (Doctoral dissertation)*. Dissertações de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas. Faculdade de Ciências da Saúde. Universidade Fernando Pessoa. Porto. Portugal. 67p.
- González-Martín, M.; Corbera, J. A.; Suárez-Bonnet, A.; Tejedor-Junco, M. T. (2020). Virulence factors in coagulase-positive *staphylococci* of veterinary interest other than *Staphylococcus aureus*. *The veterinary quarterly*. 40(1): 118–131. Consultado em 19 de outubro de 2022. disponível em: <https://doi.org/10.1080/01652176.2020.1748253>
- González, M. J. C.; Perozo-Mena, A. J. (2010). Mecanismos de resistência a glicopéptidos en *Staphylococcus aureus*. *Kasmera*. 38(1): 36-44.

- Grossman, T. H. (2016). Tetracycline antibiotics and resistance. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 6(4): a025387.
- Gruet, P.; Maincent, P.; Berhelot, X.; Kaltsatos, V. (2001). Bovine mastitis and intramammary drug delivery: Review and perspectives. *Adv. Drug Deliver. Rev.* 50: 245–259.
- Guo, Y.; Song, G.; Sun, M.; Wang, J.; Wang, Y. (2020). Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 10: 107.
- Haas, B.; Bonifait, L.; Vaillancourt, K.; Charette, S.J.; Gottschalk, M.; Grenier, D. (2014). Characterization of DNase activity and gene in *Streptococcus suis* and evidence for a role as virulence factor. *BMC Res Notes*. 7: 424.
- Halasa, T.; Huijps, K.; Østerås, O.; Hogeveen, H. (2007). Economic effects of bovine mastitis management: A review. *Vet. Quart.* 29: 18–31.
- Hendriksen, R.S.; Mevius, D.J.; Schroeter, A.; Teale, C.; Meunier, D.; Butaye, P.; Franco, A.; Utinane, A.; Amado, A.; Moreno, M.; Greko, C.; Stärk, K.; Berghold, C.; Myllyniemi, A.L.; Wasyl, D.; Sunde, M.; Aarestrup, F.M. (2008). Prevalence of antimicrobial resistance among bacterial pathogens isolated from cattle in different European countries: 2002-2004. *Acta Vet Scand.* 8(50):28.
- Hennekinne, J.A.; Ostyn, A.; Guillier, F.; Herbin, S.; Pruger, A.L.; Dragacci, S. (2010). How Should *Staphylococcal* Food Poisoning Outbreaks Be Characterized. *Toxins*. 2: 2106-2116.
- Huijps K, Lam TJ and Hogeveen H (2008) Costs of mastitis: facts and perception. *Journal of Dairy Research* 75(1): 113–120.
- IAMA (2021). *Leite e Laticínios Produzidos por unidade de produção na RAA – 2020*. Instituto de Alimentação e Mercados Agrícolas. Consultado em 5 de setembro de 2021. disponível em: <https://portal.azores.gov.pt/web/iama/leite-e-latic%C3%ADnios-totais-regi%C3%A3o>
- Ibrahim, E.S; Arafa, A.A; Dorgam, S.M.; Eid, R.H.; Atta, N.S.; El-Dabae, W.H.; Gaber, E.S.; (2022). Molecular characterization of genes responsible for biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cows. *Veterinary World*. 15(1): 205-212.

INE (2021). *Estatísticas Agrícolas – 2020 Instituto Nacional Estatística*. Lisboa, Portugal. Consultado em 5 de setembro de 2021. disponível em: [www.ine.pt](http://www.ine.pt)

ISO 6888-1:2021, (2021). *Microbiology of the food chain - Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (Staphylococcus aureus and other species)*.

Jenkins, S.N.; Okello, E.; Rossitto, P.V.; Lehenbauer, T.W.; Champagne, J.; Penedo, M.C.T.; Arruda, A.G.; Godden, S.; Rapnicki, P.; Gorden, P.J.; Timms, L.L.; Aly, S.S. (2019). Molecular epidemiology of coagulase-negative Staphylococcus species isolated at different lactation stages from dairy cattle in the United States. *PeerJ*. 7: e6749.

Kalińska, A.; Wójcik, A.; Slószarz, J.; Kruzińska, B.; Michalczyk, M.; Jaworski, S.; Wierzbicki, M; Gołębiewski, M. (2018). Occurrence and aetiology of Staphylococcal mastitis-a review. *Animal Science Papers & Reports*. 36(3).

Kang, H. K.; Park, Y. (2015). Glycopeptide antibiotics: Structure and mechanism of action. *Journal of Bacteriology and Virology*. 45(2): 67-78.

Kapoor, G.; Saigal, S.; Elongavan, A. (2017). Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of anaesthesiology, clinical pharmacology*. 33(3): 300.

Kateete, D.P.; Kimani, C.N.; Katabazi, F.A.; Okeng, A.; Okee, M.S.; Nanteza, A.; Joloba, M.L.; Najjuka, F.C. (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. Consultado em 9 de março de 2022. Disponível em: <http://www.ann-clinmicrob.com/content/9/1/23>.

Khairullah, A.R.; Ramandinianto, S.C.; Effendi, M.H. (2020) A Review of Livestock-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (LA-MRSA) on Bovine Mastitis. *Systematic Reviews in Pharmacy*. 11 (7): 172-183.

Krause, K. M.; Serio, A. W.; Kane, T. R.; Connolly, L. E. (2016). Aminoglycosides: An overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 6(6): 1–18.

Krishnamoorthy, P.; Suresh, K.P.; Jayamma, K.S.; Shome, B.R.; Patil, S.S.; Amachawadi, R.G. (2021). An Understanding of the Global Status of Major Bacterial

Pathogens of Milk Concerning Bovine Mastitis: A Systematic Review and Meta-Analysis (Scientometrics). *Pathogens*. 10: 545.

Lakew, B.T.; Fayera, T.; Ali, Y.M. (2019). Risk factors for bovine mastitis with the isolation and identification of *Streptococcus agalactiae* from farms in and around Haramaya district, eastern Ethiopia. *Tropical Animal Health Production*. 51: 1507-13.

Laws, M.; Shaaban, A.; Rahman, K. M. (2019). Antibiotic resistance breakers: current approaches and future directions. *FEMS Microb. Rev.* 43: 490– 516.

Lee, S. H.; Mangolin, B. L.; Gonçalves, J. L.; Neeff, D. V.; Silva, M. P.; Cruz, A. G.; Oliveira, C. A. (2014). Biofilm-producing ability of *Staphylococcus aureus* isolates from Brazilian dairy farms. *Journal of Dairy Science*. 97: 1812–1816.

Li, L.; Feng, W.; Zhang, Z.; Xue, H.; Zhao, X. (2015). Macrolide-lincosamide-streptogramin resistance phenotypes and genotypes of coagulase-positive *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococcal isolates from bovine mastitis. *BMC Veterinary Research*. 11: 168.

López, D.; Vlamakis, H.; Kolter, R. (2010). Biofilms. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2(7): 1–11.

Mahmoud, A.K.; Khadr, A.M.; Elshemy, T.M.; Hamoda, H.A.; Mohamed, E.S. (2015). Role of coagulase-positive and coagulase-negative staphylococci in bovine mastitis with special reference to some of their virulence genes and antimicrobial sensitivity. *Alexandria Journal of Veterinary Sciences*. 46: 83-89.

Mandell, G. L. (1975). Catalase, Superoxide Dismutase, and Virulence of *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Clinical Investigation*. 55: 561–566.

Marques, V. F.; Souza, M.M.S.; Mendonça, E.C.L.; Alencar, T.A.; Pribul, B.R.; Coelho, S.M.O.; Lasagno, M.; Reinoso, E.B. (2013). Análise fenotípica e genotípica da virulência de *Staphylococcus* spp. e de sua dispersão clonal como contribuição ao estudo da mastite bovina. *Pesq. Vet. Bras*. 33(2):161-170.

Martín, R.; Langa, S.; Reviriego, C.; Jiménez, E.; Marín, M.L.; Olivares, M.; Boza, J.; Jiménez, J.; Fernández, L.; Xaus, J.; Rodríguez, J.M. (2004). The commensal microflora of human milk: new perspectives for food bacteriotherapy and probiotics. *Trends Food Sci. Technol*. 15: 121–127.

- Mediavilla, J. R.; Chen, L.; Mathema, B.; Kreiswirth, B. N. (2012). Global epidemiology of community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). *Current Opinion in Microbiology*. 15: 588–595.
- Melo, P. D. C.; Ferreira, L. M.; Nader-Filho, A.; Zafalon, L. F.; Vicente, H. I.G. (2012). Análise fenotípica e molecular da produção de biofilmes por estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de casos de mastite subclínica bovina. *Bioscience Journal*. 94-99.
- Molineri, A. I.; Camussone, C.; Zbrun, M. V.; Archilla, G. S.; Cristiani, M.; Neder, V.; Calvinho, L.; Signorini, M. (2021). Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis: Systematic review and meta-analysis. *Preventive Veterinary Medicine*. 188: 105261.
- Moon, J. S.; Kim, H. K.; Koo, H. C.; Joo, Y. S.; Nam, H. M.; Park, Y. H.; Kang, M. I. (2007). The antibacterial and immunostimulative effect of chitosan-oligosaccharides against infection by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *Applied microbiology and biotechnology*. 75(5): 989-998.
- Ng, D. L. K.; Tay, L. (1993). Enterotoxigenic strains of coagulase-positive *Staphylococcus aureus* in drinks and ready-to-eat foods. *Food microbiology*. 10(4): 317-320.
- Nogueira, H. S.; Oliveira Xavier, A. R. E.; Sousa Xavier, M. A.; Carvalho, A. A.; Monção, G. A.; Barreto, N. A. P. (2016). Antibacterianos: principais classes, mecanismos de ação e resistência. *Revista Unimontes Científica*. 18(2): 96-108.
- Oikonomou, G.; Bicalho, M.L.; Meira, E.; Rossi, R.E.; Foditsch, C.; Machado, V.S.; Teixeira, A.G.V.; Santisteban, C.; Schukken, Y.H.; Bicalho, R.C. (2014). *Microbiota of Cow's Milk; Distinguishing Healthy, Sub-Clinically and Clinically Diseased Quarters*. Le Luo Guan, University of Alberta, Canada. 9(1): e85904.
- O'Neill, J. (2016). Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. The review on antimicrobial resistance.
- O'Toole, G. A. (2010) Microtiter dish Biofilm formation assay. *Journal of Visualized Experiments*. (47): 10–11.

Owens, W.E.; Ray, C.H.; Watts, J.L.; Yancey, R.J.; (1997). Comparison of success of antibiotic therapy during lactation and results of antimicrobial susceptibility tests for bovine mastitis. *Journal of Dairy Science*. 80: 313–317.

Pacheco, D. I. F. (2015). *Clínica e cirurgia em bovinos de aptidão leiteira: fatores de risco associados à prevalência de Staphylococcus spp. e coliformes no leite do tanque de explorações da Ilha de São Miguel, Açores*. Relatório de Estágio. Departamento de Medicina Veterinária. Escola de ciências e Tecnologia. Universidade de Évora. 111p.

Palma, E.; Tilocca, B.; Roncada, P. (2020). Antimicrobial resistance in veterinary medicine: An overview. *International Journal of Molecular Sciences*. 21(6): 1914.

Patrício, T. S. M. (2013). *Qualidade de Leite em Bovinos Leiteiros: Uma abordagem preliminar para a redução da contagem de células somáticas*. Relatório Final de Estágio. Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar. Universidade do porto. Porto. 40p.

Perez, P.F.; Dore, J.; Leclerc, M.; Levenez, F.; Benyacoub, J.; Serrant, P.; Segura-Roggero, I.; Schiffrin, E.J.; Donnet-Hughes, A. (2007). Bacterial Imprinting of the Neonatal Immune System: Lessons From Maternal Cells? *Pediatrics*. 119: e724–e732.

Pérez, V.; Costa, G.; Guimarães, A. S.; Heinemann, M. B.; Lage, A. P.; Dorneles, E. (2020). Relationship between virulence factors and antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. *Journal of global antimicrobial resistance*. 22: 792–802. Consultado em 19 de outubro de 2022. disponível em: <https://doi.org/10.1016>

Petersson-Wolfe, C.S.; Mullarky, I.K.; Jones, G.M. (2010). *Staphylococcus aureus* Mastitis: Cause, Detection, and Control. *VA Coop. Ext.* 404: 1-7.

Piepers, S.; Meulemeester, L.; Kruif, A.; Opsomer, G.; Barkema, H.W.; Vliegheer, S. (2007). Prevalence and distribution of mastitis pathogens in subclinically infected dairy cows in Flanders, Belgium. *J Dairy Res.* 74:478–83.

Pilla, R.; Bonura, C.; Malvisi, M.; Snel, G.G.M.; Piccinini, R. (2013). Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* as causative agent of dairy cow mastitis. *Veterinary Record*. 173: 19

- Powers, M.E.; Wardenburg, J.B. (2014). Igniting the Fire: *Staphylococcus aureus* Virulence Factors in the Pathogenesis of Sepsis. *PLoS Pathogens*. 10(2): e1003871.
- Queenan, A. M.; Bush, K. (2007). Carbapenemases: the Versatile  $\beta$ -Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*. 20: 440-458.
- Refai, M.; Niazi, Z. M.; Youssef, S. A. H.; El-Sawah, H.; (1988). Correlation between antibiotic resistance, enterotoxigenicity and enzymatic activities of *Staphylococcus aureus* recovered from foods. *Vet Med J*. 36: 107-109.
- Reiner, K. (2010). Catalase test protocol. American Society for Microbiology, *ASMMicrobe Library*.
- Ribeiro, S. C.; Stanton, C.; Yang, B.; Ross, R. P.; Silva, C. C. (2018). Conjugated linoleic acid production and probiotic assessment of *Lactobacillus plantarum* isolated from Pico cheese. *LWT – Food Science and Technology*. 90: 403-411.
- Roberson, J. R., Fox, L. K., Hancock, D. D., Gay, J. M., & Besser, T. E. (1996). Prevalence of coagulase-positive staphylococci, other than *Staphylococcus aureus*, in bovine mastitis. *American journal of veterinary research*. 57(1): 54–58.
- Roberson, J. R.; Fox, L. K.; Hancock, D. D.; Besser, T. E. (1992). Evaluation of methods for differentiation of coagulase-positive staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology*. 30(12): 3217-3219.
- Rodrigues, F.M.; Santos, O.; Gelatti, L.C. (2012). *Staphylococcus Aureus*: uma revisão. *Revista Eletrônica de Ciências Humanas, Saúde e Tecnologia*. 1(2): 90-101.
- Ryman, V.E.; Kautz, F.M.; Nickerson, S.C. (2021) Case Study: Misdiagnosis of Nonhemolytic *Staphylococcus aureus* Isolates from Cases of Bovine Mastitis as Coagulase-Negative Staphylococci. *Animals*. 11: 252.
- Sabini, L.; Torres, C.; Demo, M.; Sutil, S.; Lara, L. (2001). Effect of Staphylococcus toxins isolated from dairy cow milk on vero cell monolayers. *Revista Latinoamericana de Microbiologia*. 43:13- 18.
- Saini, V.; McClure, J.T.; Léger, D.; Dufour, S.; Sheldon, A.G.; Scholl, D.T.; Barkema, H.W. (2012). Antimicrobial use on Canadian dairy farms. *Journal of Dairy Science*. 95: 1209–1221.

Salazar, A. S. L. M. O. (2011). *Estudo da resistência às cefalosporinas de terceira geração de isolados de escherichia coli de origem canina*. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina veterinária. Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade Técnica de Lisboa. 81p.

Santos, A.K.R. (2008). *Comparação entre os meios de cultura Baird-Parker, Baird-Parker – RPF e Petrifilm™ Staph Express na detecção de Staphylococcus coagulase positivo em leite cru naturalmente contaminado e em leite esterilizado inoculado com culturas específicas*. Dissertação de Mestrado em Ciência Animal. Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 53p.

Sasaki, T.; Tsubakishita, S.; Tanaka, Y.; Sakabe, A.; Ohtsuka, M.; Hirota, S.; Kawakami, T.; Fukata, T.; Hiramatsu, K.; (2010). Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci. *Journal of clinical microbiology*. 48(3): 765–769.

Savini, V. (2018). Pet-to-man travelling staphylococci: A world in progress. New York: Elsevier Inc. 112-114 p.

Sharun, K.; Dhama, K.; Tiwari, R.; Gugjoo, M.B.; Yattoo, M.I.; Patel, S.K.; Pathak, M.; Karthik, K.; Khurana, S.K.; Singh, R.; Puvvala, B.; Amarpal; Singh, R.; Singh, K.P.; & Chaicumpa, W. (2021) Advances in therapeutic and managemental approaches of bovine mastitis: a comprehensive review, *Veterinary Quarterly*. 41(1): 107-136.

Shields, P.; Tsang, A.Y. (2006). Mannitol Salt Agar Plates Protocols. American Society for Microbiology, *ASMMicrobe Library*.

Silva, E. R.; Silva, T. R. M.; Pereira, A. M. G.; Machado, A. C.; Santoro, K. R. (2012). Produção de hemolisinas por *Staphylococcus aureus* isolados de casos de mastite bovina subclínica. *Acta Veterinaria Brasilica* 6 (2):118–123.

Silva, J. L. V. (2012). *Contribuição para um manual de boas práticas de manejo da ordenha para a produção de leite de elevada qualidade nos Açores: estudo de alguns pontos críticos de controlo*. Dissertação de Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar. Departamento de Ciências Agrárias. Universidade dos Açores. Angra do Heroísmo. 103p.

Silver, L. L. (2011). Challenges of antibacterial discovery. *Clinical microbiology reviews*. 24(1): 71-109.

Simor, A.E.; Goodfellow, J.; Louie, L.; Louie, M. (2001). Evaluation of a New Medium, Oxacillin Resistance Screening Agar Base, for the Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from Clinical Specimens. American Society for Microbiology. *Journal of Clinical Microbiology*. 39: 3422.

Smith, A.C.; Hussey, M.A. (2005). Gram Stain Protocols. *American Society for Microbiology*. E.U.A., 9 pp.

Sol J.; Sampimon, O.C.; Barkema, H.W.; Schukken, Y.H.; (2000). Factors associated with cure after therapy of clinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus*. *Journal of Dairy Science*. 83: 278–284.

Somme, M.O.A.; Church, G.M.; Dantas, G. (2010). The human microbiome harbors a diverse reservoir of antibiotic resistance genes. *Virulence*. 1(4): 299-303.

Souza, R. B.; Magnani, M.; Oliveira, T. C. R. M. (2010). Mecanismos de resistência às quinolonas em *Salmonella* spp. *Semina: Ciências Agrárias*. 31(2): 413-427.

SREA (2021). *Estatísticas regionais sobre leite de vaca recolhido diretamente da produção, setor primário na atividade económica regional e o volume de faturação da produção dos produtos lácteos*. Serviço Regional de Estatística dos Açores. Consultado em 5 de setembro de 2021. disponível em: <https://srea.azores.gov.pt/>

Stephan, R.; Annemüller, C.; Hassan, A. A.; Lämmli, C. (2001). Characterization of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in north-east Switzerland. *Veterinary microbiology*. 78(4): 373-382.

Taponen, S.; Supré, K.; Piessens, V.; Van Coillie, E.; De Vliegher, S.; Koort, J. (2012). *Staphylococcus agnetis* sp. nov., a coagulase-variable species from bovine subclinical and mild clinical mastitis. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 62(Pt 1): 61–65.

Takeuchi, S.; Ishiguro, K.; Ikegami, M.; Kaidoh, T.; Hayakawa, Y. (1998). Production of toxic shock syndrome toxin by *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cow's milk and farm bulk milk. *Veterinary Microbiology*. 59(4): 251-258.

Teixeira, P.; Ribeiro, C.; Simões, J. (2008). Prevenção de mamites em explorações de bovinos leiteiros. Da teoria à prática. Consultado em 10 de setembro de 2021. disponível em: <http://www.veterinaria.com.pt/>

- Timms, L.L.; Schultz, L.H. (1987). Dynamics and significance of coagulase-negative Staphylococcal intramammary infections. *J Dairy Sci.* 70: 2648–57.
- Valle, J.; Gomez-Lucia, E.; Piriz, S.; Goyache, J.; Orden, J. A.; Vadillo, S. (1990). Enterotoxin production by staphylococci isolated from healthy goats. *Applied and Environmental Microbiology.* 56(5): 1323-1326.
- Van Duijkeren, E.; Catry, B.; Greko, C.; Moreno, M. A.; Pomba, M. C.; Pyörälä, S.; Ružauskas, M.; Sanders, P.; Threlfall, E.J.; Torren-Edo, J.; Törneke, K. (2011). Review on methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *Journal of antimicrobial chemotherapy.* 66(12): 2705-2714.
- Vasudevan, P.; Nair, M.K.M.; Annamalai, T.; Venkitanarayanan, K.S. (2003). Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Veterinary Microbiology.* 92: 179-85.
- Vestergaard, M.; Frees, D.; Ingmer, H. (2019) Antibiotic Resistance and the MRSA Problem. *Microbiology Spectrum.* 7(2): 1–23.
- Vintov, J.; Aarestrup, F. M.; Zinn, C. E.; Olsen, J. E. (2003). Association between phage types and antimicrobial resistance among bovine *Staphylococcus aureus* from 10 countries. *Veterinary microbiology.* 95(1-2): 133-147.
- Walsh, C.T.; Wencewicz, T.A. (2016). Antibiotics: Challenges, Mechanisms, Opportunities. Washington, DC: *ASM Press*.
- Weckman, B.G.; Catlin, B.W. (1957) *Deoxyribonuclease activity of micrococci from clinical sources*. Department of Microbiology and Immunology, School of Medicine, Marquette University, Milwaukee, Wisconsin. 73(6): 747-753.
- Weller, T.M.; Crook, D.W.; Crow, M.R.; Ibrahim, W.; Pennington, T.H.; Selkon, J.B. (1997). Methicillin susceptibility testing of *staphylococci* by Etest and comparison with agar dilution and *mecA* detection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 39(2): 251-3.
- Werckenthin, C.; Cardoso, M.; Martel, J. L.; Schwarz, S. (2001). Antimicrobial resistance in staphylococci from animals with particular reference to bovine *Staphylococcus aureus*, porcine *Staphylococcus hyicus*, and canine *Staphylococcus intermedius*. *Veterinary research.* 32(3-4): 341-362.

Zadoks, R.N.; Allore, H.G.; Barkema, H.W.; Sampimon, O.C.; Wellenberg, G.J.; Grohn, Y.T.; Schukken, Y.H. (2001). Cow-and quarter-level risk factors for *Streptococcus uberis* and *Staphylococcus aureus* mastitis. *Journal of Dairy Science*. 84: 2649-2663.

Zafalon, L.F.; Arcaro, J.R.P.; Filho, A.N.; Ferreira, L.M.; Castelani, L.; Benvenuto, F. (2008). Investigação de perfis de resistência aos antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados na ordenha de vacas em lactação. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 67(2):118-125.

Zurita, J.; Mejía, C.; Guzmán-Blanco, M. (2010). Diagnóstico e teste de sensibilidade para *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina na América. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 14 (2): 97-107.

## VIII – Anexos

### Anexo A - Formulário de amostragem

Figura A1. Formulário de amostragem relativo à primeira colheita (01/10/2021)

DATA: 01/10/21      Recolha de Leite - Vacaria Granja da Universidade  
Projeto - Profª Maria de Lurdes Enes Dapkevicius

ID VACA	Quarto Ub	TCM	Obs
9330	AE	0	
	AD	0	
	PE	0	
	PD	1	
9325	AE	1	
	AD	1	
	PE	0	
	PD	0	
0398	AE	0	
	AD	0	
	PE	0	
	PD	0	
4020	AE	0	
	AD	0	
	PE	0	
	PD	0	
7819	AE	0	
	AD	0	
	PE	2	
	PD	0	
4325	AE	0	
	AD	1	
	PE	0	
	PD	2	
7821	AE	1	
	AD	0	
	PE	1	
	NAOTCM	—	
7214	AE	1	DOR NO QUARTO AD (HIPERCAVERATOSE)
	AD	0	
	PE	0	
	PD	0	
7219	AE	0	
	AD	0	
	PE	0	
	PD	0	
6350	AE	0	
	AD	0	
	PE	3	
	PD	0	

AE - ANTERIOR ESQUERDO  
 AD - ANTERIOR DIREITO  
 PE - POSTERIOR ESQUERDO  
 PD - POSTERIOR DIREITO

Figura A2. Formulário de amostragem relativo à segunda colheita (28/10/2021)

DATA: 28/10/2021 Recolha de Leite - Vacaria Granja da Universidade  
 Projeto - Profª Maria de Lurdes Enes Dapkevicus

ID VACA	Quarto Ub	TCM	Obs
9311	AE	1	foto supranumerário PE <del>supranumerário PE</del>
	AD	1	
	PE	0	
	PD	0	
4007	AE	0/1	PP - Filogenética colheita de leite.
	AD	0	
	PE	0	
	PD	0	
6385	AE	0	PP - Filogenética colheita de leite.
	AD	0	
	PE	2	
	PD	1	
<del>6343</del> 6343	AE	0	
	AD	0	
	PE	1	
	PD	1	
7226	AE	3	
	AD	1	
	PE	3	
	PD	2	
6172	AE	0	TUMEFACÃO DO QPD. → QUALITO ASSIMETRIA DO ÚBERE (FOTO) PD
	AD	2	
	PE	1	
	PD	3	
9326	AE	4	
	AD	1	
	PE	0	
	PD	3	
⊗ 6371	AE	3	⇒ NÃO RECOLHEU
	AD	4	
	PE	2	
	PD	1	
4018	AE	1	
	AD	1	
	PE	1	
	PD	0	
6356	AE	1	
	AD	0	
	PE	1	
	PD	0	
7131	AE	1	
	AD	1	
	PE	2	
	PD	1	

Classificação: 1-5  
 AE - Anterior - eq.  
 AD - Anterior - PD  
 PE - Posterior - eq.  
 PD - Posterior - PD

Figura A3. Formulário de amostragem relativo à terceira colheita (02/12/2021)

DATA: \_\_\_\_\_ Recolha de Leite - Vacaria Granja da Universidade  
Projeto - Profª Maria de Lurdes Enes Dapkevicius

ID VACA	Quarto Ub	TCM	Obs
1 7822	AE	0	
	AD	1	
	PE	0	
	PD	0	
2 3765	AE	0	
	AD	0	
	PE	0	
	PD	0	
3 6338	AE	0	
	AD	0	
	PE	0	
	PD	0	
4 6187	AE	1	PE ESTA SECO.
	AD	0	
	PE	X	
	PD	0	
5 6368	AE	0	
	AD	2	
	PE	0	
	PD	0	
6 5556	AE	3	ESTA PLANANDO IR PARA ABATE!
	AD	4	
	PE	1	
	PD	3	
7 6362	AE	2	
	AD	3	
	PE	4	
	PD	2	
8 6365	AE	1	<del>PE ESTA SECO</del>
	AD	1	
	PE	3	
	PD	0	
9 9847	AE	0	PE ANOTADO. NÃO PRODUZ LEITE
	AD	1	
	PE	0	
	PD	0	
10 7228	AE	1	
	AD	0	
	PE	0	
	PD	0	
11 1999	AE	0	
	AD	1	
	PE	2	
	PD	3	
12 3756	AE	1	QUATRO POSTERIORES PEQUENOS E JUNTOS.
	AD	1	
	PE	1	
	PD	0	
13 6001	AE	3	
	AD	3	
	PE	1	
	PD	0	
0513	AE	0	
	AD	0	
	PE	0	
	PD	0	
0367	AE	1	
	AD	1	
	PE	0	
	PD	0	

Figura A4. Formulário de amostragem relativo à quarta colheita (01/02/2022)

DATA: 01/02/2022

Recolha de Leite - Vacaria Granja da Universidade  
Projeto - Profª Maria de Lurdes Enes Dapkevicius

[5-0-5]  
[TCM  
not]

ID VACA	Quarto Ub	TCM	Obs
6367	AE	0	
	PE	1	
	AD	0	
	PD	2	
7218	AE	0	
	PE	0	
	AD	0	
	PD	0	
7142	AE	0	
	PE	0	
	AD	1	
	PD	0	
6364	AE	0	
	PE	0	
	AD	1	
	PD	2	
0509	AE	0	
	PE	0	
	AD	0	
	PD	0	
3772	AE	0	
	PE	0	
	AD	0	
	PD	0	
0525	AE	0	
	PE	0	
	AD	0	
	PD	0	
7215	AE	0	
	PE	0	
	AD	1	
	PD	0	
4007	AE	0	hipotrofia dos quadrantes posteriores.
	PE	0	
	AD	1	
	PD	0	
0508	AE	0	
	PE	0	
	AD	0	
	PD	0	
3775	AE	0	
	PE	0	
	AD	1	
	PD	0	
3763	AE	1	
	PE	2	
	AD	0	
	PD	0	
6265	AE	0	
	PE	1	
	AD	2	
	PD	4	
0457	AE	1	
	PE	0	
	AD	2	
	PD	2	
7146	AE	0	
	PE	0	
	AD	0	
	PD	0	

Figura A5. Formulário de amostragem relativo à quinta colheita (10/02/2022)

DATA: \_\_\_\_\_

Recolha de Leite - Vacaria Granja da Universidade  
Projeto - Profª Maria de Lurdes Enes Dapkevicius

ID VACA	Quarto Ub	TCM	Obs
0517	AE	1	
	PE	0	
	AD	1	
	PD	1	
3757	AE	0	VACA ESTEVE EM CIO HOJE.
	PE	0	
	AD	1	
	PD	0	
4307	AE	3	
	PE	1	
	AD	1	
	PD	1	
5238	AE	0	
	PE	0	
	AD	0	
	PD	0	
5555	AE	<del>0</del>	SECA. VAI PARA ABATE.
	PE	<del>0</del>	
	AD	<del>0</del>	
	PD	<del>0</del>	
6182	AE	0	
	PE	0	
	AD	0	
	PD	0	
6203	AE	1	
	PE	1	
	AD	0	
	PD	2	
6263	AE	<del>0</del>	
	PE	<del>0</del>	
	AD	<del>0</del>	
	PD	<del>1</del>	
6368	AE	3	
	PE	1	
	AD	2	
	PD	2	
6369	AE	1	
	PE	1	
	AD	0	
	PD	0	
8379	AE	2	
	PE	1	
	AD	0	
	PD	0	

## Anexo B – Resultados da análise estatística: estatísticas descritivas

**Quadro B1.** Análise descritiva dos dados relativos à Produção de Leite (kg) aos 305 dias das vacas leiteiras negativas e positivas para estafilococos coagulase-positivos (CoPS).

CoPS		Estatística	Estatística do teste		
			Padrão		
Leite (Kg)	Não	Média	7757,7059	191,13677	
		95% de Intervalo de Confiança para Média	Limite inferior	7373,7964	
			Limite superior	8141,6154	
		5% da média aparada		7710,0425	
		Mediana		7455,0000	
		Variância		1863196,452	
		Erro Padrão		1364,98954	
		Mínimo		5449,00	
		Máximo		11030,00	
		Amplitude		5581,00	
		Amplitude interquartil		1548,00	
		Assimetria		,653	,333
		Curtose		-,065	,656
	Sim	Média	7954,5714	658,81798	
		95% de Intervalo de Confiança para Média	Limite inferior	6342,5019	
			Limite superior	9566,6410	
		5% da média aparada		7896,2460	
		Mediana		7948,0000	
		Variância		3038287,952	
		Erro Padrão		1743,06854	
Mínimo			5933,00		
Máximo			11026,00		
Amplitude			5093,00		
Amplitude interquartil			2604,00		
Assimetria			,824	,794	
Curtose			,319	1,587	

**Quadro B2.** Análise descritiva dos dados relativos ao valor médio das C.C.S. das vacas leiteiras negativas e positivas para estafilococos coagulase-positivos (CoPS).

CoPS				Estadística do teste
C.C.S			Estadística	Padrão
Não	Média		173,2667	37,54550
	95% de Intervalo de Confiança para Média	Limite inferior	97,8543	
		Limite superior	248,6790	
	5% da média aparada		130,1667	
	Mediana		71,3000	
	Variância		71892,904	
	Erro Padrão		268,12852	
	Mínimo		18,00	
	Máximo		1490,70	
	Amplitude		1472,70	
	Amplitude interquartil		138,50	
	Assimetria		3,260	,333
	Curtose		12,671	,656
	Sim	Média		312,5429
95% de Intervalo de Confiança para Média		Limite inferior	32,5251	
		Limite superior	592,5607	
5% da média aparada			295,3310	
Mediana			279,7000	
Variância			91671,150	
Erro Padrão			302,77244	
Mínimo			19,10	
Máximo			915,80	
Amplitude			896,70	
Amplitude interquartil			340,20	
Assimetria			1,477	,794
Curtose			2,616	1,587

**Quadro B3.** Análise descritiva dos dados relativos ao N° de Lactações das vacas leiteiras negativas e positivas para estafilococos coagulase-positivos (CoPS).

N°Lactações	CoPS		Estatística	Estatística do teste	
	Não			Padrão	
	Não	Média	2,24	,187	
		95% de Intervalo de Confiança para Média	Limite inferior	1,86	
			Limite superior	2,61	
		5% da média aparada	2,11		
		Mediana	2,00		
		Variância	1,784		
		Erro Padrão	1,335		
		Mínimo	1		
		Máximo	6		
		Amplitude	5		
		Amplitude interquartil	2		
		Assimetria	1,174	,333	
		Curtose	1,035	,656	
		Sim	Média	2,71	,286
	95% de Intervalo de Confiança para Média		Limite inferior	2,02	
			Limite superior	3,41	
	5% da média aparada		2,68		
	Mediana		3,00		
	Variância		,571		
	Erro Padrão	,756			
	Mínimo	2			
	Máximo	4			
	Amplitude	2			
	Amplitude interquartil	1			
	Assimetria	,595	,794		
	Curtose	-,350	1,587		

**Quadro B4.** Análise descritiva dos dados relativos aos Dias em leite à data da colheita das vacas leiteiras negativas e positivas para estafilococos coagulase-positivos (CoPS).

CoPS		Estatística		Estatística do teste Padrão			
Dias em leite á data da colheita	Não	Média		173,33	15,566		
		95% de Intervalo de Confiança para Média	Limite inferior	142,07			
			Limite superior	204,60			
		5% da média aparada		166,99			
		Mediana		151,00			
		Variância		12356,667			
		Erro Padrão		111,161			
		Mínimo		14			
		Máximo		489			
		Amplitude		475			
		Amplitude interquartil		147			
		Assimetria		,743	,333		
		Curtose		,364	,656		
		Sim	Sim	Média		239,00	43,075
				95% de Intervalo de Confiança para Média	Limite inferior	133,60	
					Limite superior	344,40	
5% da média aparada				243,06			
Mediana				231,00			
Variância				12988,333			
Erro Padrão				113,966			
Mínimo				35			
Máximo				370			
Amplitude				335			
Amplitude interquartil				159			
Assimetria				-,807	,794		
Curtose				,586	1,587		

## Anexo C – Resultados dos testes morfológicos e fisiológicos dos isolados em estudo

Quadro C1. Resultados dos testes morfológicos e fisiológicos dos isolados em estudo.

	Isolados	Cor	Brilho	Tamanho (diâmetro) Isoladas	Catalase	Gram	Coagulase	Fermentação anaeróbia do manitol	DNase	Pigmentação laranja	Gelatinase	TBAB	ORSAB
1ª Colheita	7821PE02	Amarelo	Brilhante	2 mm	+	estafilococos gram-positivo (pequeno)	+	+	+	+	+	β	Sensível
2ª Colheita	6356AD02	Amarelo	Brilhante	3 mm	+	estafilococos gram-positivo	+	-	+	+	+	γ	Sensível
3ª Colheita	5556AD01	Amarelo	Brilhante	2 mm	+	estafilococos gram-positivo (pequeno)	+	+	-	+	-	β	Resistente
	5556AD02	Amarelo	Brilhante	2,5 mm	+	estafilococos gram-positivo (pequeno)	+	+	-	+	-	β	Resistente
	5556AD03	Amarelo	Brilhante	2,5 mm	+	estafilococos gram-positivo (pequeno)	+	+	-	+	-	β	Resistente
	5556AD04	Amarelo	Brilhante	2 mm	+	estafilococos gram-positivo (pequeno)	+	+	-	+	-	β	Resistente
	5556AD05	Amarelo	Brilhante	2mm	+	estafilococos gram-positivo (pequeno)	+	+	-	+	-	β	Resistente
	5556PD01	Amarelo	Brilhante	4 mm	+	estafilococos gram-positivo (pequeno)	+	+	+	+	-	β	Resistente
	5556PD02	Amarelo	Brilhante	1 mm	+	estafilococos gram-positivo (pequeno)	+	+	+	+	-	β	Resistente
	5556PD03	Amarelo	Brilhante	1 mm	+	cocos gram-positivo (pequeno)	+	+	+	+	-	β	Resistente
	5556PD04	Amarelo	Brilhante	3 mm	+	cocos gram-positivo (pequeno)	+	+	+	+	-	β	Resistente
	5556PD05	Amarelo	Brilhante	2,5 mm	+	cocos gram-positivo (pequeno)	+	+	+	+	+	β	Resistente
	5556AE01	Amarelo	Brilhante	1,5 mm	+	estafilococos gram-positivo (pequeno)	+	+	+	+	-	β	Resistente
	5556AE02	Amarelo	Brilhante	1,5 mm	+	estafilococos gram-positivo (pequeno)	+	+	+	+	-	β	Resistente
	5556AE03	Amarelo	Brilhante	2 mm	+	estafilococos gram-positivo	+	+	+	+	-	β	Resistente
	5556AE04	Amarelo	Brilhante	1 mm	+	estafilococos gram-positivo	+	+	+	+	-	β	Resistente
	5556AE05	Amarelo	Brilhante	2,5 mm	+	estafilococos gram-positivo (pequeno)	+	+	+	+	-	β	Resistente
	6368PD01	Amarelo	Brilhante	2 mm	+	estafilococos gram-positivo	+	+	+	+	+	β	Sensível
	6368PD02	Amarelo	Brilhante	1 mm	+	estafilococos gram-positivo	+	+	+	+	+	β	Sensível
	6368PD03	Amarelo	Brilhante	1 mm	+	estafilococos gram-positivo	+	+	+	+	+	β	Sensível
	6368PD04	Amarelo	Brilhante	1 mm	+	cocos gram-positivo (cachos)	+	+	+	+	+	β	Sensível
	6368PD05	Amarelo	Brilhante	3 mm	+	cocos gram-positivo (cachos)	+	+	+	+	+	β	Sensível
7822AD01	Amarelo	Bassa		1,5 mm	+	estafilococos gram-positivo	+	+	-	+	-	γ	Sensível
4ª Colheita	6367PD01	Amarelo	Brilhante	2 mm	+	estafilococos gram-positivo (semelhantes ao <i>S.aureus</i> )	+	+	+	+	+	β	Sensível
	6367PD02	Amarelo	Brilhante	3 mm	+	estafilococos gram-positivo (semelhantes ao <i>S.aureus</i> )	+	+	+	+	+	β	Sensível
	6367PD03	Amarelo	Brilhante	2,5 mm	+	estafilococos gram-positivo (semelhantes ao <i>S.aureus</i> )	+	+	+	+	+	β	Sensível
	6367PD04	Amarelo	Brilhante	3 mm	+	estafilococos gram-positivo (semelhantes ao <i>S.aureus</i> )	+	+	+	+	+	β	Sensível
	6367PD05	Amarelo	Brilhante	3 mm	+	estafilococos gram-positivo (semelhantes ao <i>S.aureus</i> )	+	+	+	+	+	β	Sensível
	6364PD01	Creme	Brilhante	2 mm	+	estafilococos gram-positivo	+	+	+	-	+	β	Sensível
	6364PD02	Creme	Brilhante	2 mm	+	estafilococos gram-positivo, mas não forma cacho	+	+	+	-	+	β	Sensível

**Quadro C2.** Resultados do teste de produção de biofilmes às 24 horas.

Isolados	Rep_1	Rep_2	Rep_3	Rep_4	Media	desv_pad	erro_pad
Branco	0,0255	0,0255	0,0293333	0,0263333	0,0266667	0,0015767	0,000788
6368PD01	0,038	0,07	0,063	0,046	0,05425	0,0128136	0,006407
6364PD01	0,057	0,067	0,057	0,057	0,0595	0,0043301	0,002165
5556AE03	0,053	0,061	0,038	0,097	0,06225	0,0216953	0,010848
6356AD02	0,067	0,073	0,062	0,06	0,0655	0,0050249	0,002512
7821PE02	0,058	0,081	0,076	0,062	0,06925	0,009523	0,004761
5556PD04	0,067	0,073	0,068	0,098	0,077	0,013	0,00631
5556AE05	0,039	0,119	0,087	0,08	0,08125	0,0284814	0,014241
5556AE02	0,078	0,057	0,102	0,108	0,08625	0,0202778	0,010139
6368PD02	0,056	0,148	0,089	0,058	0,08775	0,0371643	0,018582
5556PD03	0,083	0,132	0,087	0,059	0,09025	0,0263759	0,013188
6368PD03	0,06	0,131	0,093	0,113	0,09925	0,0263474	0,013174
5556AE04	0,15	0,08	0,079	0,103	0,103	0,0287837	0,014392
5556AE01	0,089	0,078	0,124	0,137	0,107	0,024259	0,01213
6367PD04	0,068	0,094	0,185	0,099	0,1115	0,0440369	0,022018
6367PD03	0,08	0,176	0,111	0,114	0,12025	0,0348308	0,017415
6368PD04	0,058	0,16	0,108	0,159	0,12125	0,0421389	0,021069
6367PD01	0,073	0,194	0,122	0,123	0,128	0,0431335	0,021567
6367PD02	0,086	0,152	0,129	0,167	0,1335	0,0305819	0,015291
6368PD05	0,077	0,181	0,133	0,144	0,13375	0,0372785	0,018639
7822AD01	0,128	0,128	0,133	0,154	0,13575	0,0107325	0,005366
6367PD05	0,132	0,135	0,222	0,071	0,14	0,0537913	0,026896
6364PD02	0,129	0,173	0,174	0,129	0,15125	0,0222528	0,011126
ATCC 25923	0,222	0,114	0,123		0,153	0,0489285	0,024464
5556PD05	0,138	0,145	0,194	0,248	0,181	0,044	0,022083
5556PD01	0,182	0,128	0,225	0,247	0,1955	0,045445	0,022723
5556AD02	0,186	0,219			0,2025	0,0165	0,00825
5556PD02	0,212	0,25	0,214	0,174	0,2125	0,026884	0,013442
5556AD03	0,159	0,212	0,266	0,292	0,23225	0,0511975	0,025599
5556AD01	0,293	0,342	0,291	0,248	0,2935	0,0332754	0,016638
5556AD05	0,397	0,425	0,261	0,236	0,32975	0,0823267	0,041163
5556AD04	0,561	0,49	0,494	0,267	0,453	0,1110293	0,055515

**Quadro C3.** Resultados do teste de produção de biofilmes às 48 horas.

Isolados	Rep_1	Rep_2	Rep_3	Rep_4	Media	desv_pad	erro_pad
Branco	0,027	0,032	0,029		0,0293333	0,0021	0,001027402
6364PD02	0,029	0,03	0,03	0,031	0,03	0,0007	0,000353553
6368PD05	0,075	0,06	0,078	0,08	0,07325	0,0079	0,00392707
6368PD03	0,072	0,071	0,074	0,095	0,078	0,0099	0,004937104
5556AE03	0,09	0,088	0,061	0,075	0,0785	0,0116	0,005814852
6368PD04	0,08	0,085	0,068	0,096	0,08225	0,0101	0,0050296
6368PD02	0,085	0,078	0,086	0,09	0,08475	0,0043	0,002161452
5556AE04	0,109	0,08	0,095	0,107	0,09775	0,0116	0,005781166
6368PD01	0,158	0,089	0,083	0,081	0,10275	0,0320	0,016017081
5556AE05	0,098	0,147	0,098	0,094	0,10925	0,0219	0,010928032
5556AD02	0,118	0,11	0,103	0,125	0,114	0,0083	0,004138236
6367PD01	0,133	0,115	0,117	0,136	0,12525	0,0093	0,004668712
5556AD01	0,109	0,151	0,13	0,117	0,12675	0,0159	0,007940206
6367PD02	0,14	0,12	0,097	0,153	0,1275	0,0212	0,010585958
5556PD03	0,136	0,118	0,125	0,157	0,134	0,0147	0,007373941
6367PD04	0,206	0,105	0,144	0,095	0,1375	0,0436	0,021790193
5556PD02	0,079	0,162	0,135	0,184	0,14	0,0393	0,01963097
6367PD03	0,189	0,102	0,144	0,137	0,143	0,0310	0,015479826
5556AD05	0,123	0,128	0,135	0,206	0,148	0,0338	0,01687824
ATCC 25923	0,222	0,114	0,123		0,153	0,0489	0,02446426
5556PD04	0,132	0,151	0,239	0,122	0,161	0,0462	0,023111144
5556AE02	0,198	0,159	0,147	0,163	0,16675	0,0190	0,009489303
6367PD05	0,233	0,17	0,116	0,152	0,16775	0,0424	0,021196624
6364PD01	0,167	0,156	0,207	0,146	0,169	0,0232	0,011581235
5556PD05	0,255	0,18	0,222	0,092	0,187	0,0611	0,030539677
5556AD03	0,271	0,134	0,231	0,427	0,26575	0,1056	0,052793673
5556AD04	0,346	0,239	0,296	0,199	0,27	0,0558	0,027899373
5556AE01	0,367	0,285	0,295	0,219	0,2915	0,0525	0,026233328
5556PD01	0,207	0,267	0,294	0,494	0,3155	0,1078	0,053880075
7821PE02	0,429	0,395	0,395	0,267	0,3715	0,0619	0,030954604
6356AD02	0,391	0,662	0,532	0,318	0,47575	0,1322	0,06610633
7822AD01	0,571	0,536	0,593	0,409	0,52725	0,0712	0,035616666

## Anexo D – Resultados dos testes de resistência/ sensibilidade aos antibióticos dos isolados em estudo

Quadro D1. Diâmetros (mm) de inibição obtidos no teste de resistência a antibióticos (Kirby-Bauer).

Isolado	Antibióticos																					
	CPT 30	CEP 30	FOX 30	P1	PNV 40	K 30	TOB 30	CN 10	NOR 10	MXF 5	C 30	E 15	MH 30	TE 30	RD 5	MUP 200	QD 15	LZD 10	LZD 10 (48h)	FD 50	W 5	SXT 25
6368PD01	41,8	36,7	29	38,2 <sup>D</sup>	47,5	27,1	31,75	27,55	28,4	33,3	28,4	30,5	32,25	33,5	35,8	39,45	24,4	30,5	28,35	36,45	29,05	36,6
6368PD02	39,5	33,5	26	35,5 <sup>D</sup>	43	22,5	28	24,5	26	28,5	23,5	27	26,5	28	31	35	22	25	24,5	37	22,5	31,5
6368PD03	43,5	37,5	25,5	41,5 <sup>D</sup>	48	26	31	27,5	30	34	30,5	30	32	33	35,5	38,5	24,5	28,5	29	37,5	28,5	35
6368PD04	44,5	39	27,5	39,5 <sup>D</sup>	49	26,5	31,5	27	30	34,5	30,5	30	32	34	35,5	38,5	29	29,5	28,5	38,5	29	35,5
6368PD05	39	34	26	38,5 <sup>D</sup>	42	23	28,5	26	29,5	29,5	26	29,5	28,5	31	33,5	33,5	27	27	26,5	37,5	24,5	31
6367PD01	44	34,5	27	36 <sup>D</sup>	41,5	21	28	21,5	28,5	32	27	28,5	32,5	31,5	32,5	34	23	30	28,5	36	25,5	30,5
6367PD02	40,5	35	27,5	32 <sup>D</sup>	42,5	24	29	26	32	30	28,5	29	29	29	34	35,5	21,5	26	27,5	34,5	25,5	33
6367PD03	40,5	35,5	27	36 <sup>D</sup>	45	24	33,5	26,5	30	31,5	28,5	30	28,5	31	35	35	22,5	29	29	36	27	31
6367PD04	40,5	33,5	27	35,5 <sup>D</sup>	43	24,5	28,5	25,5	27,5	31	27	27,5	28	28,5	33	36,5	25	25	N.D.	34,5	27,5	32,5
6367PD05	39	36	26,5	35,5 <sup>D</sup>	43,5	24	29	25	29	31	27,5	27,5	28	30	33,5	38,5	25,5	25,5	N.D.	34,5	23,5	30
5556AE01	35,5	29,5	23,5	36 <sup>A</sup>	36,5	20	26,5	20	30,5	34	30,5	30,5	31	31	34,5	35,5	24,5	31	31,5	34,5	26	35,5
5556AE02	41	37	27,5	36,5 <sup>D</sup>	46,5	25	31	28	31	34	32	32	34	35,5	36,5	41,5	23	31,5	32,5	41	30	39
5556AE03	42	36,5	26	36,5 <sup>D</sup>	47	38,5	33,5	28,5	30	35	31,5	32	33	34,5	36	40	25	30,5	31,5	39,5	30	37,5
5556AE04	37,5	32,5	25	37 <sup>D</sup>	42,5	23,5	28,5	24,5	27	30,5	27	28	29	27,5	33	37	24,5	28	28	35,5	24,5	33
5556AE05	36	33	25	36 <sup>D</sup>	43,5	23	28	23,5	26	30	27	26	26	28,5	32,5	33	22	27,5	27,5	33	23,5	31,5
5556AD01	37	34	27	30,5 <sup>D</sup>	43	26	31	26,5	27	31,5	30	29	30,5	37	34	37,5	23	31	31,55	36,5	26	35,5
5556AD02	36,5	34	24,5	33 <sup>D</sup>	42,5	23,5	28	23	26	29	27,5	26	26	29	32,5	34,5	21,5	27,5	28	36	25,5	33,5
5556AD03	38,5	35	26,5	36,5 <sup>D</sup>	46	25	28,5	26	27	31	28,5	28	28,5	30,5	32,5	38,5	22	27,5	28,5	37	25,5	34
5556AD04	36,5	34,5	26	37 <sup>D</sup>	43	25	28,5	24	28	30,5	29	28	28,5	29,5	33	34	23,5	28,5	29	34,5	24,5	34
5556AD05	37,5	34	27	36,5 <sup>D</sup>	42,5	24,5	29,5	24,5	28,5	32,5	29	29	29	31,5	34	37,5	23,5	29,5	30,5	37	27	34
5556PD01	34,5	32,5	24	32 <sup>D</sup>	39,5	23,5	28,5	23,5	25,5	29	28	26	27	27	32,5	34	21,5	26,5	26,5	33,5	23,5	33,5
5556PD02	35	32,5	26	33,5 <sup>D</sup>	41,5	23,5	27	24	27	30	26,5	26,5	27,5	29,5	31,5	35	22	27,5	28	35	23,5	32
5556PD03	35	31	25,5	32,5 <sup>D</sup>	40	23,5	27,5	23,5	25,5	29,5	25	26	25	26,5	30,5	33	20,5	26	26	34	24	31,5
5556PD04	36,5	32	24	34 <sup>D</sup>	41	23	27	24	25	29	27	27	27	28,5	31,5	34	24	28	28,5	34	27	33
5556PD05	33	30,5	21	34 <sup>D</sup>	39	21,5	25,5	23	24,5	27,5	24,5	24,5	25	27,5	30	36	24,5	25	26	32	25	29
7821PE02	36,5	34,5	29	34 <sup>D</sup>	39,5	21	26,5	22,5	26,5	30,5	27,5	28,5	28	29,5	33	36	28	28,5	29,5	34,5	24	34
6352AD02	30	20,5	26	12 <sup>D</sup>	35,5	27	30	27,5	29,5	31	29	27	30	31,5	35	39	29	29	28,5	36	20	30,5
7822AD01	34	21,5	24,5	15 <sup>D</sup>	32,5	31,5	36	32,5	31	31,5	30,5	31,5	31,5	33,5	35,5	39	29,5	32	32,5	39	20,5	30
6364PD01	56	48	31,5	49 <sup>A</sup>	64	30	33	31	35	40,5	31	34	36,5	37	38	45	27,5	34	32,5	43	33	38,5
6364PD02	46	50	31	50 <sup>A</sup>	60	29	33	30	31,5	36	29	36	35	36	38,5	43	25,5	32	31	41,5	32	38,5

<sup>D</sup> = Bordos distintos; <sup>A</sup> = Bordos indistintos;

**Quadro D2.** Resultados da determinação da concentração inibitória mínima (E-test).

<b>Isolado</b>	<b>Vancomicina</b>	<b>Teicoplanina</b>
6368PD01	0,25	0,016
6368PD02	0,25	0,094
6368PD03	0,5	0,023
6368PD04	0,38	0,064
6368PD05	0,5	0,064
6367PD01	0,125	0,047
6367PD02	0,25	0,032
6367PD03	0,25	0,032
6367PD04	0,25	0,064
6367PD05	0,5	0,064
5556AE01	0,38	0,125
5556AE02	0,38	0,064
5556AE03	0,38	0,125
5556AE04	0,5	0,125
5556AE05	0,25	0,19
5556AD01	N.D.	0,22
5556AD02	0,75	0,125
5556AD03	0,5	0,125
5556AD04	0,5	0,125
5556AD05	0,5	0,125
5556PD01	0,38	0,19
5556PD02	0,38	0,125
5556PD03	0,38	0,125
5556PD04	0,75	0,125
5556PD05	0,75	0,19
7821PE02	0,75	0,5
6352AD02	1	1
7822AD01	N.D.	1,5
6364PD01	0,047	0,016
6364PD02	0,5	0,016

**UNIVERSIDADE DOS AÇORES**  
**Faculdade de Ciências Agrárias e**  
**do Ambiente**

Rua Capitão João d'Ávila  
9700-042 Angra do Heroísmo  
Açores, Portugal