



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

TANIA ALEXANDRA ORTEGA SIERRA

Determinantes genéticos de resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus* spp. e bactérias da família *Enterobacteriaceae* isolados de leite de vacas e cabras com mastite subclínica em ecossistemas agropecuários do Nordeste Brasileiro

RECIFE

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

TANIA ALEXANDRA ORTEGA SIERRA

Determinantes genéticos de resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus* spp. e bactérias da família *Enterobacteriaceae* isolados de leite de vacas e cabras com mastite subclínica em ecossistemas agropecuários do Nordeste Brasileiro

Trabalho de tese apresentado ao Programa de Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do grau de Doutor em Biociência Animal.

Orientador: Rinaldo Aparecido Mota

Co-Orientador: Rodolfo de Moraes Peixoto

Recife

2023

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

S572d Sierra, Tania Alexandra Ortega
Determinantes genéticos de resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus* spp. e bactérias da família Enterobacteriaceae isolados de leite de vacas e cabras com mastite subclínica em ecossistemas agropecuários do Nordeste Brasileiro / Tania Alexandra Ortega Sierra. - 2023.
86 f. : il.

Orientador: Rinaldo Aparecido Mota.
Coorientador: Rodolfo de Moraes Peixoto.
Inclui referências e anexo(s).

Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Recife, 2023.

1. resistência a antimicrobianos. 2. bactérias. 3. genes. 4. antibiograma. 5. animais de produção. I. Mota, Rinaldo Aparecido, orient. II. Peixoto, Rodolfo de Moraes, coorient. III. Título

TANIA ALEXANDRA ORTEGA SIERRA

Determinantes genéticos de resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus* spp. e bactérias da família *Enterobacteriaceae* isolados de leite de vacas e cabras com mastite subclínica em ecossistemas agropecuários do Nordeste Brasileiro

Trabalho de tese apresentado ao Programa de Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do grau de Doutor em Biociência Animal.

Área de concentração: Biotecnologia

Data de aprovação:

Banca examinadora

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

Profº Drº Jose Wilton Pinheiro Junior (Membro Titular)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Profº Drº Artur Cezar de Carvalho Fernandes (Membro Titular)
Universidade Federal da Paraíba

Profº Drº José Givanildo da Silva (Membro Titular)
Universidade Federal da Bahia

Drº André de Souza Santos (Membro Titular)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dedicatória

A Dios por sobre todas las cosas

Agradecimentos

Agradeço a Deus porque Ele sempre ficou ao meu lado independentemente de onde eu estiver, falando para mim “...*Seja forte e corajoso! Não fique desanimado, nem tenha medo, porque eu, o Senhor, seu Deus, estarei com você em qualquer lugar para onde você for*” (Josué 1:9).

A minha mãe, Tania, pelo apoio que sempre me deu, que não importava a situação em que ela se encontrava, sempre estava ali para mim, eu só quero que ela fique orgulhosa de mim. A minha irmã, Liss, que como nunca eu senti o apoio dela, que apesar de eu ser a irmã mais velha foi ela quem me ajudou a me manter em pé. A minhas irmãs mais novas, Isa e Paulina, que o único que eu quero é sempre ser um exemplo de superação e força para elas.

Ao meu orientador, o professor Rinaldo, que além de ser meu orientador eu o considero meu amigo, por ter confiado em mim quando eu disse que queria fazer doutorado, e principalmente pelo apoio e a compreensão que ele me deu no meu pior momento, não existem palavras para poder agradecer como merece.

Aos professores que fazem parte do Laboratório de Doenças Infectocontagiosas do Departamento de Medicina Veterinária, pela ajuda nas coletas e com conhecimentos e conselhos quando eu não sabia para onde ir, em relação a minha pesquisa.

Agradeço minhas amigas, Polly, Gabi, Amandinha, Tai, Renatinha e Naza, que sempre confiaram em mim mas do que eu mesma; apesar da distância que a pandemia colocou entre nós, nossa amizade sempre brilhou.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que participaram direta ou indiretamente não só na elaboração do projeto, senão na minha formação acadêmica e pessoal.

Resumo

Objetivou-se estudar o perfil fenotípico e genético de resistência aos antimicrobianos em bactérias do gênero *Staphylococcus* e enterobactérias isoladas de leite cru de vacas e cabras no estado de Pernambuco. Foram coletadas amostras de leite de 426 vacas e 323 cabras em 6 e 17 propriedades leiteiras bovinas e caprinas, respectivamente. As amostras de leite das vacas e cabras foram semeadas em ágar sangue ovino e incubadas a 37°C por até 48 horas. Colônias que se apresentaram como cocos Gram positivos foram submetidas ao teste de catalase para a identificação de *Staphylococcus* spp. e posteriormente submetidos à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para identificação. As bactérias Gram negativos foram identificadas utilizando provas bioquímicas padrão. Os isolados de bovinos e caprinos identificados foram: 16,9% (45/267) *S. aureus*, 13,1% (35/267) *S. epidermidis*, 12,7% (34/267) *S. haemolyticus* e 19,5% (52/267) *S. chromogenes*, enquanto que 37,8% (101/267) não foram classificadas dentre dessas espécies. Vinte e seis isolados de leite de vaca foram identificados como *Escherichia coli* (53,9% [14/26]), *Proteus mirabilis* (15,4% [4/26]), *Klebsiella* spp. (26,9% [7/26]) e *Citrobacter* spp. (3,9% [1/26]), as quais foram submetidas a um teste de triagem para identificação de bactérias produtoras de β -lactamases de espectro estendido (BLEE) e à prova confirmatória Teste de Disco Duplo (DDT), utilizando cefotaxima (30 μ g), ceftriaxona (30 μ g), ceftazidina (30 μ g) e amoxicilina com ácido clavulânico (30 μ g). Dos 26 isolados de enterobactérias, 61,5% (16/26) foram positivos no teste de triagem para BLEE e 12,5% (2/16) foram positivos no DDT. Posteriormente, os 26 isolados foram analisados para os genes codificadores de BLEE, *blaSHV* e *blaTEM*, sendo que 53,9% (14/26) positivos para um ou os dois genes e 71,4% (10/14) foram identificados como *Escherichia coli*. Por outro lado, foram identificados 148 e 119 isolados de *Staphylococcus* spp. de vacas e cabras, respectivamente, para o estudo do perfil fenotípico de resistência na técnica de difusão em ágar com os discos de antibióticos: penicilina (10UI), tetraciclina (30 μ g), cefoxitina (30 μ g), eritromicina (15 μ g), Clindamicina (2 μ g) e ceftiofur (30 μ g). Nos isolados de bovinos observou-se expressiva frequência de resistência à penicilina (52,0% [77/148]), seguido da tetraciclina (10,1% [15/148]), e nenhum isolado foi resistente ao ceftiofur. Em relação aos determinantes genéticos de resistência, o padrão mais observado foi a presença do gene *blaZ* (40,5%

[60/148]) e do gene *tetK* (14,9% [22/148]). Nos isolados de cabras observou-se padrão semelhante de resistência com a frequência de resistência à penicilina e à tetraciclina de 45,0% (53/119) e 30,3% (36/119), respectivamente. Em relação aos genes de resistência observou-se uma maior frequência do gene *blaZ* com 50,4% (60/119) e *tetK* com 45,0% (53/119). Nos *Staphylococcus* spp. de ambas espécies foi realizada o D – teste para identificar cepas capazes de induzir resistência à lincosamidas e estreptogramina, utilizando-se discos de eritromicina (15 µg) e clindamicina (2 µg). Nos isolados de *Staphylococcus* spp. de vacas obteve-se 0,7% (1/148) de D – teste positivo, 7,4% (11/148) foram resistentes aos MLS, 1,4% (2/148) apresentaram resistência somente aos MS e 2,0% (3/148) foram resistentes à clindamicina (L+). Para os isolados de cabras obteve-se 3,4% (4/119) D - teste positivo, 0,8% (1/119) foi resistente aos MLS e 0,8% (1/119) ao L+. Os resultados obtidos demonstram a circulação de cepas resistentes aos antimicrobianos no sistema agropecuário do estado de Pernambuco, representando um risco à saúde animal e pública.

Palavras chaves: resistência a antimicrobianos, bactérias, genes, antibiograma, bovinos, caprinos.

Abstract

It was aimed to study the phenotypic and genetic profile of antimicrobial resistance in bacteria of the *Staphylococcus* genus and Enterobacteriaceae family isolated from raw cow and goat's milk in the state of Pernambuco. Milk samples were collected from 426 cows and 323 goats, in 6 and 17 bovine and goat dairy farms, respectively. All milk samples were inoculated into base agar with 5% ovine blood and incubated at 37°C for up to 48 hours. Colonies that presented microscopic morphology of Gram positive cocci were submitted to the catalase test for the identification of *Staphylococcus* spp. and subsequently submitted to PCR for identification. Gram negative bacteria were identified using biochemical tests. Among bovine and caprine isolates, 16.9% (45/267) *S. aureus*, 13.1% (35/267) *S. epidermidis*, 12.7% (34/267) *S. haemolyticus* and 19.5% (52/267) *S. chromogenes* were identified, while 37.8% (101/267) were not positive for the tested species. Twenty-six cow milk isolates were identified as *Escherichia coli* (53.9% [14/26]), *Proteus mirabilis* (15.4% [4/26]), *Klebsiella* spp. (26.9% [7/26]) and *Citrobacter* spp. (3.9% [1/26]). All the isolates were submitted to a screening test to identify BLEE (extended spectrum β -lactamase) -producing bacteria and confirmatory test (Double disc test), using cefotaxime (30 μ g), ceftriaxone (30 μ g), ceftazidime (30 μ g) and amoxicillin with clavulanic acid (30 μ g). Of the 26 enterobacteria isolates, 61.5% (16/26) were positive in the BLEE screening test and 12.5% (2/16) were positive in the DDT. Subsequently, all 26 isolates were analyzed for the BLEE-encoding genes, *blaSHV* and *blaTEM*. 53.9% (14/26) were positive for one or both genes and 71.4% (10/14) were identified as *Escherichia coli*. On the other hand, 148 and 119 isolates of *Staphylococcus* spp. were identified from cows and goats, respectively. for the study of the phenotypic profile of antimicrobial resistance using the technique of diffusion in agar with the discs of antibiotics: penicillin (10 UI), tetracycline (30 μ g), cefoxitin (30 μ g), erythromycin (15 μ g), Clindamycin (2 μ g) and ceftiofur (30 μ g). In bovine isolates, a significant frequency of resistance to penicillin (52.0% [77/148]) was observed, followed by tetracycline (10.1% [15/148]), and none of the isolates was resistant to ceftiofur. Regarding the genetic determinants of resistance, the most observed pattern was the presence of the *blaZ* gene (40.5% [60/148]) and the *tetK* gene (22.3% [22/148]). In isolates from goats, the same pattern of resistance was observed as in isolates from cows, with a frequency of resistance to penicillin and tetracycline of 45.0% (53/119) and 30.3% (36/119), respectively. Regarding the resistance genes, a

higher frequency of the *blaZ* gene was observed with 50.4% (60/119) followed by *tetK* with 45.0% (53/119). In *Staphylococcus* spp. of both species, the D - test was performed to identify strains capable of inducing resistance to lincosamides and streptogramin, using discs of erythromycin (15 µg) and clindamycin (2 µg). In the isolates of *Staphylococcus* spp from cows, 0.7% (1/148) were positive D-test, 7.4% (11/148) were resistant to MLS, 1.4% (2/148) were resistant only to to MS (D – negative test) and 2.7% (3/148) were resistant to clindamycin (L+). For isolates from goats, 3.4% (4/119) D-test positive were obtained, 0.8% (1/119) were resistant to MLS and 0.8% (1/119) were L+. These results demonstrate the circulation of antimicrobial resistant strains in the agricultural system of the state of Pernambuco, representing a risk to animal and public health.

Key words: antimicrobial resistance, bacteria, genes, antibiogram, cattle, goats.

Sumario

Lista de Figuras.....	13
Lista de Tabelas.....	14
Lista de abreviaturas.....	15
1. Introdução.....	16
2. Revisão de literatura.....	19
2.1. Ecossistemas agropecuários.....	19
2.2. Mastite.....	19
2.3. Família <i>Enterobacteriaceae</i>	21
2.4. Gênero <i>Staphylococcus</i>	23
2.5. Resistência bacteriana aos antimicrobianos.....	27
2.6. Mecanismos de resistência aos antimicrobianos.....	28
2.7. β -lactamases.....	29
2.8. β -lactamases de espectro estendido (BLEE).....	31
2.9. <i>Staphylococcus</i> spp. resistentes à metilina (MRS).....	32
2.10. Resistência aos macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas (MLS) ...	34
2.11. Resistência às tetraciclina.....	36
2.12. Resistência aos antibióticos na cadeia alimentar.....	37
3. Objetivos.....	41
3.1. Objetivo geral.....	41
3.2. Objetivos específicos.....	41
4. Referências.....	42
5. Capítulo 1.....	52
Ocorrência de enterobactérias produtoras de B-lactamases de espectro estendido (BLEE) em leite cru de vacas com mastite subclínica no Nordeste brasileiro.....	53
6. Capítulo 2.....	63
Padrões de resistência de <i>Staphylococcus</i> spp. isolados de leite vacas e cabras com mastite subclínica no Nordeste brasileiro.....	64
7. Considerações Finais.....	84
8. Anexos.....	85
8.1. Anexo A Lista de substâncias proibidas e legislação correspondente (Atualizado em 20/02/2020). MAPA.....	85

8.2. Anexo B Comprovante de submissão à revista Brazilian Journal of Microbiology.....	86
--	----

Lista de Figuras

Figura 1 Representação esquemática de diferentes mecanismos de resistência a antibióticos em bactérias, adaptado de Wright (2010).	29
Figura 2 Distribuição de cepas resistente na cadeia produtiva de alimentos. Fonte: o autor.	40

Capítulo 1

Figura 1 Isolado positivo na prova de sinergia de disco duplo. Na figura observa-se o alargamento ou “zona fantasma” em direção ao disco de ácido clavulânico.	62
---	----

Capítulo 2

Figura 1. Localização das propriedades de coleta. Municípios das propriedades bovinas: Panelas (1), Garanhuns (2), Caetés (1), Águas Belas (1), Tupanatinga (1). Municípios das propriedades caprinas: Pombos (2), Garanhuns (1), Belém de São Francisco (3), Floresta (1), São José de Egito (2), Iguaraci (2), Sertânia (4), Venturosa (2).....	67
Figura 2. Fenótipo positivo no D-test, apresentando achatamento na zona de inibição da Clindamicina adjacente ao disco de Eritromicina e crescimento de colônias em direção ao disco de Clindamicina (Fonte: o autor).	72

Lista de Tabelas

Tabela 1. Representantes de bactérias da família <i>Enterobacteriaceae</i> isoladas de casos de mastite bovina e caprina no Brasil no período de 2010 a 2022	22
Tabela 2. Bactérias do gênero <i>Staphylococcus</i> como agentes causais de mastite bovina e caprina no Brasil no período de 2012 a 2022.	24
Tabela 3. Estudos relacionados com a identificação de bactérias pertencentes à família <i>Enterobacteriaceae</i> produtoras de BLEE no Brasil no período 2012 -- 2022.	32
Tabela 4. <i>Staphylococcus resistentes a metilina</i> isolados de leite no Brasil no período 2012 – 2022.	33
Tabela 5. Apresentação de estudos identificando isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. resistentes aos MLS de leite no Brasil no período 2012 – 2022.....	35
Tabela 6. Estudos prévios identificando frequência da resistência à tetraciclina no Brasil no período 2012 – 2022.	36

Capítulo 2

Tabela 1 <i>Primers</i> utilizados para identificação de espécies de <i>Staphylococcus</i> spp.	67
Tabela 2 <i>Primers</i> utilizados na identificação de genes codificadores da resistência aos antibióticos.	69
Tabela 3 Perfil de sensibilidade aos antibióticos de <i>Staphylococcus</i> spp. isolados de leite bovina e caprina do estado de Pernambuco.....	73
Tabela 4 Identificação dos fenótipos observados na prova D-teste.	74
Tabela 5 Perfil genotípico de resistência às diferentes classes de antimicrobianos.	76
Tabela 6 Resultado da análise do teste exato de Fisher entre a presença do gene e a expressão fenotípica, estratificada por espécie (bovina e caprina).	77

Lista de abreviaturas

OMS – Organização mundial da saúde

CMT – *California Mastitis Test*

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

BLEE – β -lactamase de espectro estendido

DDT – Teste de disco duplo

MLS_b – Macrolídeos, Lincosamidas e Streptogramina

MS – Macrolídeos e Streptogramina

L - Lincosamidas

MRS – *Staphylococcus* spp resistentes à metilina

MRSA – *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina

FDA – *Food and Drug Administration*

1. Introdução

A população humana vem crescendo exponencialmente, o que leva a um aumento na demanda por alimentos de origem animal, principalmente nos países em desenvolvimento (FAO et al., 2016; KLAAS; ZADOKS, 2018).

No Brasil, a produção de leite tem um grande impacto econômico e social, sendo o terceiro maior produtor mundial de leite com mais de 34 bilhões de litros de produzidos ao ano (MAPA, 2022). A caprinocultura no Brasil apesar de não ter uma representação econômica considerável, se constitui em uma atividade importante para os pequenos produtores e uma fonte de emprego, principalmente para as regiões Nordeste e Sul onde está amplamente difundida (FEITOSA; CAMPOS; LEITE, 2020; PERDIGÃO; OLIVEIRA; CORDEIRO, 2016).

Na região Nordeste do Brasil, as produções de bovinos e caprinos apresentam uma grande relevância econômica, destacando-se a produção de caprinos. Para a espécie bovina, o efetivo na região tem se mantido estável desde o ano de 2007 e o estado de Pernambuco possui 1.876.961 cabeças de animais (BDE, 2021a) com produção de leite de 1.062.332 litros/dia (BDE, 2021b). Para os caprinos, esta região manteve o primeiro lugar do rebanho nacional com 93,25% do rebanho, sendo o estado de Pernambuco o quarto maior produtor do país com 3.116.629 cabeças (BDE, 2021a), com uma produção de leite de 2.934.079 litros/dia (PERDIGÃO; OLIVEIRA; CORDEIRO, 2016).

A inflamação da glândula mamária (mastite) é uma doença plurietiológica e multifatorial, e considerada uma das principais enfermidades responsáveis por prejuízos à indústria leiteira (FAO, 2014). Esta doença pode ocorrer de forma clínica cursando com mudanças visíveis na glândula mamária e no leite e a subclínica onde a inflamação da glândula mamária não é visível. A mastite subclínica é a mais importante, visto que tem uma alta prevalência e produz um grande impacto econômico pela diminuição da produção do leite (BONILLA; MURILLO; ALMANZA, 2018).

Os agentes causadores da mastite infecciosa estão divididos em microrganismos de origem contagiosa e ambiental (COBIRKA; TANCIN; SLAMA, 2020). Estudos epidemiológicos sobre a etiologia da mastite bovina e caprina indicam que os microrganismos de origem contagiosa são os mais prevalentes e o gênero

Staphylococcus se destaca por possuir maior frequência de casos clínicos e subclínicos (ZSCHÖCK et al., 2000).

Os agentes da mastite de origem ambiental são principalmente os coliformes (*Escherichia coli* e *Klebsiella* spp.). Apesar de serem menos prevalentes que a mastite contagiosa, tem muita relevância na produção, e com o passar dos anos sua incidência vem aumentando com a necessidade do aumento da produção de leite (KLAAS; ZADOKS, 2018), que aumenta o estresse do animal, deixando-o mais suscetível aos microrganismos oportunistas (CHENG; HAN, 2020).

O tratamento da mastite de origem contagiosa e ambiental é realizado a base de antibióticos, porém, devido à alta capacidade dos microrganismos adquirirem e transferirem os genes de resistência a antimicrobianos também apresenta impacto relevante para a Saúde Pública (KIBEBEW, 2017).

A resistência aos antimicrobianos é um sério problema para a Saúde Pública global e a Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou a lista de patógenos prioritários para pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos, estando no grupo crítico, as bactérias da família *Enterobacteriaceae* e no grupo de prioridade alta, *Staphylococcus* spp. resistentes à metilina (MRS) (WHO, 2017).

A maioria das cepas de *Staphylococcus* spp. resistentes à metilina são potencialmente resistentes a todos os antibióticos β -lactâmicos (PATERSON; HARRISON; HOLMES, 2014). A resistência aos β -lactâmicos em MRS é produto da inativação enzimática codificada pelos genes *BlaZ* e pela modificação do alvo codificado pelo gene *mec* (Staphylococcal Cassette Chromosome [SCCmec]) (WENDLANDT et al., 2013). Estudos anteriores já relataram a presença de genes de resistência em MRS isolados de leite e produtos lácteos no Brasil onde 100% de isolados MRSA obtidos de bovinos portadores de mastite clínica possuíam o gene *mecA* (COELHO et al., 2009). No Nordeste do Brasil, o gene *mecC* já foi identificado por Silva et al. (2021) em isolados de *Staphylococcus aureus* em propriedades bovinas leiteiras no estado de Pernambuco, confirmando a presença de cepas MRSA no país.

Além dos β -lactâmicos, a resistência aos antimicrobianos também é observada para outros grupos de antibióticos. As tetraciclina são antibióticos amplamente utilizados na medicina humana e veterinária. A resistência para esse grupo de antibiótico está associada aos diferentes genes *tet* que codificam a bomba de efluxo e à proteção ribossomal (NG et al., 2001). Os macrolídeos, lincosamidas e

estreptograminas (MLS) são antibióticos utilizados na medicina humana para tratamento de infecções causadas por espécies de *Staphylococcus* resistentes à meticilina e vancomicina (PALMEIRA et al., 2020; WANG et al., 2008). A eritromicina (Macrolídeo) e a pirlimicina (Lincosamida) são os mais utilizados no gado leiteiro no tratamento de mastite (PYÖRÄLÄ et al., 2014). A resistência aos MLS pode ocorrer por três mecanismos como a modificação na metilação, bomba de efluxo e inativação da droga (FEßLER et al., 2018).

As bactérias da família *Enterobacteriaceae* podem carrear genes que codificam as beta-lactamases, sendo as mais importantes as beta-lactamases de espectro estendido (BLEE) que conferem uma elevada resistência às cefalosporinas de primeira, segunda e terceira geração, monobactâmicos (Azetreonam) e às oximino cefalosporinas por meio da hidrólise do anel β -lactâmico (BERGŠPICA et al., 2020).

Na cadeia produtiva dos bovinos e caprinos geralmente ocorre o contato direto entre os humanos e animais, sendo uma importante ligação na transmissão de bactérias resistentes e multirresistentes entre espécies (VAN BOECKEL et al., 2015). O monitoramento dos mecanismos de desenvolvimento e disseminação de resistência aos antimicrobianos no ambiente agropecuário poderá ser um ponto crítico para o avanço no aprimoramento da vigilância à saúde única (MAPA, 2021).

Desta forma, conhecer os mecanismos que desencadeiam a resistência aos antimicrobianos implica em entender a evolução como um todo. Como a mudança genética é a base de todo processo evolutivo, a probabilidade de ocorrência dessa mudança representa o primeiro ponto de controle do desenvolvimento da resistência aos antimicrobianos (MARTINEZ et al., 2009).

2. Revisão de literatura

2.1. Ecossistemas agropecuários

O ecossistema agropecuário é definido como a inclusão dos animais de produção, alimentação, estrume, sistemas de manejo, solo, água e o ser humano, que são submetidos a contínuas modificações (atividades agropecuárias) para a produção de proteína e fibra; ocupa o 38% de área terrestre, e é considerado o maior ecossistema da era antropocena (LUBY et al., 2016; OWINO et al., 2022).

As atividades agropecuárias estão se convertendo em práticas importantes para a sustentabilidade da qualidade de vida das populações humanas, porém, o incremento da população e, portanto, da produção de alimentos está levando a um desequilíbrio ambiental, não unicamente a um aumento do efeito estufa, assim como um incremento de microrganismos altamente virulentos e multirresistentes (MARTIN-CLOUAIRE; RELIER, 2009; THANNER; DRISSNER; WALSH, 2016).

2.2. Mastite

A mastite é a inflamação da glândula mamária, sendo a enfermidade mais importante em animais de produção no mundo pela alta prevalência e incidência de casos (FAO, 2014; GUIMARÃES et al., 2017; KLAAS; ZADOKS, 2018). Produz grandes perdas econômicas para a indústria leiteira devido à diminuição na produção e qualidade do leite e aos elevados custos de tratamento e controle (GOMES; HENRIQUES, 2016).

A etiologia da mastite é ampla e complexa e está associada a múltiplos fatores e agentes etiológicos. Estes últimos dividem a mastite em dois grandes grupos: os de origem contagiosa e os de origem ambiental (LAKEW; FAYERA; ALI, 2019).

A mastite de origem contagiosa é transmitida de animal para animal, principalmente durante a ordenha (CHENG; HAN, 2020), sendo a principal fonte de infecção a glândula mamária infectada (GOMES; HENRIQUES, 2016). Os microrganismos que se encontram nesse grupo vivem sobre a pele do úbere e do teto, podendo colonizar e se multiplicar no animal (ACOSTA et al., 2016; CHENG; HAN, 2020). Os principais patógenos envolvidos na mastite contagiosa são: *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium bovis* e *Mycoplasma* spp. (PAL; REGASA; GIZAW, 2020)

A mastite de origem ambiental é aquela onde a principal fonte de infecção é o ambiente e está associada à falta de higiene durante a ordenha (COBIRKA; TANCIN; SLAMA, 2020; GOMES; HENRIQUES, 2016). Os microrganismos deste tipo de mastite comumente não se encontram na pele do úbere e do teto e são considerados patógenos oportunistas, estando presentes no ambiente como água, fezes e urina (KIBEBEW, 2017). Os principais patógenos que causam a mastite ambiental são: *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae* e bactérias da família *Enterobacteriaceae* (ACOSTA et al., 2016; PAL; REGASA; GIZAW, 2020).

A mastite também pode ser classificada de acordo com os sinais clínicos em: mastite clínica e subclínica (MARÉCHAL et al., 2011). A mastite clínica se caracteriza pela presença de sinais da inflamação como rubor, dor no úbere e no teto e aumento no tamanho da glândula, assim como alterações visíveis no leite como a presença de coágulos (COBIRKA; TANCIN; SLAMA, 2020) ou sangue (CONTRERAS; RODRÍGUEZ, 2011; MARÉCHAL et al., 2011).

A mastite subclínica é aquela que determina mudanças na composição do leite sem apresentar anormalidades visíveis e também na glândula mamária (AKTER et al., 2020). Geralmente, a mastite subclínica apresenta maior prevalência e duração que a mastite clínica, devido ao fato de não manifestar sinais visíveis, sendo mais difícil de detectar. Este tipo de infecção serve como reservatório de patógenos que podem ser transmitidos para outros animais (ABEGEWI et al., 2022; COBIRKA; TANCIN; SLAMA, 2020; ZERYEHUN; AYA; BAYECHA, 2013).

O tratamento da mastite é realizado principalmente mediante o uso de antibióticos, e se necessário, utilizam-se os anti-inflamatórios não esteroides (AINES) (COBIRKA; TANCIN; SLAMA, 2020), sendo a infecção mais onerosa na produção pecuária no mundo (PAL, 2018a). O Conselho Nacional da Mastite (NMC, National Mastite Council) elaborou um guia para o controle da mastite nos animais de produção com medidas que consistem em cinco pontos: 1) identificar e tratar casos clínicos; 2) desinfecção do teto pós-ordenha; 3) terapia de vaca seca; 4) eliminar animais que apresentam a infecção de forma crônica e 5) manutenção regular dos equipamentos de ordenha (RUEGG, 2017).

2.3. Família *Enterobacteriaceae*

As bactérias da família *Enterobacteriaceae* são bastonetes Gram negativos, podendo medir entre 0,3 - 1,0µm de largura e 0,6 - 6,0µm de comprimento, sendo um grupo heterogêneo onde são encontrados 43 gêneros e 263 espécies e subespécies de bactérias, sendo o *habitat* natural, o trato intestinal de humanos e animais (MCVEY; KENNEDY; CHENGAPPA, 2016). Os gêneros que formam parte da família *Enterobacteriaceae* não podem ser identificados por meio da morfologia microscópica, no entanto, apresentam algumas características similares, pois todas são anaeróbias facultativas, fermentam glicose, catalase positivas, oxidase negativas, reduzem nitrato a nitrito, não formam esporos, não são álcool-ácido resistentes e a maioria cresce em temperatura de 22 a 35°C (LEVINSON, 2016; MCVEY; KENNEDY; CHENGAPPA, 2016; RIEDEL et al., 2022).

Para a diferenciação dos gêneros da família *Enterobacteriaceae* são utilizadas provas bioquímicas para determinar diferenças metabólicas como a fermentação de lactose, a resistência aos sais biliares, assim como também meios de cultivo seletivos e diferenciais que ajudam a identificação por meio das características das colônias em cada meio (KONEMAN et al., 2018).

Os principais gêneros representantes desta família são: *Escherichia* spp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Serratia* spp., *Proteus* spp., *Providencia* spp., *Morganella* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp. Os membros da família *Enterobacteriaceae* apesar de formar parte da microbiota são considerados patógenos oportunistas, principalmente em indivíduos imunossuprimidos, podendo produzir infecções intestinais ou extraintestinais (sistema urinário e respiratório) em animais e humanos. No entanto, outros gêneros como *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. são considerados patogênicos para os humanos (MCVEY; KENNEDY; CHENGAPPA, 2016; RIEDEL et al., 2022).

Nos últimos anos, as bactérias da família *Enterobacteriaceae* foram identificadas como agentes causadoras da mastite clínica e subclínica em vacas e cabras em países como Colômbia (BONILLA; MURILLO; ALMANZA, 2018), Nigéria (DANMALLAM; PIMENOV, 2019), Índia (BISHT et al., 2020), Camarões (ABEGEWI et al., 2022), Romênia (PASCU et al., 2022) e Egito (EL-MOHANDES et al., 2022). Relatos do envolvimento de bactérias ocasionando mastite em bovinos e caprinos desta família no Brasil nos últimos anos estão na tabela 1.

Tabela 1. Representantes de bactérias da família *Enterobacteriaceae* isoladas de casos de mastite bovina e caprina no Brasil no período de 2010 a 2022

Autor	Espécie	Estado/Região	Espécie de Enterobactérias	Frequência
Peixoto et al. (2010)	Caprina	Pernambuco Bahia	Bactérias da família <i>Enterobacteriaceae</i>	3,9%
			<i>Proteus mirabilis</i>	45,3%
Santiago et al. (2015)	Bovina	Rio de Janeiro	<i>E. coli</i>	40,5%
			<i>Citrobacter freundii</i>	4,8%
			<i>Serratia marcescens</i>	4,8%
			<i>Serratia rubidae</i>	2,4%
			<i>Enterobacter aerogenes</i>	2,4%
Cortinhas et al. (2016)	Bovina	São Paulo, Minas Gerais, Paraná	<i>E. coli</i>	4,2%
			<i>Klebsiella spp.</i>	4,5%
Martins et al. (2017)	Bovina	São Paulo	<i>Citrobacter sp.</i>	0,45%
			<i>E. coli</i>	74%
			<i>Enterobacter cloacae</i>	4,2%
			<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6,4%
			<i>Klebsiella oxytoca</i>	6,4%
Rodrigues et al. (2017)	Bovina	Piauí	<i>Enterobacter asburiae</i>	2,1%
			<i>Serratia marcescens</i>	4,2%
			<i>Citrobacter freundii</i>	2,1%
			<i>E. coli</i>	46,2%
Tomazi et al. (2018)	Bovina	São Paulo e Minas Gerais	<i>E. coli</i>	46,2%

			<i>Klebsiella</i> spp.	1,4%
			<i>Citrobacter</i> spp.	10,5%
			<i>Enterobacter</i> spp.	5,7%
Braga et al. (2018)	Bovina	São Paulo	<i>Enterobacter</i> <i>cloacae</i>	
			<i>E. coli</i>	6,9%
Lima et al. (2018)	Caprina	Minas Gerais	<i>Klebsiella</i> spp.	2,1%
			<i>Klebsiella oxytoca</i>	0,5%
			<i>Enterobacter</i> <i>aerogenes</i>	2,1%
Machado et al. (2018)	Caprina	São Paulo	<i>E. coli</i>	1,4%
			<i>E. coli</i>	1,38%
Aragão et al. (2021)	Caprina	Pernambuco	<i>Enterobacter</i> <i>cloacae</i>	0,92 %
			<i>E. coli</i>	18%
Clock et al. (2021)	Bovina	Paraná		
De oliveira et al. (2022)	Bovina	Piauí	<i>E. coli</i>	6,9%
Lopes et al. (2022)	Bovina	Rio Grande do Sul	<i>Klebsiella</i> spp.	3,9%
			<i>Serratia</i> sp.	2,0%

2.4. Gênero *Staphylococcus*

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são cocos Gram positivos, anaeróbios facultativos, medem aproximadamente 0,5 - 1,5µm de diâmetro imóveis, não apresentam flagelos, não formam esporos, são catalase positivos; na microscopia podem ser observados distribuídos em grupos, podendo formar aglomerados irregulares ou similares a cachos de uva (KONEMAN et al., 2018; MCVEY; KENNEDY; CHENGAPPA, 2016). *Staphylococcus* spp. podem crescer em temperaturas que variam entre 7°C a 48°C e pH de 4 a 10 (MONTANARI et al., 2015); têm características

de halotolerância, sendo capazes de crescer em concentrações de 10-15% de NaCl (CHOI et al., 2014).

O gênero *Staphylococcus* se encontra dentro da família *Staphylococcaceae*, ordem Bacillales e Filo Firmicutes (KONEMAN et al., 2018), onde são identificadas 45 espécies e 24 subespécies do gênero, os quais se encontram classificados por características fenotípicas e genotípicas, sendo a mais utilizada a capacidade de produzir a enzima coagulase; classificam-se em dois grupos: *Staphylococcus* coagulase positivos e *Staphylococcus* coagulase negativos (MCVEY; KENNEDY; CHENGAPPA, 2016; SAVINI, 2018).

Os estafilococos são considerados patógenos oportunistas ou microrganismos comensais da mucosa e pele de humanos e animais (FOSTER, 2009), porém, *Staphylococcus* coagulase positivo como *Staphylococcus aureus*, apesar de serem encontrados em ambientes externos e nas narinas em 20 - 40% dos humanos, estes são considerados patógenos universais (KONEMAN et al., 2018). *Staphylococcus* coagulase negativos são tipicamente encontrados como parte da microbiota da pele, e considerados os maiores patógenos nosocomiais e oportunistas, estando associados às infecções da pele e tecidos moles (BECKER; HEILMANN; PETERS, 2014), podendo apresentar sintomatologia similar à encontrada nas infecções por *Staphylococcus* coagulase positivo (NATSI; COHEN, 2018).

A mastite bovina e caprina apresenta como um dos principais agentes etiológicos, as espécies do gênero *Staphylococcus* (AKTER et al., 2020; BONILLA; MURILLO; ALMANZA, 2018; PAL, 2018b). Apesar de contar com planos de controle, ainda é um problema na produção em vários países como Peru (BONILLA; MURILLO; ALMANZA, 2018), Nigéria (DANMALLAM; PIMENOV, 2019), Bangladesh (AKTER et al., 2020), Argélia (TAMENDJARI et al., 2021), Paquistão (JAVED et al., 2022). No Brasil foram realizados vários estudos epidemiológicos relacionados aos *Staphylococcus* spp. como agentes causadores de mastite (Tabela 2).

Tabela 2. Bactérias do gênero *Staphylococcus* como agentes causais de mastite bovina e caprina no Brasil no período de 2012 a 2022.

Autor	Espécie	Estado/Região	Espécie de <i>Staphylococcus</i>	% de isolamento
França et al. (2012)	Caprina	Pernambuco	<i>S. epidermidis</i>	17,6%
		Bahia	<i>S. intermedius</i>	16,6%

			<i>S. hyicus</i>	16,6%
			<i>S. aureus</i>	16,2%
			<i>S. caprae</i>	11%
			<i>S. gallinarum</i>	2,3%
			<i>S. simulans</i>	1,4%
			<i>S. saprophyticus</i>	0,5%
			CNS	17,6%
Silveira-Filho et al. (2014)	Bovina	Pernambuco	<i>Staphylococcus aureus</i>	87 isolados de leite
			<i>Staphylococcus</i> spp.	10,77%
Ferreira et al. (2014)	Caprina	Paraíba	<i>Staphylococcus aureus</i>	2,72%
Santiago et al. (2015)	Bovina	Rio Grande do Sul	<i>Staphylococcus</i> spp.	88,2%
			<i>Staphylococcus aureus</i>	57,8%
Da Costa Krewer et al. (2015)	Bovina	Bahía Pernambuco	CPS	28%
			CNS	14,2%
Cortinhas et al. (2016)	Bovina	São Paulo, Minas Gerais, Paraná	<i>Staphylococcus aureus</i>	7,6%
			<i>S. aureus</i>	45,3%
			CNS	54,7%
		Paraná	<i>S. chromogenes</i>	14,9%
		São Paulo	<i>S. epidermidis</i>	14,4%
Mello et al. (2016)	Bovina	Santa Catarina	<i>S. saprophyticus</i>	9,4%
		Rio Grande do Sul	<i>S. warneri</i>	3,3%
			<i>S. simulans</i>	3,3%
			<i>S. haemolyticus</i>	3,3%
			<i>S. hyicus</i>	2,8%

			<i>S. hominis</i>	2,2%
			<i>S. xylosus</i>	1,1%
Haubert et al. (2017)	Bovina	Rio Grande do Sul	<i>Staphylococcus aureus</i>	100%
			<i>Staphylococcus</i> spp.	3,6%
Martins et al. (2017)	Bovina	São Paulo	<i>Staphylococcus aureus</i>	0,3%
Costa et al. (2018)	Bovina	Maranhão	<i>Staphylococcus aureus</i>	43,18%
Tomazi et al. (2018)	Bovina	São Paulo e Minas Gerais	<i>Staphylococcus aureus</i>	9,6%
Braga et al. (2018)	Bovina	São Paulo	<i>Staphylococcus</i> spp.	
Gonçalves et al. (2018)	Bovina	São Paulo	<i>Staphylococcus aureus</i>	5,3%
			<i>Staphylococcus</i> spp.	25%
Lima et al. (2018)	Caprina	Minas Gerais	<i>Staphylococcus aureus</i>	60%,
			<i>Staphylococcus</i> spp.	70%
Machado et al. (2018)	Caprina	São Paulo	<i>Staphylococcus aureus</i>	13,5%
Silva et al. (2020)	Bovina	Pernambuco	<i>Staphylococcus aureus</i>	6,25%
Aragão et al. (2021)	Caprina	Pernambuco	<i>Staphylococcus</i> spp.	83,29%
Clock et al. (2021)	Bovina	Paraná	<i>Staphylococcus aureus</i>	18%
Lopes et al. (2022)	Bovina	Rio Grande do Sul	<i>Staphylococcus</i> spp.	85,4%
LIMA et al., (2022)	Bovina	Paraíba	<i>Staphylococcus</i> spp.	26,36%

oCPS: Outros *Staphylococcus* coagulase positivo; CNS: *Staphylococcus* coagulase negativos.

2.5. Resistência bacteriana aos antimicrobianos

A descoberta da penicilina, no início dos anos 40, levou a uma diminuição da mortalidade por infecções bacterianas, porém, em meados da mesma década, com o incremento no seu uso, observou-se um incremento na resistência de bactérias do gênero *Staphylococcus*, nas quais foi identificada a produção de enzimas denominadas como penicilinases que são enzimas similares às beta-lactamases anteriormente descobertas em cepas de *Escherichia coli* (MARANAN et al., 1997). A maioria das cepas de *Staphylococcus aureus* é resistente à penicilina e somente 5 - 10% são sensíveis, e, situações similares são observadas para outros tipos de antibióticos para uma ampla diversidade de gêneros bacterianos (ALÓS, 2015).

As bactérias possuem a capacidade de se adaptar rapidamente às diferentes condições ambientais, o que tem permitido sua sobrevivência em concentrações bacteriostáticas e/ou bactericidas dos antibióticos (CUNHA, 1998). Essa capacidade de adaptação ocasionou o incremento alarmante de cepas multirresistentes no mundo, que não teve um aumento unicamente em bactérias patogênicas, mas também um incremento na microbiota intestinal dos humanos e animais por enterobactérias produtoras de BLEE que podem alcançar níveis pandêmicos (WOERTHER et al., 2013).

A resistência aos antibióticos pode ser definida como a falta de eficácia dos antimicrobianos contra as bactérias, gerada não simplesmente pelo seu uso indiscriminado, mas também devido aos mecanismos naturais de resistência aos antibióticos que as bactérias possuem devido a sua evolução (ALÓS, 2015).

Existem dois tipos de resistência aos antibióticos: resistência adquirida e resistência intrínseca (TOMPSON et al., 2021). A resistência adquirida é aquela que se desenvolve quando uma nova característica é expressa principalmente devido às mudanças genéticas produzidas pela exposição aos antibióticos (CULYBA; MO; KOHLI, 2015). As bactérias podem adquirir esse tipo de resistência por meio de mutações ou de transferência horizontal de genes como transposons, integrons, plasmídeos ou bacteriófagos (RAGHUNATH, 2008). A resistência intrínseca refere-se a uma característica generalizada que não muda independentemente da pressão seletiva do antibiótico; é mediada por cromossomos e está associada com características anatômicas e fisiológicas da bactéria, isto é, que as bactérias são

naturalmente resistentes às diferentes classes de antibióticos (COX; WRIGHT, 2013; CULYBA; MO; KOHLI, 2015; FAO et al., 2016).

A resistência aos antibióticos é uma característica importante para a sobrevivência da bactéria, no entanto, não é um fator de virulência propriamente dito, porém os fatores de virulência e a resistência aos antibióticos compartilham características básicas, apesar de ter uma origem e tempo evolutivo diferente como: a) a capacidade de adaptação para a sobrevivência da bactéria; b) os genes codificadores têm sido transferidos por meio de fragmentos de DNA (elementos genéticos móveis); c) a resistência aos antibióticos está relacionada com a presença de infecção, que a sua vez está em relação com fatores de virulência que permitem o desenvolvimento da mesma; d) similares mecanismos envolvidos como as bombas de efluxo e alterações de membrana (BECEIRO; TOMÁS; BOU, 2013; MARTÍNEZ; BAQUERO, 2002).

2.6. Mecanismos de resistência aos antimicrobianos

As bactérias apresentam vários mecanismos de resistência aos antibióticos (Figura 1), dentre os quais os quatro principais são (LEVINSON, 2016):

1. Inativação do fármaco: as bactérias têm a capacidade de sintetizar enzimas que podem degradar (Beta-lactamases) ou modificar o fármaco (cloranfenicol acetil transferases), destruindo sua ação bactericida/bacteriostática (PETERSON; KAUR, 2018).
2. Modificação do alvo do fármaco nas bactérias: alterações na molécula alvo ocorrem como resultado de mutação espontânea que reduzem ou bloqueiam completamente o antibiótico; exemplos desse mecanismo são a metilação do rRNA 23S ou 16S rRNA, alterações nos precursores de peptidoglicanos ou síntese de alvos alternativos de baixa afinidade (PBPs) (MCDERMOTT; WALKER; WHITE, 2003; PETERSON; KAUR, 2018).
3. Bomba de efluxo e/ou alterações na permeabilidade da membrana: as bombas de efluxo ocorrem por meio de uma grande família de proteínas que ejetam os antibióticos do interior da célula (WRIGHT, 2010). As alterações na

permeabilidade da membrana é o resultado de mutações nos genes codificadores das porinas e/ou mudanças na expressão fenotípica das mesmas que podem limitar o transporte do fármaco até o sítio alvo dentro da bactéria (MCDERMOTT; WALKER; WHITE, 2003).

4. Desvio do alvo (bypass): o desvio do alvo envolve a geração de alvos ou subunidades adicionais de baixa afinidade para o antibiótico (WRIGHT, 2010).

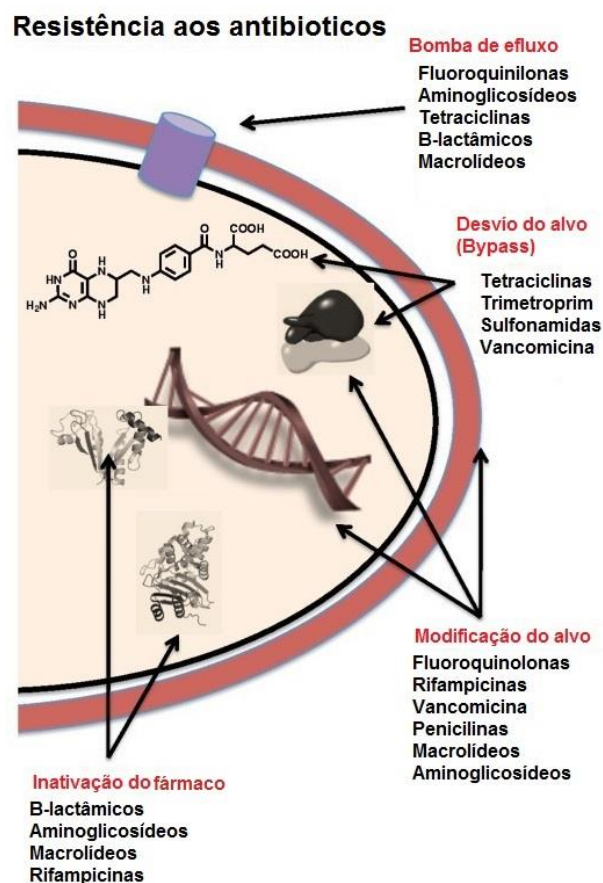


Figura 1 Representação esquemática de diferentes mecanismos de resistência a antibióticos em bactérias, adaptado de Wright (2010).

2.7. β -lactamases

Os antibióticos β -lactâmicos por definição apresentam um núcleo β -lactâmico em sua estrutura molecular, inibem a síntese da parede celular bacteriana pela união com as proteínas de ligação à penicilina, assim como também interferem com a atividade do ácido murâmico na reticulação (transpeptidação) do peptidoglicano da

parede celular bacteriana, produzindo a morte da bactéria por pressão osmótica intracelular (AARTS, 2011; RIEDEL et al., 2022). Os β -lactâmicos estão divididos em vários grupos: cefalosporinas de primeira, segunda, terceira e quarta geração, carbapenema e monobactâmicos (LEVINSON, 2016).

As β -lactamases são enzimas capazes de hidrolisar o enlace amino do anel beta-lactâmico de modo que o antibiótico não consegue se unir às proteínas de ligação à penicilina e, portanto, a síntese da parede celular não é interrompida (POOLE, 2004). As β -lactamases foram identificadas em ampla variedade de gêneros de bactérias Gram negativos e Gram positivos, sendo que algumas são mediadas por elementos genéticos móveis (plasmídeos, transposones), facilitando a transferência de material genético entre microrganismos, como é no caso das penicilinases em *Staphylococcus* spp. e as β -lactamases de tipo AmpC em bacilos Gram negativos, ou por cromossomos como ocorre no caso da maioria das bactérias Gram negativos (RIEDEL et al., 2022; WILKE; LOVERING; STRYNADKA, 2005).

A classificação das β -lactamases foi realizada com base em duas características: 1) características bioquímicas e funcionais, a classificação mais utilizada; 2) características moleculares. Dentro da classificação por características bioquímicas e funcionais as β -lactamases são divididas em 4 classes (KONG; SCHNEPER; MATHEE, 2010):

- Classe A: encontram-se as β -lactamases mediadas por plasmídeos ou transposons, como as penicilinases, e as produzidas pelas bactérias Gram negativos como a *blaSHV* e a *blaTEM*.
- Classe B: podem ser encontradas as metalo- β -lactamases, que inativam o imipenem e meropenem.
- Classe C: dentro dessa classe estão as cefalosporinases, como são as β -lactamases de tipo *ampC*.
- Classe D: os representantes dessa classe são as oxilinases, com capacidade de inativar a oxacilina e meticilina.

2.8. β -lactamases de espectro estendido (BLEE)

As β -lactamases de espectro estendido (BLEE) são enzimas mediadas por plasmídeos, geralmente produzidas por bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, capazes de inativar as cefalosporinas de primeira, segunda e terceira geração e monobactâmicos (azetreonam). As BLEE são inativadas por inibidores das β -lactamases como ácido clavulânico e sulbactam (CHAUDHARY; AGGARWAL, 2004; GESER; STEPHAN; HÄCHLER, 2012).

As BLEE's são derivadas das famílias de β -lactamases tipo TEM (temoniera) e SHV (variável sulfidril) que são encontradas comumente em *E. coli*, *Klebsiella* spp. e *Proteus mirabilis*, porém, existem outras BLEE's que diferem filogeneticamente de TEM e SHV como CTX-M (pela preferência de hidrolisar a cefotaxima), que foi descoberta em espécies de *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia* spp. e *Enterobacter* spp. (CANTÓN; GONZÁLEZ-ALBA; GALÁN, 2012).

As bactérias da família *Enterobacteriaceae* produtoras de BLEE são consideradas a maior ameaça em relação à resistência a antimicrobianos pelo seu incremento significativamente rápido (AARTS, 2011). A Organização Mundial da Saúde (OMS) colocou a família *Enterobacteriaceae* produtora de BLEE no grupo crítico para o desenvolvimento e pesquisa de antibióticos (WHO, 2017). A presença de bactérias produtoras de BLEE como colonizadoras da microbiota em animais produtores de alimentos vem se tornando um problema para a saúde pública pelo fato da rápida transferência de genes de resistência entre cepas bacterianas distintas por meio de plasmídeos, assim como, pela capacidade de coexistir com outro tipo de determinantes de resistência, o que vai incrementar a frequência da multirresistência (DAHMS et al., 2015; LI et al., 2007).

Na análise sistemática, Murray et al. (2022) identificaram que *E. coli* é o primeiro microrganismo associado com a maior número de mortes por resistência aos antimicrobianos no mundo. Diversos estudos foram realizados com isolamento de bactérias da família *Enterobacteriaceae* de leite no mundo, Turquia (TEKINER; ÖZPINAR, 2016), Líbano (DIAB et al., 2017), Egito (EL-MOHANDES et al., 2022), Iraque (AHMED, 2021). Os estudos relacionados com isolados de bactérias produtoras de BLEE isoladas de leite em bovinos e caprinos realizados no Brasil estão descritos na tabela 3.

Tabela 3. Estudos relacionados com a identificação de bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae* produtoras de BLEE no Brasil no período 2012 – 2022.

Autor/Ano	Espécie	Estado	<i>Enterobacteriaceae</i>	BLEE	% de isolamento
Nobrega et al. (2013)	Bovina	Goiás	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		5 isolados BLEE positivos com teste fenotípico
Stella et al. (2017)	Bovina	Goiás	<i>Escherichia coli</i> 23,9% (40/167)		Fenotípico 7,5% (3/40)
Parussolo et al. (2019)	Bovina	Santa Catarina	<i>Escherichia coli</i> 6,9% (8/117)	<i>blaTEM</i>	12,5% (1/8)
Nobrega et al. (2021)	Bovina	São Paulo Bahia Minas Gerais Goiás	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 1,8% (28/1547)	<i>blaCTX-M8</i> <i>blaSHV-108</i>	3 isolados positivos para os dois genes

2.9. *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina (MRS)

A meticilina é um antibiótico β -lactâmico semissintético elaborado para o tratamento de infecções estafilocócicas que apresentaram resistência à penicilina associada à aquisição do gene *blaZ*, e que foi observada em cepas de *Staphylococcus* spp., apenas um ano após a introdução da meticilina na clínica médica (HARKINS et al., 2017).

As bactérias do gênero *Staphylococcus* (*Staphylococcus* coagulase positivos e negativos) são frequentemente associadas à resistência a vários tipos de antimicrobianos, sendo denominados *Staphylococcus* multirresistentes (JANGRA; KHANDAIT, 2021). *Staphylococcus aureus* é a espécie mais proeminente do gênero *Staphylococcus*, sendo capaz de produzir desde infecções na pele até endocardite e sepsis, cujo o impacto incrementou com a origem de cepas resistentes à meticilina (MRSA), devido ao fato de a meticilina ser o antibiótico de opção para infecções por *S. aureus* (PATERSON; HARRISON; HOLMES, 2014; PRENAFETA et al., 2014).

A resistência à meticilina é mediada pelos genes *mecA* e *mecC* que são transferidos de maneira horizontal no cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC [staphylococcal cassette chromosome]). Os genes *mecA*, *mecC* e, recentemente

identificado em cepas de estafilococcus, *mecB* codificam as enzimas ligadas às penicilinas 2a de baixa afinidade (PBP2a) e PBP2c, respectivamente, que conferem resistência a todos os antibióticos β-lactâmicos, incluindo a penicilina G, meticilina e cefalosporinas como a cefotaxima (BECKER et al., 2018; HARKINS et al., 2017; LARSEN et al., 2022; TURNER et al., 2019). No mundo foram identificadas cepas de *Staphylococcus* resistentes à meticilina circulando no sistema agropecuário, de países como os Estados Unidos (HARAN et al., 2012), Grã Bretanha (PATERSON et al., 2014), Colômbia (HERRERA; SANTOS, 2016), Itália (BASANISI et al., 2017) e Alemanha (KADLEC et al., 2019). As pesquisas no Brasil estão destacadas na tabela 4.

Tabela 4. *Staphylococcus* resistentes à meticilina isolados de leite no Brasil no período 2012 – 2022.

Autor/Ano	Espécie	Estado	<i>Staphylococcus</i> spp.	Gene	% de identificação
Santos et al. (2016)	Bovina	Minas Gerais	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>mecA</i>	5,88%
		Pernambuco			
		Paraná	CNS	<i>blaZ</i>	48%
		Rio grande do Sul			
		Santa Catarina			
São Paulo					
Ribeiro et al. (2020)	Bovina	São Paulo	<i>S. haemolyticus</i> <i>S. hominis</i> <i>S. epidermidis</i>	<i>mecA</i>	4,1%
Alves et al. (2020)	Bovina	Minas Gerais Rio de Janeiro São Paulo	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>mecC</i>	25,7%
Aragão et al. (2021)	Caprina	Pernambuco	<i>Staphylococcus</i> spp. <i>Staphylococcus</i>	<i>mecA</i>	2.25 %
Da Silva et al. (2022)	Bovina	Pernambuco	<i>aureus</i> <i>Staphylococcus</i> spp.	<i>mecA</i>	1,78%

CNS: *Staphylococcus* coagulase negativa.

2.10. Resistência aos macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas

(MLS)

Os antibióticos MLS são antibióticos quimicamente diferentes, mas que apresentam uma ação similar, porém não idêntica; os macrolídeos evitam a translocação da cadeia de peptídeos que está se formando no ribossomo; as lincosamidas inibem a reação da peptidil transferase a qual catalisa a formação da ligação peptídica; e a estreptogramina B que bloqueia o túnel de saída através do qual as cadeias peptídicas saem do ribossomo, resultando na liberação de peptídeos incompletos (CATTOIR; LECLERCQ, 2017).

Os macrolídeos são utilizados principalmente para o tratamento de infecções do trato respiratório, pele e tecidos moles, principalmente em indivíduos que apresentam alergia às penicilinas, e também nas formas atípicas de infecções por *Mycobacterium* spp. em humanos (STEWART et al., 2005). Na Medicina Veterinária são utilizados no tratamento de infecções respiratórias em bovinos, suínos e aves; as lincosamidas em conjunto com macrolídeos são usadas no tratamento de infecções estreptocócicas do grupo B em medicina humana (MAROSEVIC; KAEVSKA; JAGLIC, 2017).

A resistência aos MLS é mediada por três mecanismos principais: modificação do alvo (metilação do RNAr) codificados pelos genes *erm* (*ermA*, *ermB*, *ermC* e *ermF*), bombas de efluxo associada aos genes *msr* (macrolídeos - estreptograminas) e inativação do antibiótico através de enzimas inativadoras como a fosforilase codificada pelos genes *mph* (FESSLER et al., 2018), sendo importante ressaltar que os genes principais que conferem resistência aos MLS são *ermA* e *ermC* (KHODABANDEH et al., 2019).

A metilação do RNAr é o mecanismo principal pelo qual os MLS interagem, sendo a bactéria capaz de adicionar metilases às ligações específicas do RNAr, levando a danos no sítio de união no ribossomo bacteriano, o que produz uma superposição desses sítios e o que possibilita uma resistência cruzada entre os macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas (CATTOIR; LECLERCQ, 2017; MAROSEVIC; KAEVSKA; JAGLIC, 2017). A identificação desse tipo de resistência tem incrementado em importância, devido à falha no tratamento de infecções estafilocócicas em humanos (STEWART et al., 2005), sendo necessário realizar o teste fenotípico denominado D-teste. Este teste é realizado pela técnica de disco

difusão, utilizando um disco de eritromicina (15µg) e um de clindamicina (2µg) e colocados no ágar Muller Hinton a uma distância de 20mm entre os centros de cada um deles. Após o período de incubação, se for observada resistência no disco de eritromicina (sensibilidade à clindamicina) com achatamento na zona de inibição da clindamicina, a cepa é classificada como resistência induzida à clindamicina (CLSI, 2020).

A resistência aos MLS tem sido estudada em *Staphylococcus* spp. isolados de leite bovino e caprino no Brasil (tabela 5), porém, a maioria dos estudos não realizaram o teste para identificação da resistência induzida às lincosamidas (D-teste). Em estudo realizado em propriedades leiteiras de Piauí por Pereira et al. (2018) avaliaram a capacidade dos isolados de *S. aureus* de induzir resistência às lincosamidas utilizando o D-teste, obtendo como resultados 3,8% (3/104) de cepas iMLS e 15,4% (17/104) de cMLS.

Tabela 5. Apresentação de estudos identificando isolados de *Staphylococcus* spp. resistentes aos MLS de leite no Brasil no período 2012 – 2022.

Autor/Ano	Espécie	Estado	<i>Staphylococcus</i> spp.	Resistencia antimicrobiana	% de identificação
França et al. (2012)	Caprina	Pernambuco	<i>Staphylococcus</i> spp.	Eritromicina	33,8%
		Bahia		Lincomicina (lincosamida)	39%
Oliveira et al. (2016)	Bovina	Paraíba	<i>Staphylococcus</i> spp.	Eritromicina	11%
		Minas Gerais		Pirlimicina (lincosamida)	1%
Santos et al. (2016)	Bovina	Pernambuco	<i>Staphylococcus aureus</i>	Eritromicina	1,3%
		Paraná			
		Rio grande do Sul			
		Santa Catarina			
Pereira et al. (2018)	Bovina	São Paulo	<i>Staphylococcus aureus</i>	Eritromicina	65,4%
		Piauí		Clindamicina	19,2%

Dorneles et al. (2019)	Bovina	Minas Gerais	<i>Staphylococcus aureus</i> CNS	Eritromicina	14,1%
				Clindamicina	14,1%
				Eritromicina	37,5%
				Clindamicina	37,5%
Alves et al. (2020)	Bovina	Minas Gerais	<i>Staphylococcus aureus</i>	Eritromicina	14,3%
		Rio de Janeiro		Clindamicina	14,3%
		São Paulo			
Aragão et al. (2021)	Caprino	Pernambuco	<i>Staphylococcus</i> spp.	Eritromicina	12.92 %
				Clindamicina	12.35 %

2.11. Resistência às tetraciclinas

As tetraciclinas têm como alvo de ação, os ribossomos bacterianos, podendo exercer efeito sobre um grande número de bactérias Gram-positivos e negativos, aeróbicas e anaeróbicas, micoplasmas, riquetsias e clamídias (MAROSEVIC; KAEVSKA; JAGLIC, 2017). Constituem os principais antibióticos utilizados em Medicina Veterinária no tratamento e controle de doenças infecciosas, e durante um período foi utilizada como aditivo alimentar (DAGHRIR; DROGUI, 2013). No Brasil, existem vários estudos identificando resistência à tetraciclina em *Staphylococcus* spp. isolados de leite bovino e caprino, listados na tabela 6.

A resistência às tetraciclinas é mediada por dois mecanismos: bombas de efluxo codificado pelos genes *tet(K)* ou *tet(L)*; e proteínas de proteção ribossomal, mediada pelos genes *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(S)*, *tet(P)*, *tet(Q)* e *tet(U)* (HRAOUI et al., 2012).

Tabela 6. Estudos prévios identificando frequência da resistência à tetraciclina em isolados de bovinos e caprinos no Brasil no período 2012 – 2022.

Autor/Ano	Espécie	Estado	<i>Staphylococcus</i> spp.	Gene	% de identificação
Silva et al. (2013)	Bovina	São Paulo	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>tetK</i>	3,1%
Oliveira et al. (2016)	Bovina	Paraíba	<i>Staphylococcus</i> spp.	Resistencia fenotípica à tetraciclina	14%
Santos et al. (2016)	Bovina	Minas Gerais	<i>Staphylococcus aureus</i>	Resistencia fenotípica à tetraciclina	30,4% (24/79)
		Pernambuco			
		Paraná			

		Rio grande do Sul			
		Santa Catarina			
		São Paulo			
Martini et al. (2017)	Bovina	Minas Gerais	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>tetK</i>	84%
				<i>tetL</i>	9%
				<i>tetM</i>	2,2%
				<i>teto</i>	1,1%
Haubert et al. (2017)	Bovina	Rio Grande do Sul	<i>Staphylococcus aureus</i>	Resistencia fenotípica à tetraciclina	38,7%
				<i>tetK e tetL</i>	35%
				<i>tetM</i>	35%
				<i>Staphylococcus aureus</i>	16,8%
Lima et al. (2018)	Caprina	Minas Gerais	<i>Staphylococcus spp.</i>	Resistencia fenotípica à tetraciclina	25%
				<i>Staphylococcus caprae</i>	25%
				<i>Staphylococcus legdumensis</i>	100%
				<i>Staphylococcus aureus</i>	71,6%
Dorneles et al. (2019)	Bovina	Minas Gerais	CNS	Resistencia fenotípica à tetraciclina	100%
				<i>tetL</i>	22.47 %
Aragão et al. (2021)	Caprina	Pernambuco	<i>Staphylococcus spp.</i>	<i>tetM</i>	16.85 %
				<i>tet38</i>	6.41 %

CNS: *Staphylococcus* coagulase negativa

2.12. Resistência aos antibióticos na cadeia alimentar

O incremento da necessidade de produzir alimentos de origem animal em grande escala no mundo, principalmente nos países de média e baixa renda, tem levado ao aumento no uso de antimicrobianos na rotina para manter a saúde dos

animais e melhorar a produção de alimentos (FAO et al., 2016). Na atualidade, 73% dos antibióticos comercializados são destinados para a produção animal (VAN BOECKEL et al., 2019). O uso de antimicrobianos em animais para o tratamento de infecções e com fins profiláticos está bem difundido em todo o mundo, apesar de seu uso ter sido proibido como promotores do crescimento, principalmente em países desenvolvidos (ECDC; EFSA; EMA, 2021). Os países desenvolvimento e subdesenvolvidos não apresentam esse tipo de controle e os antibióticos são utilizados em dose subterapêutica o que proporciona rapidamente a origem de cepas resistentes que colonizam os intestinos dos animais, levando à contaminação do solo, água e alimento; estima-se que com o passar dos anos, o uso de antimicrobianos em animais continuará sendo incrementado nessas áreas (FAO et al., 2016; VAN BOECKEL et al., 2015).

A produção animal, principalmente nas criações de suínos, aves e bovinos utilizados para a produção de carne com exploração de tipo intensiva, está caracterizada pela alta densidade de animais onde as cepas resistentes e multirresistentes têm maior possibilidade de transferir genes de resistência e ocasionar a origem de patógenos zoonóticos resistentes aos antimicrobianos devido à pressão seletiva (PRICE et al., 2012; RABELLO et al., 2020).

Ao longo dos últimos anos, a FDA (Food and Drug Administration) apresentou mudanças fundamentais em como os antibióticos importantes para a saúde pública e animal podem ser usados em animais produtores de alimentos (FDA, 2022). Dentro dessas diretrizes podem ser encontradas as seguintes:

1. Tratamento de animais que estão apresentando algum tipo de infecção;
2. Controle de doenças em uma população de animais onde parte do grupo se encontra doente;
3. Prevenção de doenças em animais que estão em alto risco.

Para atender as exigências internacionais de exportação de produtos de origem animal, o Brasil elaborou políticas públicas para o controle do uso de antibióticos com fins de melhorar as áreas zootécnicas da produção pecuária, e com o passar dos anos

foi realizada a proibição de várias classes de antibióticos (lista no Anexo 1) (MAPA, 2018).

O uso de antibióticos em animais, apesar de ser de uso veterinário exclusivo, tem proporcionado o incremento de bactérias resistentes aos antibióticos de uso humano, devido ao fato de que apresentam estruturas químicas similares ou idênticas, podendo levar ao desenvolvimento de uma resistência cruzada (RABELLO et al., 2020). Os animais de produção de alimentos são os principais reservatórios de patógenos zoonóticos, sendo encontradas cepas patogênicas de *Staphylococcus* spp., *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. e *Salmonella* spp. resistentes (SHARMA et al., 2018).

Na cadeia produtiva de alimentos o uso de antibióticos, até de maneira responsável, pode levar à origem de cepas resistentes na microbiota intestinal dos animais (DUPOUY et al., 2021), e os mesmos podem eliminar os microrganismos nas fezes contaminando o ambiente, solo e água (ARGUDÍN et al., 2017), podendo contaminar outros animais, humanos e alimentos de origem animal, continuando com a persistência de cepas resistentes na cadeia produtiva (Figura 2) (SHARMA et al., 2018).

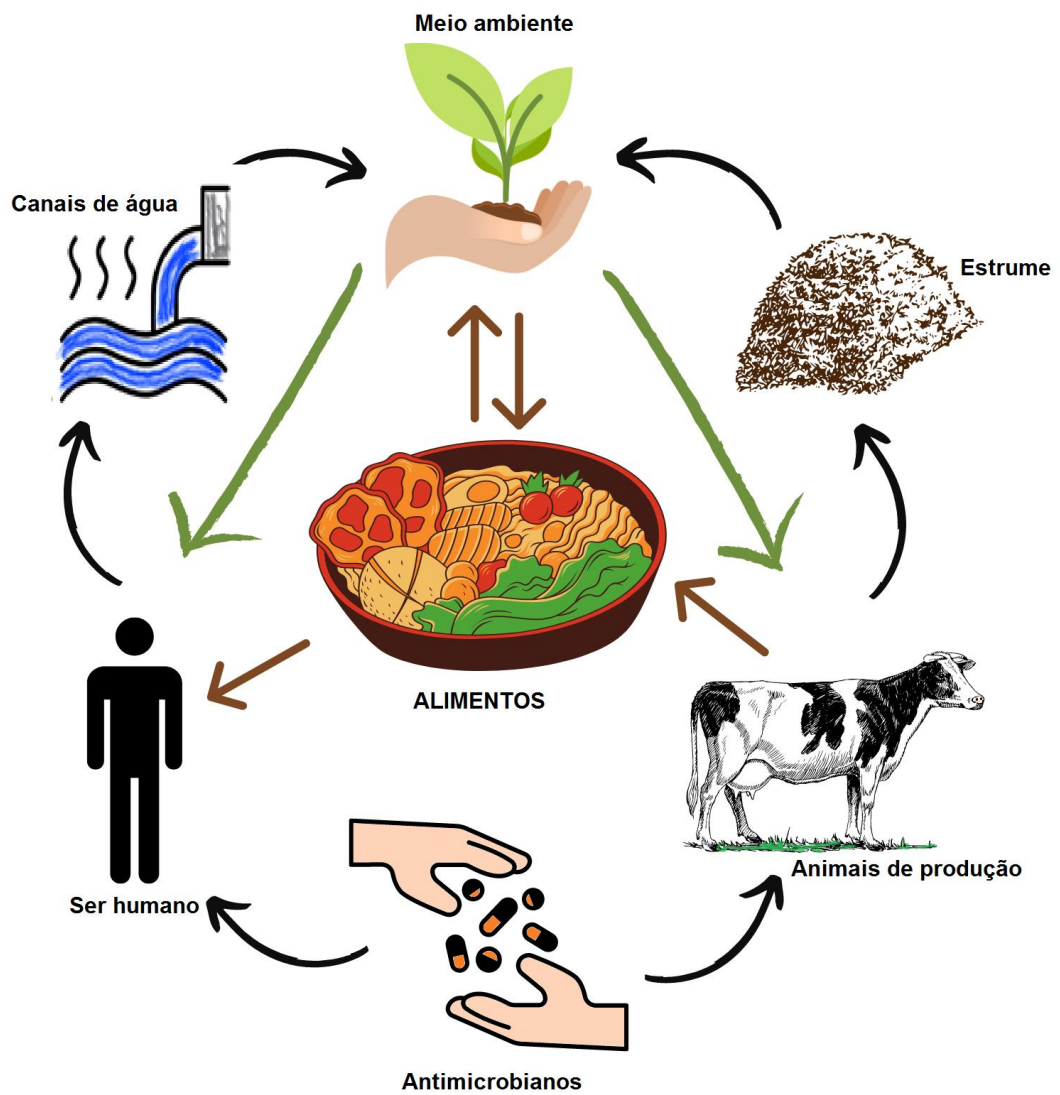


Figura 2 Distribuição de cepas resistente na cadeia produtiva de alimentos. Fonte: o autor.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Determinar o padrão de resistência de *Staphylococcus* spp. e bactérias da família *Enterobacteriaceae* isolados de leite de vacas e cabras com mastite subclínica no estado de Pernambuco.

3.2. Objetivos específicos

- a) Isolar e identificar *Staphylococcus* spp. em amostras de leite caprino e bovino;
- b) Isolar e identificar bactérias da família *Enterobacteriaceae* em amostras de leite caprino e bovino;
- c) Determinar o perfil de resistência fenotípica de isolados de *Staphylococcus* spp. aos β -lactâmicos, tetraciclina e MLS dos isolados bacterianos;
- d) Identificar a frequência de determinantes genéticos de resistência aos β -lactâmicos, tetraciclina e aos MLS em isolados de *Staphylococcus* spp. circulantes no ecossistema agropecuário no estado de Pernambuco;
- e) Estudar geneticamente os isolados de *Staphylococcus* spp. portadores de genes associados à resistência induzida às lincosamidas e estreptograminas;
- f) Identificar fenotipicamente bactérias da família *Enterobacteriaceae* produtoras de β -lactamases de espectro estendido (BLEE);
- g) Identificar a presença de genes codificadores de β -lactamases de espectro estendido (BLEE) em isolados bacterianos da família *Enterobacteriaceae*.

4. Referências

- AARTS, H. J. M. Acquired antibiotic resistance genes : an overview. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, p. 1–27, 2011.
- ABEGEWI, U. et al. Prevalence and risk factors of coliform- associated mastitis and antibiotic resistance of coliforms from lactating dairy cows in. **PloS one**, v. 17, n. 7, p. e026824, 2022.
- ACOSTA, A. et al. Mastites em ruminantes no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 7, p. 565–573, 2016.
- AHMED, I. M. Detection of CTX- M gene in extended spectrum β -lactamases producing Enterobacteriaceae isolated from bovine milk. **Iraqi Journal of Veterinary Sciences**, v. 35, n. 2, p. 397–402, 2021.
- AKTER, S. et al. Prevalence , aetiology and risk factors of subclinical mastitis in goats in. **Small Ruminant Research**, v. 184, n. December 2019, p. 106046, 2020.
- ALÓS, J.-I. Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 33, n. 10, p. 692–699, 2015.
- ALVES, M. DE F. N. F. et al. First report of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harboring mecC gene in milk samples from cows with mastitis in southeastern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 4, p. 2175–2179, 2020.
- ARAGÃO, B. B. et al. Multiresistant zoonotic pathogens isolated from goat milk in Northeastern Brazil. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 79, n. August, 2021.
- ARGUDÍN, M. A. et al. Bacteria from animals as a pool of antimicrobial resistance genes. **Antibiotics**, v. 6, n. 2, p. 1–38, 2017.
- BASANISI, M. G. et al. Genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from milk and dairy products in South Italy. **Food Microbiology**, v. 62, p. 141–146, 2017.
- BDE. **Efetivo dos rebanhos.** Disponível em: <http://www.bde.pe.gov.br/visualizacao/Visualizacao_formato2.aspx?CodInformacao=473&Cod=3>.
- BDE. **Vacas ordenhadas e produção de leite.** Disponível em: <http://www.bde.pe.gov.br/visualizacao/Visualizacao_formato2.aspx?CodInformacao=474&Cod=3>.
- BECEIRO, A.; TOMÁS, M.; BOU, G. Antimicrobial Resistance and Virulence : a Successful or Deleterious Association in the Bacterial World ? **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 2, p. 185–230, 2013.
- BECKER, K.; HEILMANN, C.; PETERS, G. Coagulase-Negative Staphylococci. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 4, p. 870–926, 2014.
- BECKER, K. et al. Plasmid-encoded transferable mecb-mediated methicillin resistance in staphylococcus aureus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 24, n. 2, p. 242–248, 2018.
- BERGŠPICA, I. et al. Extended spectrum β -lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* in pigs and pork meat in the European Union. **Antibiotics**, v. 9, n. 10, p. 1–23,

2020.

BISHT, K. S. et al. Identification and Characterization of *Escherichia coli* Isolates in Bovine Mastitis Milk from Bhubaneswar, Odisha, India. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 9, n. 9, p. 2088–2095, 2020.

BONILLA, M. DEL P. S.; MURILLO, N. P. G.; ALMANZA, I. J. P. Prevalence of bovine mastitis in the anaime canyon, a colombian dairy region, including etiology and antimicrobial resistance. **Revista de Investigaciones Veterinarias del Peru**, v. 29, n. 1, p. 226–239, 2018.

BRAGA, P. A. C. et al. Rapid identification of bovine mastitis pathogens by MALDI-TOF Mass Spectrometry. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 38, n. 4, p. 586–594, 2018.

CANTÓN, R.; GONZÁLEZ-ALBA, J. M.; GALÁN, J. C. CTX-M enzymes : origin and diffusion. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. 110, 2012.

CATTOIR, V.; LECLERCQ, R. Resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins. In: **Antimicrobial Drug Resistance**. [s.l.] Springer, Cham, 2017. p. 269–280.

CHAUDHARY, U.; AGGARWAL, R. Extended spectrum β -lactamases (ESBL) - An emerging threat to clinical therapeutics. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 22, n. 2, p. 75–80, 2004.

CHENG, W. N.; HAN, S. G. Bovine mastitis : risk factors , therapeutic strategies , and alternative treatments — A review. v. 33, n. 11, p. 1699–1713, 2020.

CHOI, S. et al. Comparative genomic and transcriptomic analyses of NaCl-tolerant *Staphylococcus* sp . OJ82 isolated from fermented seafood. **Genomics, Transcriptomics, Proteomics**, v. 98, p. 807–822, 2014.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance Standars for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated from Animals**. 5th. ed. USA: Clinical and laboratory Standars Institute, 2020.

CLOCK, D. C. et al. Diagnosis of clinical and subclinical mastitis in a rural property in Carambeí, State of Paraná. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 3, p. e32310313411, 2021.

COBIRKA, M.; TANCIN, V.; SLAMA, P. Epidemiology and Classification of Mastitis. p. 1–17, 2020.

COELHO, S. M. O. et al. Virulence factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 5, p. 369–374, 2009.

CONTRERAS, G. A.; RODRÍGUEZ, J. M. Mastitis: Comparative etiology and epidemiology. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 16, n. 4, p. 339–356, 2011.

CORTINHAS, C. S. et al. Randomized clinical trial comparing ceftiofur hydrochloride with a positive control protocol for intramammary treatment of nonsevere clinical mastitis in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 7, p. 5619–5628, 2016.

COSTA, F. et al. Frequency of enterotoxins , toxic shock syndrome toxin-1 , and biofilm formation genes in *Staphylococcus aureus* isolates from cows with mastitis in the Northeast of Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 50, p. 1089–1097,

2018.

COX, G.; WRIGHT, G. D. Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms , origins , challenges and solutions. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 303, p. 287–292, 2013.

CULYBA, M. J.; MO, C. Y.; KOHLI, R. M. Targets for Combating the Evolution of Acquired Antibiotic Resistance. **Biochemistry**, v. 54, n. 23, p. 3573–3582, 2015.

CUNHA, B. Antibiotic Resistance: Control Strategies. **Infections in Critical Care II**, v. 14, n. 2, p. 309–327, 1998.

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

DA SILVA, J. G. et al. Meca positive *Staphylococcus* spp. in bovine mastitis, milkers, milking environment, and the circulation of different MRSA clones at dairy cows farms in the northeast region of Brazil. **Ciencia Rural**, v. 52, n. 3, 2022.

DAGHRIR, R.; DROGUI, P. Tetracycline antibiotics in the environment: A review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 11, n. 3, p. 209–227, 2013.

DAHMS, C. et al. Occurrence of ESBL-producing *Escherichia coli* in livestock and farm workers in Mecklenburg-Western Pomerania, Germany. **PLoS ONE**, v. 10, n. 11, p. 1–13, 2015.

DANMALLAM, F. A.; PIMENOV, N. V. Study on prevalence , clinical presentation , and associated bacterial pathogens of goat mastitis in Bauchi , Plateau , and Edo states , Nigeria. **Veterinary World**, v. 12, p. 638–645, 2019.

DE OLIVEIRA, R. P. et al. Bovine mastitis in northeastern Brazil: Occurrence of emergent bacteria and their phenotypic and genotypic profile of antimicrobial resistance. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 85, 2022.

DIAB, M. et al. OXA-48 and CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamases in raw milk in Lebanon : epidemic spread of dominant *Klebsiella pneumoniae* clones. **Journal of Medical Microbiology**, v. 66, p. 1688–1691, 2017.

DORNELES, E. M. S. et al. Genetic diversity and antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase - negative *Staphylococcus* isolates from bovine mastitis in Minas Gerais , Brazil. **MicrobiologyOpen**, v. 8, p. e736, 2019.

DUPOUY, V. et al. Selection of ESBL-producing *Escherichia coli* in the gut of calves experimentally fed with milk containing antibiotic residues. **Veterinary Microbiology**, v. 257, p. 109049, 2021.

ECDC; EFSA; EMA. **Third joint inter-agency report on integrated analysis of consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals in the EU/EEA/EFSA Journal**. [s.l: s.n.].

EL-MOHANDES, S. S. et al. Phenotyping and genotyping studies on extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from mastitic cows on dairy farms in Egypt. **Veterinary World**, v. 15, n. 4, p. 890–897, 2022.

FAO. Impact of Mastitis in Small Scale Dairy Production Systems. **Animal Production and Health Working Paper**, n. 13, 2014.

FAO et al. Drivers. Dynamics and Epidemiology of Antimicrobial Resistance in Animal Production. p. 211–219, 2016.

FDA. **FACT SHEET: Veterinary Feed Directive Final Rule and Next Steps.** Disponível em: <<https://www.fda.gov/animal-veterinary/development-approval-process/fact-sheet-veterinary-feed-directive-final-rule-and-next-steps>>.

FEITOSA, J. F. DE F.; CAMPOS, T. I. L.; LEITE, D. C. CAPRINOCULTURA LEITEIRA NO SEMIÁRIDO: UM ESTUDO ACERCA DO SISTEMA PRODUTIVO EM UMA ASSOCIAÇÃO NO CARIRI PARAIBANO DAIRY. **Revista Agropampa**, v. 1, n. 1, p. 29–49, 2020.

FERREIRA, D. H. et al. Occurrence of enterotoxin-encoding genes in *Staphylococcus aureus* causing mastitis in lactating goats. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 7, p. 633–636, 2014.

FESSLER, A. T. et al. Mobile lincosamide resistance genes in staphylococci. **Plasmid**, v. 99, p. 22–31, 2018.

FOSTER, T. J. Colonization and infection of the human host by staphylococci: adhesion, survival and immune evasion. **Veterinary Dermatology**, v. 20, p. 456–470, 2009.

FRANÇA, C. A. et al. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. from small ruminant mastitis in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 8, p. 747–753, 2012.

GESER, N.; STEPHAN, R.; HÄCHLER, H. Occurrence and characteristics of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) producing Enterobacteriaceae in food producing animals, minced meat and raw milk. **Veterinary Research**, v. 8, n. 21, p. 1–9, 2012.

GOMES, F.; HENRIQUES, M. Control of Bovine Mastitis: Old and Recent Therapeutic Approaches. **Current Microbiology**, v. 72, n. 4, p. 377–382, 2016.

GONÇALVES, J. L. et al. Bovine subclinical mastitis reduces milk yield and economic return. **Livestock Science**, v. 210, n. January, p. 25–32, 2018.

GUIMARÃES, J. L. B. et al. Estimate of the economic impact of mastitis: A case study in a Holstein dairy herd under tropical conditions. v. 142, p. 46–50, 2017.

HARAN, K. P. et al. Prevalence and Characterization of *Staphylococcus aureus*, Including Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, Isolated from Bulk Tank Milk from Minnesota Dairy Farms. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 3, p. 688–695, 2012.

HARKINS, C. P. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* emerged long before the introduction of methicillin into clinical practice. **Genome Biology**, v. 18, n. 130, p. 1–11, 2017.

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

HERRERA, F. C.; SANTOS, J. A. Short communication: Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk fresh cheese in Colombia. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 10, p. 7872–7876, 2016.

HRAOUI, M. et al. Macrolide and tetracycline resistance in clinical strains of

Streptococcus agalactiae isolated in Tunisia. **Journal of Medical Microbiology**, v. 61, n. 8, p. 1109–1113, 2012.

JANGRA, S.; KHANDAIT, M. Clinical Spectrum and Resistance Profile of *Staphylococcus* Infections in a Peri Urban Tertiary Care Hospital. **Journal of Pure Applied Microbiology**, v. 15, n. 4, p. 2163–2169, 2021.

JAVED, S. et al. Epidemiology and molecular characterization of *Staphylococcus aureus* causing bovine mastitis in water buffaloes from the Hazara division of Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan. **PLoS ONE**, v. 17, n. 5 May, p. 1–18, 2022.

KADLEC, K. et al. Occurrence and Characteristics of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Quarter Milk Samples From Dairy Cows in Germany. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1295, 2019.

KHODABANDEH, M. et al. Osong Public Health and Research Perspectives Among *mecA* -Positive *Staphylococcus aureus* Isolates. **Osong public health and research perspectives**, v. 10, n. 1, p. 25–31, 2019.

KIBEBEW, K. Bovine Mastitis : A Review of Causes and Epidemiological Point of View. p. 1–14, 2017.

KLAAS, I. C.; ZADOKS, R. N. An update on environmental mastitis: Challenging perceptions. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 65, n. April 2017, p. 166–185, 2018.

KONEMAN, E. W. et al. **Diagnóstico Microbiológico - Texto e Atlas**. 7ª edição ed. Rio de Janeiro: Grupo GEN, 2018.

KONG, K.; SCHNEPER, L.; MATHEE, K. Beta-lactam antibiotics : from antibiosis to resistance and bacteriology. **APMIS**, v. 118, p. 1–36, 2010.

LAKEW, B. T.; FAYERA, T.; ALI, Y. M. 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 and Production**, v. 51, p. 1507–1513, 2019.

LARSEN, J. et al. Emergence of methicillin resistance predates the clinical use of antibiotics. **Nature**, v. 602, p. 135–141, 2022.

LEVINSON, W. **Microbiologia Médica e Imunologia**. 13th edição ed. New York: AMGH editora Ltda., 2016.

LI, X. et al. β -Lactam resistance and β -lactamases in bacteria of animal origin. **Veterinary microbiology**, v. 121, p. 197–214, 2007.

LIMA, M. C. et al. Mastitis in dairy goats from the state of Minas Gerais, Brazil: profiles of farms, risk factors and characterization of bacteria. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 9, p. 1742–1751, 2018.

LOPES, T. S. et al. Species identification and antimicrobial susceptibility profile of bacteria associated with cow mastitis in southern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 42, 2022.

LUBY, E. et al. Molecular Methods for Assessment of Antibiotic Resistance in Agricultural Ecosystems: Prospects and Challenges. **Journal of environmental Quality**, v. 45, p. 441–453, 2016.

MACHADO, G. P. et al. Detection of *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*

and *Escherichia coli* in Brazilian mastitic milk goats by multiplex-PCR. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 38, n. 7, p. 1358–1364, 2018.

MAPA. **Lista de substâncias proibidas e legislação correspondente**. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/arquivos-de-insumos-pecuarios/Substanciasproibidas20.02.2020.pdf>>.

MAPA. **Programa de Vigilância e Monitoramento da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Agropecuária**. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/resistencia-aos-antimicrobianos/pan-br-agro>>.

MAPA. **Mapa do leite: políticas públicas e privadas para o leite**. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/producao-animal/mapa-do-leite#:~:text=O Brasil é o terceiro,de 4 milhões de pessoas>>. Acesso em: 19 jul. 2022.

MARANAN, M. et al. Antimicrobial Resistance in Staphylococci. **Antimicrobial Resistance**, v. 11, n. 4, p. 813–849, 1997.

MARÉCHAL, C. LE et al. Mastitis impact on technological properties of milk and quality of milk products-A review. **Dairy Science and Technology**, v. 91, n. 3, p. 247–282, 2011.

MAROSEVIC, D.; KAEVSKA, M.; JAGLIC, Z. Resistance to the tetracyclines and macrolide-lincosamide-streptogramin group of antibiotics and its genetic linkage – A review. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 24, n. 2, p. 338–344, 2017.

MARTIN-CLOUAIRE, R.; RELIER, J. P. Modelling and simulating work practices in agriculture. **International Journal of Metadata, Semantics and Ontologies**, v. 4, n. 1–2, p. 42–53, 2009.

MARTINEZ, J. L. et al. A global view of antibiotic resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 33, n. 1, p. 44–65, 2009.

MARTÍNEZ, L.; BAQUERO, F. Interactions among Strategies Associated with Bacterial Infection: Pathogenicity, Epidemicity, and Antibiotic Resistance. **Clinical Microbiology review**, v. 15, n. 4, p. 647–679, 2002.

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

MARTINS, C. M. M. R. et al. Efficacy of a high free iodine barrier teat disinfectant for the prevention of naturally occurring new intramammary infections and clinical mastitis in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 5, p. 3930–3939, 2017.

MCDERMOTT, P. F.; WALKER, R. D.; WHITE, D. G. Antimicrobials: Modes of action and mechanisms of resistance. **International Journal of Toxicology**, v. 22, n. 2, p. 135–143, 2003.

MCVEY, S.; KENNEDY, M.; CHENGAPPA, M. **Microbiologia Veterinária**. 3a Edição ed. Rio de Janeiro: Grupo GEN, 2016.

MELLO, P. L. et al. Detection of enterotoxigenic potential and determination of clonal profile in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci isolated from bovine subclinical mastitis in different Brazilian states. **Toxins**, v. 8, n. 4, p. 1–10, 2016.

MONTANARI, C. et al. New insights in thermal resistance of staphylococcal strains

belonging to the species *Staphylococcus epidermidis* , *Staphylococcus lugdunensis* and *Staphylococcus aureus*. **Food Control**, v. 50, p. 605–612, 2015.

MURRAY, C. et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019 : a systematic analysis. **The Lancet**, v. 399, n. 10325, p. 629–655, 2022.

NATSIS, N. E.; COHEN, P. R. Coagulase-Negative *Staphylococcus* Skin and Soft Tissue Infections. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 19, n. 5, p. 671–677, 2018.

NG, L. K. et al. Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. **Molecular and Cellular Probes**, v. 15, n. 4, p. 209–215, 2001.

NOBREGA, D. B. et al. Molecular characterization of antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolated from Brazilian dairy herds. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 6, p. 7210–7224, 2021.

NÓBREGA, D. B. et al. Molecular epidemiology and extended-spectrum β -lactamases production of *Klebsiella pneumoniae* isolated from three dairy herds. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 33, n. 7, p. 855–859, 2013.

OLIVEIRA, C. J. B. et al. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from Brazilian Dairy Farms and Identification of Novel Sequence Types. **Zoonoses and Public Health**, v. 63, p. 97–105, 2016.

OWINO, V. et al. The impact of climate change on food systems, diet quality, nutrition, and health outcomes: A narrative review. **Frontiers in Climate**, v. 4, 2022.

PAL, M. Mastitis. **Agriculture world**, v. 4, p. 46–51, 2018a.

PAL, M. Mastitis. **Agriculture world**, p. 47–51, 2018b.

PAL, M.; REGASA, A.; GIZAW, F. Etiology , Pathogenesis , Risk Factors , Diagnosis and Management of Bovine Mastitis : A Comprehensive Review Etiology , Pathogenesis , Risk Factors , Diagnosis and Management of Bovine Mastitis : A Comprehensive Review. **International Journal of Animal and Veterinary Sciences**, v. 60, p. 40–55, 2020.

PALMEIRA, J. D. et al. Epidemic spread of Inc11/pST113 plasmid carrying the Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) blaCTX-M-8 gene in *Escherichia coli* of Brazilian cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 243, p. 1–5, 2020.

PARUSSOLO, L. et al. Detection of virulence genes and antimicrobial resistance profiles of *Escherichia coli* isolates from raw milk and artisanal cheese in Southern Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 40, n. 1, p. 163–178, 2019.

PASCU, C. et al. Etiology of Mastitis and Antimicrobial Resistance in Dairy Cattle Farms in the Western Part of Romania. **Antibiotics**, v. 11, n. 1, 2022.

PATERSON, G. K. et al. Prevalence and properties of mecC methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in bovine bulk tank milk in Great Britain. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, p. 598–602, 2014.

PATERSON, G. K.; HARRISON, E. M.; HOLMES, M. A. The emergence of mecC methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Trends in Microbiology**, v. 22, n. 1, p. 42–47, 2014.

PEIXOTO, R. D. M. et al. Etiologia e perfil de sensibilidade antimicrobiana dos isolados bacterianos da mastite em pequenos ruminantes e concordância de técnicas

empregadas no diagnóstico 1. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 9, p. 735–740, 2010.

PERDIGÃO, N. R. DE O. F.; OLIVEIRA, L. S.; CORDEIRO, A. G. P. C. **Sistemas de Produção de Caprinos Leiteiros**. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/156284/1/CNPC-2016-Sistemas-de-producao.pdf>>.

PEREIRA, C. T. M. et al. Microbiology quality, detection of enterotoxin genes and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from milk and Coalho cheese. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 39, n. 5, p. 1957–1968, 2018.

PETERSON, E.; KAUR, P. Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Relationships Between Resistance Determinants of Antibiotic Producers, Environmental Bacteria, and Clinical Pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1–21, 2018.

POOLE, K. Cellular and Molecular Life Sciences Resistance to β -lactam antibiotics. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 61, p. 2200–2223, 2004.

PRENAFETA, A. et al. Short communication: Biofilm production characterization of *mecA* and *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk in Great Britain. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 8, p. 4838–4841, 2014.

PRICE, L. B. et al. *Staphylococcus aureus* CC398: Host Adaptation and Emergence of Methicillin Resistance in Livestock. **mBio**, v. 3, n. 1, p. e00305-11, 2012.

PYÖRÄLÄ, S. et al. Macrolides and lincosamides in cattle and pigs: Use and development of antimicrobial resistance. **The Veterinary Journal**, v. 200, n. 2, p. 230–239, 2014.

RABELLO, R. F. et al. Antimicrobial resistance in farm animals in Brazil: An update overview. **Animals**, v. 10, n. 4, p. 1–43, 2020.

RAGHUNATH, D. Emerging antibiotic resistance in bacteria with special reference to India. **Journal of Biosciences**, v. 33, p. 593–603, 2008.

RIBEIRO, L. F. et al. Occurrence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus* spp. on Brazilian Dairy Farms that Produce Unpasteurized Cheese. **Toxins**, v. 12, n. 12, p. 1–10, 2020.

RIEDEL, S. et al. **Microbiologia Médica de Jawetz, Melnick & Adelberg**. 28th edição. [s.l.] Artmed, 2022.

RODRIGUES, N. M. B. et al. The Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) identification versus biochemical tests: a study with enterobacteria from a dairy cattle environment. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 132–138, 2017.

RUEGG, P. L. A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention 1. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 12, p. 10381–10397, 2017.

SANTIAGO, G. S. et al. AmpC β -lactamase associated with bovine mastitis in Brazil. **African Journal of Agricultural Research**, v. 9, n. 8, p. 503–508, 2015.

SANTIAGO, G. S. et al. Short communication: Extended-spectrum AmpC – producing *Escherichia coli* from milk and feces in dairy farms in Brazil. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 9, p. 7808–7811, 2018.

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

SAVINI, V. **Pet-to-man Travelling Staphylococci A World in Progress**. 1st edition. [s.l.] Academy Press, 2018.

SHARMA, C. et al. Antimicrobial Resistance : Its Surveillance, Impact, and Alternative Management Strategies in Dairy Animals. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 4, p. 237, 2018.

SILVA, A. T. F. et al. Occurrence of β -lactam-resistant *Staphylococcus aureus* in milk from primiparous dairy cows in the northeastern region of Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 52, n. 5, p. 2303–2307, 2020.

SILVA, J. G. et al. First report of a livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST126 harbouring the *mecC* variant in Brazil. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 68, n. 3, p. 1019–1025, 2021.

SILVA, N. C. C. et al. Molecular characterization and clonal diversity of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in milk of cows with mastitis in Brazil. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 11, p. 6856–6862, 2013.

SILVEIRA-FILHO, V. M. et al. Antibiotic resistance and molecular analysis of *Staphylococcus aureus* isolated from cow's milk and dairy products in northeast Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 77, n. 4, p. 583–591, 2014.

STELLA, A. E. et al. Subclinical Bovine Mastitis-Causing Microorganisms In Southwestern Of Goiás State, Brazil. **Veterinária e Zootecnia**, v. 24, n. 4, p. 754–762, 2017.

STEWART, C. D. et al. Testing for induction of clindamycin resistance in erythromycin-resistant isolates of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1716–1721, 2005.

TAMENDJARI, S. et al. Antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from raw cow and goat milk produced in the Tiaret and Souk Ahras areas of Algeria. **Veterinary World**, v. 14, n. 7, p. 1929–1934, 2021.

TEKINER, I. H.; ÖZPINAR, H. Occurrence and characteristics of extended spectrum beta-lactamases-producing Enterobacteriaceae from foods of animal origin. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 444–451, 2016.

THANNER, S.; DRISSNER, D.; WALSH, F. Antimicrobial Resistance in Agriculture. **ASM Journals**, v. 7, n. 2, p. e02227-15, 2016.

TOMAZI, T. et al. Association of herd-level risk factors and incidence rate of clinical mastitis in 20 Brazilian dairy herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 161, p. 9–18, 2018.

TOMPSON, A. C. et al. Understanding Antibiotic Use in Companion Animals : A Literature Review Identifying Avenues for Future Efforts. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, p. 1–12, 2021.

TURNER, N. A. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. April, p. 203–218, 2019.

VAN BOECKEL, T. P. et al. Global trends in antimicrobial use in food animals. **PNAS**,

v. 112, n. 18, p. 5649–5654, 2015.

VAN BOECKEL, T. P. et al. Global trends in antimicrobial resistance in animals in low- And middle-income countries. **Science**, v. 365, p. 1266, 2019.

WANG, Y. et al. Macrolide-lincosamide-resistant phenotypes and genotypes of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis. **Veterinary Microbiology**, v. 130, n. 1–2, p. 118–125, 2008.

WENDLANDT, S. et al. The diversity of antimicrobial resistance genes among staphylococci of animal origin. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 303, n. 6–7, p. 338–349, 2013.

WHO. **WHO. Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics**. Disponível em: <<https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>>.

WILKE, M. S.; LOVERING, A. L.; STRYNADKA, N. C. J. β -Lactam antibiotic resistance : a current structural perspective. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, p. 525–533, 2005.

WOERTHER, P. et al. Trends in Human Fecal Carriage of Extended-Spectrum β -Lactamases in the Community: Toward the Globalization of CTX-M. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 4, p. 744–758, 2013.

WRIGHT, G. D. Q & A : Antibiotic resistance : where does it come from and what can we do about it ? **BMC Biology**, v. 8, n. 123, 2010.

ZERYEHUN, T.; AYA, T.; BAYECHA, R. Study On Prevalence , Bacterial Pathogens and Associated Risk Factors of Bovine Mastitis In Small Holder Dairy Farms in and around Addis Ababa, Ethiopia. **The Journal of Animal and Plant Sciences**, v. 23, n. 1, p. 50–55, 2013.

ZSCHÖCK, M. et al. Detection of genes for enterotoxins (ent) and toxic shock syndrome toxin-1 (tst) in mammary isolates of *Staphylococcus aureus* by polymerase-chain-reaction. **International Dairy Journal**, v. 10, n. 8, p. 569–574, 2000.

5. Capítulo 1

**Ocorrência de enterobactérias produtoras de B-lactamases de espectro
estendido (BLEE) em leite cru de vacas com mastite subclínica no Nordeste
brasileiro**

Artigo submetido à revista Brazilian Journal of Microbiology (Anexo 2)

Ocorrência de enterobactérias produtoras de B-lactamases de espectro estendido (BLEE) em leite cru de vacas com mastite subclínica no Nordeste brasileiro

Resumo

As bactérias da família *Enterobacteriaceae* produtoras de B-lactamases de espectro estendido (BLEE) vêm aumentando em importância na medicina veterinária. As bactérias produtoras de BLEE são capazes de produzir resistência aos B-lactâmicos de quarta geração, os quais são de grande importância na medicina humana. Objetivou-se identificar enterobactérias produtoras de BLEE em leite cru de vaca no Nordeste brasileiro. Foram utilizados 26 isolados bacterianos da família *Enterobacteriaceae* obtidos de amostras de leite de 257 vacas com mastite subclínica e foram analisados para gênero e espécie usando provas microbiológicas. Dos 26 isolados, 53,85% (14/26) foram identificados como *Escherichia coli*, 15,38% (4/26) como *Proteus mirabilis*, 26,92% (7/26) como *Klebsiella* spp. e 3,85% (1/26) como *Citrobacter* spp. 61,54% (16/26) foram positivos no teste de triagem para BLEE, dos quais 12,5% (2/16) foram positivos no teste de sinergia de disco duplo, usando três tipos de cefalosporinas e um disco de amoxicilina/ácido clavulânico, sendo os dois isolados identificados como *Klebsiella* spp. Os 26 isolados foram analisados para os genes codificadores de B-lactamases de espectro estendido *blaSHV* e *blaTEM*, sendo que 53,85% (14/26) foram positivos para um ou os dois genes e 71,43% (10/14) foram identificados como *Escherichia coli*. Conclui-se que enterobactérias produtoras de BLEE ocorrem no leite cru de vacas no Nordeste brasileiro podendo ser uma importante fonte de propagação dessas cepas para humanos, devendo-se considerar as vacas com mastite subclínica como reservatórios dessas estirpes.

Palavras chaves: Resistência bacteriana; alimentos; mastite subclínica; antimicrobianos.

A resistência aos antibióticos é um grande problema em saúde pública em todo o mundo. O uso inadequado de antibióticos tem gerado o desenvolvimento de bactérias resistentes na medicina humana e veterinária, o que está conduzindo a um aumento de infecções incuráveis; sendo considerados o meio ambiente e os animais

domésticos os maiores reservatórios de bactérias resistentes aos antimicrobianos (ARGUDÍN et al., 2017).

O uso de antibióticos na Medicina Veterinária, seja como manejo preventivo ou como tratamento de doenças infecciosas, principalmente em animais de produção de alimentos, tem um grande impacto na saúde pública, visto que contribui com a origem de bactérias resistentes aos antibióticos (Van Boeckel et al., 2015). Dentre esses microrganismos, destacam-se as bactérias da família *Enterobacteriaceae* que são consideradas reservatórios de genes de resistência e formam parte do grupo 1 da lista de patógenos prioritários para pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (WHO, 2017), visto que podem ser carregadoras de genes codificadores de beta-lactamases de espectro estendido (BLEE) que conferem resistência a várias cefalosporinas, às oxymino cefalosporinas (Cefotaxima, Ceftazidima, Ceftriaxona, Cefepime) e aos monobactâmicos (Azetreonam) (BERGŠPICA et al., 2020).

Existem estudos que identificaram enterobactérias, principalmente *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* carreadoras de genes capazes de codificar BLEE, provenientes de alimentos de origem animal como leite (PARUSSOLO et al., 2019), frango (ORTEGA-PAREDES et al., 2020), camarão (SIVARAMAN et al., 2021), carne bovina e suína (GUO et al., 2021), destacando que os animais destinados à produção de alimentos devem ser considerados na vigilância epidemiológica de cepas resistentes e multirresistentes, assim como também inferem que podem estar atuando como reservatório de genes de resistência aos antimicrobianos.

No Brasil existem alguns estudos sobre a detecção de enterobactérias produtoras de beta-lactamases de espectro estendido em leite cru e queijo artesanal na região sul do país (PARUSSOLO et al., 2019; ZANELLA et al., 2010), no entanto na região Nordeste do Brasil as pesquisas com a temática são escassas.

Diante disso este estudo teve como objetivo identificar bactérias da família *Enterobacteriaceae* produtoras de beta-lactamases de espectro estendido (BLEE) e estirpes carreadoras dos genes *blaSHV* e *blaTEM* de leite cru procedente de vacas com mastite subclínica no Nordeste brasileiro.

Foram analisados vinte e seis isolados de enterobactérias recuperadas de amostras de leite cru de 257 vacas com mastite subclínica no teste CMT (*California Mastitis Test*) procedentes de seis propriedades bovinas leiteiras do estado de Pernambuco. As amostras foram coletadas no primeiro semestre do ano 2021. Essa

pesquisa foi realizada com a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), com a licença N° 4848110121.

A identificação de gênero e espécie foi feita por meio das características das colônias em ágar base enriquecido com 5% de sangue de carneiro, coloração de Gram e provas bioquímicas como fermentação de glicose, fermentação de lactose, motilidade, utilização de citrato, descarboxilação da lisina, produção de H₂S, produção de gás, produção de indol, produção de urease e produção de fenilalanina desaminase (KONEMAN et al., 2018).

Todos os isolados foram submetidos ao teste de triagem para produção de beta-lactamases de espectro estendido (BLEE) de acordo com a metodologia indicada no guia do Comitê Europeu de Testes de Suscetibilidade Antimicrobiana (UECAST, 2017). O teste foi realizado em ágar Müller Hinton com os seguintes discos de antibióticos: Cefotaxima (30ug), Ceftazidima (30ug) e Ceftriaxona (30ug). Foi feito um inóculo dos isolados em solução salina estéril a uma concentração 0,5 na escala de McFarland para posterior inoculação em placa, incubadas juntamente com os discos de antibióticos a 37°C por 18 – 24 horas. Todos os isolados que apresentaram um diâmetro igual ou menor que 21mm para Cefotaxima, 23mm para Ceftriaxona e/ou 22mm para Ceftazidima foram selecionados para realizar o teste confirmatório de BLEE.

O teste confirmatório foi realizado usando o teste de sinergia de disco duplo (DDST), seguindo as diretrizes para detecção dos mecanismos de resistência e resistências específicas em isolados clínicos e/ou de importância epidemiológica (UECAST, 2017). Foram utilizados discos de antibióticos: cefalosporinas [Cefotaxima (30ug), Ceftazidima (30ug) e Ceftriaxona (30ug)] e um disco de amoxicilina com ácido clavulânico (30ug). Os discos de cefalosporinas foram colocados a 20mm de distância desde o centro do disco até o centro do disco de amoxicilina com ácido clavulânico no ágar Mueller Hinton (Figura 1). Após o período de incubação (18 – 24 horas), considerou-se positivo para a produção de BLEE quando foi observado um aumento da zona de inibição em torno de qualquer disco de cefalosporina ou um alargamento ou “zona fantasma” em direção ao disco contendo o ácido clavulânico. O controle positivo para o teste confirmatório foi a cepa de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603.

Para as análises moleculares, o DNA foi extraído de todos os isolados de enterobactérias, independentemente se foram positivas no teste DDST, utilizando a técnica de extração térmica (PÉREZ-PÉREZ; HANSON, 2002). Após a extração,

todas as amostras passaram por análise qualitativa e quantitativa do DNA, utilizando espectrofotômetro (Multiskan Go de Thermo Scientific) e as concentrações de DNA foram ajustadas para 50ng/μL.

Os genes que codificam as BLEE foram identificados por meio da PCR convencional, sendo os genes alvo: *blaSHV* e *blaTEM*. Para a amplificação do gene *blaSHV* foram utilizados os *primers* descritos por De Gheldre et al. (2003), SHV-F (5' - GCCGGGTTATTCTTATTTGTCGC - 3') e SHV-R (5' - ATGCCGCCGCCAGTCA - 3'). Para a amplificar o gene *blaTEM* foram utilizados os *primers* descritos por Vercauteren et al. (1997), TEM-F (5' - TCGGGGAAATGTGCG - 3') e TEM-R (5' - TGCTTAATCAGTGAGGCACC - 3').

A mistura para a reação da PCR convencional (12,5μL) conteve: 2X de GoTaq® G2 Green Master Mix, primer forward e reverse para *blaSHV* (1pmol/μL) ou primer forward e reverse para *blaTEM* (5pmol/μL), água ultrapura e 2,5μL de DNA. As condições para ambas reações foram: desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos, de desnaturação de 95°C por 1 minuto, 60°C de anelamento por 30 segundos, extensão de 72°C por 40 segundos, e uma extensão final de 72°C por 4 minutos. Foi usado como controle positivo para *blaSHV* a cepa de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 e como controle positivo para *blaTEM* a cepa de *Escherichia coli* ATCC 35218. Como controle negativo foi utilizada a cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922.

Vinte seis isolados bacterianos foram identificados como *Escherichia coli* (53,85% [14/26]), *Proteus mirabilis* (15,38% [4/26]), *Klebsiella* spp. (26,92% [7/26]) e *Citrobacter* spp. (3,85% [1/26]). Em relação à identificação fenotípica de enterobactérias produtoras de BLEE, 42,31% (11/26) dos isolados apresentaram uma zona inibitória igual ou menor que 21mm para Cefotaxima, 46,15% (12/26) tiveram uma zona inibitória igual ou menor que 23mm para Ceftriaxona e 61,54% (16/26) mostraram uma zona inibitória igual o menor que 22mm para Ceftazidima. Todos os isolados positivos na prova de triagem para BLEE [61,54% (16/26)] foram submetidos ao teste de sinergia de disco duplo (DDST) e 38,46% (10/26) dos isolados exibiram o tamanho da zona de inibição indicada como positivo na prova de triagem para os três antibióticos, enquanto que 23,07% (6/26) dos isolados foram positivos para um ou dois antibióticos. Dos 16 isolados, 12,5% (2/16) foram positivos no teste confirmatório de enterobactérias produtoras de BLEE e foram identificados como *Klebsiella* spp.

Sobre a detecção de genes codificadores de BLEE, 53,85% (14/26) dos isolados foram positivos para um ou dois genes, sendo que 79% (11/14) apresentaram o gene *blaSHV*, 64% (9/14) o gene *blaTEM* e 43% (6/14) apresentaram ambos genes (*blaSHV* e *blaTEM*). Dos dois isolados positivos no teste fenotípico confirmatório de BLEE (DDST), um deles foi positivo para o gene *blaSHV*. Dos 14 isolados positivos para um ou dois genes, 57% (8/14) foram positivos no teste de triagem para um ou mais tipos de cefalosporinas e 43% (6/14) não apresentaram nenhum nível de resistência às cefalosporinas usadas no teste de triagem.

O gene mais prevalente foi o *blaSHV* com 11 isolados positivos, dos quais 73% (8/11) foram identificados como *Escherichia coli* e 27% (3/11) como *Klebsiella* spp., enquanto o gene *blaTEM* foi encontrado em 9 isolados, sendo 89% (8/9) *Escherichia coli* e 11% (1/9) *Citrobacter* spp.; os dois genes foram encontrados em 23,1% (6/26) dos isolados e todos foram identificados como *Escherichia coli*.

Nos animais produtores de alimentos, as enterobactérias como *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp. formam parte da microbiota comensal intestinal e têm a capacidade de receber e transferir de maneira horizontal os genes de resistência entre várias espécies de bactéria (ARGUDÍN et al., 2017). Estudos dos agentes causais da mastite bovina identificaram que as enterobactérias são um dos principais agentes de origem ambiental, sendo consideradas oportunistas, visto que o estresse produzido pelo aumento na exploração de animais e a superlotação fazem desses animais um alvo fácil para a colonização bacteriana do úbere (PAL; REGASA; GIZAW, 2020).

No nosso estudo foram identificados dois isolados de *Klebsiella* spp. produtores de BLEE no estado de Pernambuco, utilizando a prova de sinergia de disco duplo. No Brasil já foram identificadas anteriormente bactérias da família *Enterobacteriaceae* produtoras de BLEE no sistema agropecuário (Parussolo et al., 2019; Santiago et al., 2018; Nóbrega et al., 2013), e na região Nordeste do país não há publicações relacionadas com bactérias produtoras de BLEE isoladas de leite bovino e caprino, porém no estudo de Campos et al. (2017) foram analisadas duas amostras de queijo artesanal procedentes do estado de Bahia obtendo resultados negativos para bactérias produtoras de BLEE. Palmeira et al. (2020) identificaram 40 isolados de *E. coli* produtores de BLEE em amostras de fezes procedentes de fazendas de criação de bovinos, dos quais 6 isolados foram obtidos em fazendas do estado de Pernambuco, inferindo que o gado deve ser considerado um importante reservatório de bactérias produtoras de BLEE.

As bactérias produtoras de BLEE produzem enzimas principalmente codificadas por plasmídeos capazes de hidrolisar diferentes tipos de cefalosporinas. Essas enzimas são identificadas como SHV (sulfidril variável), TEM (temoneira) e CTX-M (cefotaximases) (AHMED, 2021; ARGUDÍN et al., 2017). Na análise molecular para identificar cepas que carregam os genes *blaSHV* e *blaTEM* foram testados todos os isolados de enterobactérias independentemente do resultado no teste de triagem ou na prova de sinergia de disco duplo. Dos dois isolados de *Klebsiella* spp. positivos no teste fenotípico de produção de BLEE, apenas um foi positivo para o gene *blaSHV*, enquanto que o outro isolado foi negativo para os dois genes testados o que pode estar relacionado com os genes que não foram analisados neste estudo, os quais codificam as beta-lactamases tipo CTX-M. As bactérias do gênero *Klebsiella* já foram identificadas como agentes causadores de mastite ambiental em bovinos (RIBEIRO et al., 2008). No estudo de Nóbrega et al. (2013) foram isoladas *Klebsiella* spp. produtoras de BLEE em amostras de leite bovino de tanque no estado de São Paulo.

A maior parte dos isolados de leite cru que estão carreando os genes *blaSHV* e/ou *blaTEM* foram identificados como *E. coli*, sendo o gene *blaSHV* identificado em maior quantidade que o *blaTEM*. A identificação da maioria dos isolados como *E. coli* está em concordância com outros estudos similares realizados em outros países como Turquia (TEKINER; ÖZPINAR, 2016), Líbano (BISET et al., 2020) e Suíça (GESER; STEPHAN; HÄCHLER, 2012). No Brasil foram realizados estudos em leite cru e/ou em queijo artesanal que determinaram *E. coli* como a bactéria da família *Enterobacteriaceae* mais frequente em casos de mastite subclínica de origem ambiental, no entanto, no nosso estudo observou-se discordância com Parussolo et al. (2019), no sentido do gene *blaTEM* ter sido identificado com maior frequência. Em um estudo mais recente, Palmeira et al. (2020) identificaram o gene CTX-M como o mais frequente, seguido do gene *blaSHV* e, em menor quantidade, o gene *blaTEM* em isolados de *E. coli* de amostras de fezes de bovinos no Nordeste brasileiro. Embora no nosso estudo não tenha sido testado o gene CTX-M, os resultados obtidos estão de acordo com Palmeira et al. (2020), visto que foi identificado o gene *blaSHV* em maior frequência que o gene *blaTEM* em isolados de enterobactérias de leite cru bovina no estado de Pernambuco.

Observamos, ainda, que dos 14 isolados positivos para os genes de BLEE, 01 apresentou sinergia dos três antibióticos beta-lactâmicos com a amoxicilina/ácido clavulânico, sete foram positivos no teste de triagem com resistência a uma ou mais

cefalosporinas testadas e seis foram negativos para todas as provas. Esta discrepância entre as atividades fenotípicas e genotípicas já foi observada por Son et al. (2021) que identificaram isolados de *E. coli* não produtores de BLEE (no teste fenotípico), mas que estão carreando os genes CTX-M e *blaTEM*. Hughes & Andersson (2017) afirmaram que a presença de um gene pode não prever uma característica fenotípica determinada, visto que pode estar relacionada com as condições ambientais que podem modificar as expressões fenotípicas e/ou com outros fatores genéticos, como as combinações de vários genes de resistência, as mutações que podem mudar a expressão fenotípica e a presença das sequências de inserção (como *IS1* e *IS26*) que influenciam os mecanismos de resistência aos antibióticos como a inativação do princípio ativo, alteração do alvo ou produção de bombas específicas de efluxo (Depardieu et al., 2007).

Em conclusão, os dados obtidos nesse estudo confirmam a ocorrência e a circulação de bactérias da família *Enterobacteriaceae* produtoras de BLEE em vacas com mastite subclínica na região Nordeste do Brasil, destacando a importância para a saúde pública, devido ao uso de leite cru ainda ser utilizado para o consumo e elaboração de queijo coalho artesanal. Dessa forma, é importante destacar a necessidade de realizar estudos epidemiológicos sobre bactérias produtoras de BLEE no ambiente agropecuário para poder desenvolver políticas de vigilância epidemiológica.

Referências

- AHMED, I. M. Detection of CTX- M gene in extended spectrum β -lactamases producing Enterobacteriaceae isolated from bovine milk. **Iraqi Journal of Veterinary Sciences**, v. 35, n. 2, p. 397–402, 2021.
- ARGUDÍN, M. A. et al. Bacteria from animals as a pool of antimicrobial resistance genes. **Antibiotics**, v. 6, n. 2, p. 1–38, 2017.
- BERGŠPICA, I. et al. Extended spectrum β -lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* in pigs and pork meat in the European Union. **Antibiotics**, v. 9, n. 10, p. 1–23, 2020.
- BISET, S. et al. Multi-drug resistant and extended-spectrum β -lactamases producing bacterial uropathogens among pregnant women in Northwest Ethiopia. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 19, n. 1, p. 1–9, 2020.
- DE CAMPOS, A. et al. Virulence Genes and Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* from Cheese Made. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 20, n. 20, p. 1–7, 2017.

DE GHELDRE, Y. et al. Evaluation of Oxoid combination discs for detection of extended-spectrum β -lactamases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 4, p. 591–597, 2003.

DEPARDIEU, F. et al. Modes and Modulations of Antibiotic Resistance Gene Expression. **Clinical Microbiology review**, v. 20, n. 1, p. 79–114, 2007.

GESER, N.; STEPHAN, R.; HÄCHLER, H. Occurrence and characteristics of extended- spectrum β -lactamase (ESBL) producing Enterobacteriaceae in food producing animals , minced meat and raw milk. **Veterinary Research**, v. 8, n. 21, p. 1–9, 2012.

GUO, S. et al. Prevalence and genomic analysis of ESBL-producing *Escherichia coli* in retail raw meats in Singapore. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 76, n. 3, p. 601–605, 2021.

HUGHES, D.; ANDERSSON, D. I. Environmental and genetic modulation of the phenotypic expression of antibiotic resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. fux004, n. 41, p. 374–391, 2017.

KONEMAN, E. W. et al. **Diagnóstico Microbiológico - Texto e Atlas**. 7ª edição ed. Rio de Janeiro: Grupo GEN, 2018.

NÓBREGA, D. B. et al. Molecular epidemiology and extended-spectrum β -lactamases production of *Klebsiella pneumoniae* isolated from three dairy herds. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 7, p. 855–859, 2013.

ORTEGA-PAREDES, D. et al. Broiler Farms and Carcasses Are an Important Reservoir of Multi-Drug Resistant *Escherichia coli* in Ecuador. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 7, n. November, 2020.

PAL, M.; REGASA, A.; GIZAW, F. Etiology , Pathogenesis , Risk Factors , Diagnosis and Management of Bovine Mastitis : A Comprehensive Review Etiology , Pathogenesis , Risk Factors , Diagnosis and Management of Bovine Mastitis : A Comprehensive Review. **International Journal of Animal and Veterinary Sciences**, v. 60, p. 40–55, 2020.

PALMEIRA, J. D. et al. Epidemic spread of Inc11/pST113 plasmid carrying the Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) blaCTX-M-8 gene in *Escherichia coli* of Brazilian cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 243, p. 1–5, 2020.

PARUSSOLO, L. et al. Detection of virulence genes and antimicrobial resistance profiles of *Escherichia coli* isolates from raw milk and artisanal cheese in Southern Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 40, n. 1, p. 163–178, 2019.

PÉREZ-PÉREZ, F. J.; HANSON, N. D. Detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 6, p. 2153–2162, 2002.

RIBEIRO, M. G. et al. Peracute bovine mastitis caused by *Klebsiella pneumoniae*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 2, p. 485–488, 2008.

SANTIAGO, G. S. et al. Short communication : Extended-spectrum AmpC – producing *Escherichia coli* from milk and feces in dairy farms in Brazil. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 9, p. 7808–7811, 2018.

SIVARAMAN, G. K. et al. Antibiotic Resistance Profiles and Molecular Characteristics

of Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL)-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolated From Shrimp Aquaculture Farms in Kerala, India. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 1–13, 2021.

SON, T. V. et al. Molecular detection of bla CTX - M gene to predict phenotypic cephalosporin resistance and clinical outcome of *Escherichia coli* bloodstream infections in Vietnam. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 20, n. 60, p. 1–9, 2021.

TEKINER, I. H.; ÖZPINAR, H. Occurrence and characteristics of extended spectrum beta-lactamases-producing Enterobacteriaceae from foods of animal origin. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 444–451, 2016.

UECAST. **EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and / or epidemiological importance**. Disponível em:

<https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_170711.pdf>.

VAN BOECKEL, T. P. et al. Global trends in antimicrobial use in food animals. **PNAS**, v. 112, n. 18, p. 5649–5654, 2015.

VERCAUTEREN, E. et al. Comparison of screening methods for detection of extended-spectrum β - lactamases and their prevalence among blood isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in a Belgian teaching hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 9, p. 2191–2197, 1997.

WHO. **WHO. Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics**. Disponível em: <<https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>>.

ZANELLA, G. N. et al. Occurrence and antibiotic resistance of coliform bacteria and antimicrobial residues in pasteurized cow's milk from Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 73, n. 9, p. 1684–1687, 2010.

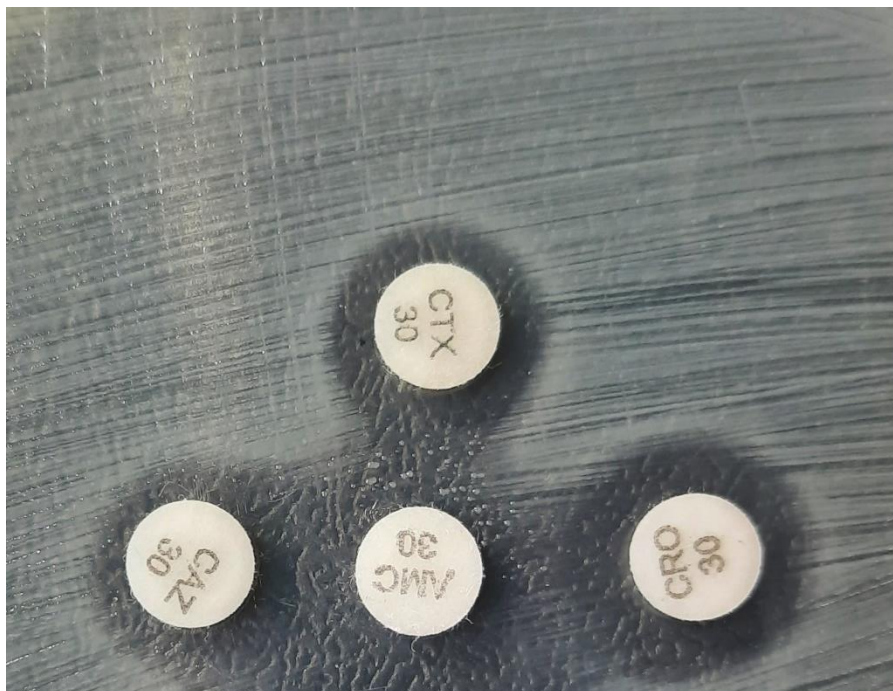


Figura 1 Isolado positivo na prova de sinergia de disco duplo. Na figura observa-se o alargamento ou “zona fantasma” em direção ao disco de ácido clavulânico.

6. Capítulo 2

Padrões de resistência de *Staphylococcus* spp. isolados de leite vacas e cabras com mastite subclínica no Nordeste brasileiro

Padrões de resistência de *Staphylococcus* spp. isolados de leite vacas e cabras com mastite subclínica no Nordeste brasileiro

Resumo

Objetivou-se nesse estudo determinar o perfil fenotípico e genotípico de resistência aos β -lactâmicos, tetraciclinas, macrolídeos e lincosamidas em cepas de *Staphylococcus* spp. isolados de leite de vaca e cabra no estado de Pernambuco. Foram obtidos 148 isolados de *Staphylococcus* spp. de leite bovino, dos quais se identificaram 25% (37/148), 5,4% (8/148), 1,4% (2/148) e 25,7% (38/148) como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus* e *Staphylococcus chromogenes*, respectivamente. Do leite caprino foram obtidos 119 isolados de *Staphylococcus* spp., dos quais 6,72% (8/119) foram identificados como *Staphylococcus aureus*; 22,7% (27/119) *Staphylococcus epidermidis*; 26,9% (32/119) *Staphylococcus haemolyticus* e 11,8% (14/119) *Staphylococcus chromogenes*. Os isolados que não foram identificados dentro dessas espécies foram classificados como *Staphylococcus* spp. No perfil fenotípico, tanto os isolados bovinos como os caprinos apresentaram elevadas frequências de resistência à penicilina com 52,0% (77/148) e 44,5% (53/119), respectivamente, seguida de resistência à tetraciclina com 10,1% (15/148) para os bovinos e 30,3% (36/119) para os caprinos. No perfil genotípico, o gene *blaZ* foi identificado em 40,54% (60/148) dos isolados bovinos e 50,42% (60/119) dos isolados caprinos; quanto aos genes associados às tetraciclinas, o mais prevalente para ambas as espécies foi o gene *tetK*, com 22,30% (33/148) em bovinos e 44,54% (53/119) em caprinos. Os genes *mecA* e *mecC* não foram detectados em nenhum isolado, porém, no perfil fenotípico obteve-se uma frequência de 2,70% (4/148) para os isolados bovinos e 5,0% (6/119) nos isolados caprinos. No D-teste foi identificado 0,68% (1/148) do isolado bovino e 4,20% (5/119) dos caprinos positivos para a resistência induzida às lincosamidas (iMLS_b), fato reportado pela primeira vez no estado de Pernambuco, e em caprinos pela primeira vez no Nordeste do Brasil. Os dados obtidos nesse estudo demonstram que apesar dos programas para o controle no uso de antimicrobianos no sistema agropecuário, o problema ainda persiste, sendo necessário um monitoramento mais eficiente da resistência aos antimicrobianos devido à elevada capacidade de mutações bacterianas.

Palavras Chave: cepas multirresistentes, resistência genotípica, resistência fenotípica, iMLS

Introdução

O gênero *Staphylococcus* faz parte da microbiota da pele e mucosas dos humanos e animais (LONCARIC et al., 2019). São cocos Gram positivos com uma grande capacidade de transferir e adquirir genes de virulência e de resistência aos antimicrobianos, assim como de transmiti-los ao humano (MORRIS et al., 2017; WENDLANDT et al., 2013).

O leite cru é uma importante fonte de transmissão de cepas resistentes e multirresistentes (VIRDIS et al., 2010), e as bactérias do gênero *Staphylococcus* são uns dos principais agentes causais das mastites clínica e subclínica, tanto em bovinos como em caprinos (FRANÇA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2022), sendo a doença mais importante em animais de produção no mundo devido às altas prevalências e às grandes perdas econômicas que produz, assim como também do grande impacto na saúde pública (KACZOREK et al., 2017).

A resistência aos antimicrobianos continua sendo um grande problema na saúde pública mundial (DA COSTA; LOUREIRO; MATOS, 2013). O uso de antimicrobianos em animais produtores de alimentos vem aumentando com o tempo, principalmente nos países em desenvolvimento, devido ao aumento da necessidade de alimentos proteicos de origem animal (FAO et al., 2016). Apesar da existência de antibióticos de uso exclusivo veterinário, estes pertencem às classes junto com antibióticos de uso humano, com estrutura semelhante ou idêntica; o uso inadequado desses fármacos pode resultar na origem de resistências cruzadas como é o caso de ceftiofur (β -lactâmicos), tilosina (macrolídeos), pirlimicina (lincosamidas) (RABELLO et al., 2020; THANNER; DRISSNER; WALSH, 2016).

Os padrões de resistência das cepas bacterianas do ambiente agropecuário sempre estão em mudanças devido à capacidade das bactérias de doar e receber elementos genéticos móveis, assim como também da pressão diária exercida nos animais produtores de alimentos (THANNER; DRISSNER; WALSH, 2016).

Objetivou-se desse estudo determinar as características fenotípicas e genotípicas de resistência aos β -lactâmicos, tetraciclinas, macrolídeos e lincosamidas

em isolados de *Staphylococcus* spp. obtidos de leite vacas e cabras com mastite subclínica na região nordeste do Brasil.

Material e Métodos

Comissão de ética no uso de animais

Esse estudo foi realizado sob a licença da Comissão de ética no uso de animais (CEUA) N°4848110121.

Amostragem

Foi realizado um estudo transversal por conveniência em seis propriedades de criação de vacas leiteiras distribuídas em cinco municípios do estado de Pernambuco e em 17 propriedades de criação de cabras leiteiras distribuídas em oito municípios do mesmo estado (Figura 1). As amostras de leite de vacas foram submetidas ao *California Mastitis Test* (CMT) para identificação de animais com mastite subclínica. As amostras de leite de cabras foram analisadas somente na técnica microbiológica para caracterizar a infecção da glândula mamária.

Foram coletadas amostras de leite de 426 vacas, identificando 257 vacas positivas no CMT, enquanto que foram amostradas de 323 cabras.

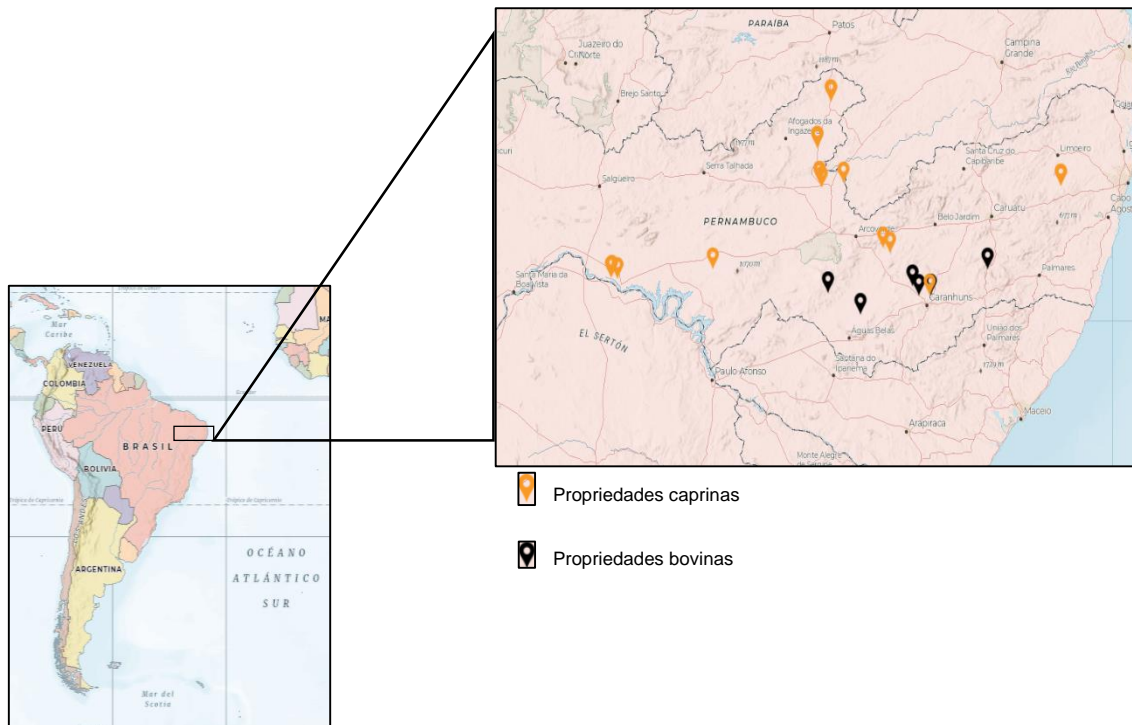


Figura 1. Localização das propriedades de coleta. Municípios das propriedades bovinas: Panelas (1), Garanhuns (2), Caetés (1), Águas Belas (1), Tupanatinga (1). Municípios das propriedades caprinas: Pombos (2), Garanhuns (1), Belém de São Francisco (3), Floresta (1), São José de Egito (2), Iguaraci (2), Sertânia (4), Venturosa (2).

Isolamento bacteriano e identificação

As amostras de leite de cabras e vacas foram inoculadas em ágar base enriquecido com 5% de sangue ovino e incubadas a 37°C por 24 – 48 h. Após a incubação foi realizada a análise macroscópica das colônias e microscópica utilizando a técnica de coloração Gram, além da prova de catalase. Todas as colônias que apresentaram características típicas de *Staphylococcus* spp. em ágar sangue (colônias redondas, cinzas ou amareladas com ou sem B-hemólise), resultado positivo na prova de catalase e na microscopia apresentaram-se como cocos Gram positivos dispostos em cachos de uva foram identificados como *Staphylococcus* spp. Posteriormente, foi realizada a análise molecular para identificação das espécies: *Staphylococcus aureus*, *S. chromogenes*, *S. haemolyticus* e *S. epidermidis*, utilizando os *primers* descritos na tabela 1.

Tabela 1 Primers utilizados para identificação de espécies de *Staphylococcus* spp.

Espécie	Primer	Sequência (5' - 3')	Amplicon (pb)	Referência
<i>Staphylococcus aureus</i>	NUC-F	GCGATTGATGGTGATACGGTI	270	Brakstad et al. (1992)
	NUC-R	AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC		
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	SCHS1-F	GCGTACCAGAAGATAAAACAACTC	222	Shome et al. (2011)
	SCHS1-R	CATTATTTACAACGAGCCATGC		
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	SER-F	AAGAGCGTGGAGAAAAGTATCAAG	130	Shome et al. (2011)
	SER-R	TCGATACCATCAAAAAGTTGG		
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	SHS1-F	CAAATTAATTCTGCAGTTGAGG	214	Shome et al. (2011)
	SHS1-F	AGAGCCCCATTGTTCTTTGA		

Teste de resistência fenotípica a antimicrobianos

Todos os isolados de *Staphylococcus* spp., independente da espécie identificada, foram submetidos ao teste fenotípico de resistência aos antibióticos de acordo com as metodologias recomendadas no manual do CLSI (2020). O teste foi realizado em ágar Muller Hinton utilizando os discos de antibióticos: Eritromicina (15µg), Clindamicina (2µg), Cefoxitina (30µg), Penicilina (10UI), Tetraciclina (30µg) e Ceftiofur (30µg). Antes de inocular as bactérias no ágar Muller Hinton, todas os isolados foram suspensos em solução salina com uma concentração 0,5 na escala de McFarland. Após a distribuição dos discos de antibióticos nas placas, estas foram incubadas a 37°C por 16-18 horas. Os resultados foram mensurados e comparados com as tabelas do manual VET01S do Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLSI, 2020).

D – teste

A detecção de resistência induzida à Clindamicina (D – teste) foi realizada empregando-se a metodologia descrita no manual VET01S do Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLSI, 2020). Foi utilizado o ágar Muller Hinton e os discos de antibióticos: Clindamicina, 2µg e Eritromicina, 15µg que foram colocados a uma distância de 20mm entre eles; as placas foram incubadas a 37°C por 16 – 18 horas. Um resultado positivo (D – teste +) foi identificado quando observado um achatamento (Zona D) na zona de inibição da Clindamicina adjacente ao disco da Eritromicina. Todos os resultados fenotípicos foram classificados de acordo com as características dos fenótipos do teste de indução da Clindamicina: D⁺, iMLS_B induzível; R, cMLS_B constitutiva (resistência à eritromicina e à clindamicina); D⁻, MS (resistente à

Eritromicina e sensível à Clindamicina); L⁺, resistente à Clindamicina e sensível à eritromicina; e S, sensível aos dois antibióticos (STEWART et al., 2005).

Detecção de genes associados à resistência às diferentes classes de antibióticos

Para a análise molecular, o DNA dos isolados foi preparado utilizando a técnica de extração térmica descrita por Kyselková et al. (2015) com modificações. As diluições das bactérias em solução salina foi aquecida a 95°C por 15 min, imediatamente foram levadas ao freezer a -20°C por meia hora ou até congelamento total. O DNA foi quantificado utilizando o espectrofotômetro (Multiskan Go de Thermo Scientific) e as concentrações de DNA foram ajustadas para 50ng/μL.

A identificação dos genes que codificam a resistência aos antibióticos foi realizada utilizando os *primers* previamente descritos e estão identificados na tabela 2.

A mistura para a reação da PCR convencional (12,5μL) conteve: 2X de GoTaq® G2 Green Master Mix, primer forward e reverse a uma concentração de 10pmol/μL para todos os primers com exceção do primer *ermA* que foi utilizado 50pmol/μL, água ultrapura e 2,5μL de DNA.

Tabela 2 Primers utilizados na identificação de genes codificadores da resistência aos antibióticos.

Gene Alvo	Primer	Sequência (5'-3')	Amplicon (pb)	Referência
<i>erma</i>	erm(A) - 1	GCGGTAAACCCCTCTGAG	434	(WERCKENTHIN; SCHWARZ, 2000)
	erm(A) - 2	GCCTGTCGGAATTG		
<i>ermB</i>	erm(B) - 1	CATTTAACGACGAAACTGGC	425	(JENSEN; FRIMODT-MØLLER; AARESTRUP, 1999)
	erm(B) - 2	GGAACATCTGTGGTATGGCG		
<i>ermC</i>	erm(C) - 1	ATCTTTGAAATCGGCTCAGG	295	(JENSEN; FRIMODT-MØLLER; AARESTRUP, 1999)
	erm(C) - 2	CAAACCCGTATTCCACGATT		
<i>mphC</i>	mph(C) - 1	GAGACTACCAAGAAGACCTGACG	722	(LÜTHJE; SCHWARZ, 2006)
	mph(C) - 2	CATACGCCGATTCTCCTGAT		
<i>msrA</i>	msr(A) - 1	GCAAATGGTGTAGGTAAGACA ACT	400	

	msr(A) - 2	ATCATGTGATGTAAACAAAAT		(WONDRACK et al., 1996)
<i>mecA</i>	2W	TGGTATGTGGAAGTTAGATTGGGAT	155	Nakagawa et al. [16]
	2X	CTAATCTCATATGTGTTCTGTATTGGC		
<i>mecC</i>	1A	CATTAATAATCAGAGCGAGGC	188	Paterson et al. [17]
	1B	TGGCTGAACCCATTTTTGAT		
<i>blaZ</i>	blaZ F	AAGAGATTTGCCTATGCTTC	517	Sawant et al. (2009)
	blaZ R	GCTTGACCACTTTTATCAGC		
<i>Tetk</i>	tetK F	TCGATAGGAACAGCAGTA	169	Ng et al. (2001)
	tetK R	CAGCAGATCCTACTCCTT		
<i>tetM</i>	tetM F	GTGGACAAAGGTACAACGAG	406	Ng et al. (2001)
	tetM R	CGGTAAAGTTCGTACACAC		
<i>tetL</i>	tetL F	TCGTTAGCGTGCTGTCATTC	268	Ng et al. (2001)
	tetL R	GTATCCCACCAATGTAGCCG		

Os produtos amplificados foram observados e fotodocumentados (Loccus – L-PIX EX) mediante eletroforese usando gel de agarose a 2% e corados com Blue Green Dye (LGC Biotechnology). Como controles positivos foram utilizadas cepas que contém os genes utilizados nesta pesquisa, e como controle negativo foi utilizada água Mili-Q ultrapura. Para a pesquisa de genes que não se tinha controle, foram obtidos os produtos da PCR e encaminhadas para o sequenciamento.

Análise estatística

Os resultados obtidos foram tabulados em Excel 2013 e depois foram avaliados e expressos em frequências absolutas e relativas. O teste exato de Fisher foi utilizado para avaliar a associação estatística entre a presença do gene e a expressão fenotípica em cada espécie (bovino ou caprino) testada.

Resultados

Isolamento e identificação de *Staphylococcus* spp.

Foram obtidos 148 isolados de *Staphylococcus* spp. de leite vacas onde foram identificados 25% (37/148), 5,4% (8/148), 1,4% (2/148) e 25,7% (38/148) como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus heamolitycus* e *Staphylococcus chromogenes*, respectivamente. 42,6% (63/148) dos isolados foram negativos para as espécies analisadas e identificados como *Staphylococcus* spp.

No exame microbiológico das amostras de leite de cabras foram obtidos 119 isolados de *Staphylococcus* spp., dos quais 6,7% (8/119) foram identificados como *Staphylococcus aureus*; 22,69% (27/119) *Staphylococcus epidermidis*; 26,9% (32/119) *Staphylococcus haemolyticus*; 11,8% (14/119) *Staphylococcus chromogenes*; 31,9% (38/119) foram negativos na análise molecular para as quatro espécies testadas e foram denominados de *Staphylococcus* spp.

Resistência fenotípica aos antibióticos

Os resultados obtidos no teste de sensibilidade aos antibióticos estão descritos na tabela 3, dos quais é importante destacar que 2,7% (4/148) dos isolados bovinos apresentaram resistência fenotípica à cefoxitina, sendo identificado um isolado como *Staphylococcus aureus*; 5% (6/119) dos isolados caprinos de *Staphylococcus* spp. apresentaram resistência fenotípica para cefoxitina, e um deles foi identificado como *Staphylococcus aureus*. A resistência fenotípica à penicilina foi a mais prevalente nas duas espécies, sendo observada em 52,0% (77/148) dos isolados bovinos de *Staphylococcus* spp. e em 44,5% (53/119) dos isolados caprinos, seguida da resistência à tetraciclina com 10,1% (15/148) e 30,6% (36/119) dos isolados bovinos e caprinos, respectivamente. Não foi observada resistência fenotípica ao ceftiofur nos isolados de ambas as espécies.

Em relação à eritromicina e à clindamicina, nos isolados bovinos foi observada uma resistência de 6,75% (10/148) e 7,43% (11/148), e nos caprinos foram resistentes 5,0% (6/119) e 1,7% (2/119) dos isolados, respectivamente.

D – teste

No teste para detecção da resistência induzida à clindamicina de cepas de *Staphylococcus* spp. de isolados bovinos e caprinos (Tabela 4), 0,68% (1/148) dos isolados bovinos e 4,2% (5/119) dos isolados caprinos induziram resistência à clindamicina e foram identificados como D⁺, iMLS_b (figura 2), sendo que dos isolados caprinos, um isolado foi *Staphylococcus haemolyticus* e quatro *Staphylococcus epidermidis* e o isolado bovino não foi classificado nas espécies identificadas nesse estudo.

Para os isolados de bovinos, 4,73% (7/148) apresentaram um fenótipo R, cMLS_b e um isolado caprino (0,84% [1/119]) de *Staphylococcus chromogenes* exibiu o mesmo fenótipo. Dentre os isolados de vacas com resistência constitutiva, 75% (6/8) foram identificados como *Staphylococcus aureus*.

Em relação ao fenótipo D⁻ ou MS, observou-se somente em um isolado de *Staphylococcus aureus* e um *Staphylococcus chromogenes* obtidos de vacas; nenhum isolado de cabras apresentou esse fenótipo. Três (2,03% [3/148]) isolados de vacas e um (0,84% [1/119]) de cabra exibiram resistência à Clindamicina e não à eritromicina e foram identificados como L⁺.

Para isolados de vacas e cabras, 91,22% (135/148) e 94,1% (112/119), respectivamente foram sensíveis ou intermediários para os dois antibióticos.



Figura 2. Fenótipo positivo no D-test, apresentando achatamento na zona de inibição da Clindamicina adjacente ao disco de Eritromicina e crescimento de colônias em direção ao disco de Clindamicina (Fonte: o autor).

Tabela 3 Perfil de sensibilidade aos antibióticos de *Staphylococcus* spp. isolados de leite bovino e caprino do estado de Pernambuco.

Agente	N° de isolados	Resistência fenotípica aos antimicrobianos											
		CFO	PEN	ERI	CLI	TET	CFT						
Vacas													
<i>Staphylococcus aureus</i>	37	1	2,70%	24	64,86%	5	13,51%	5	13,51%	7	18,92%	0	0,00%
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	8	0	0,00%	6	75,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	2	0	0,00%	1	50,00%	0	0,00%	0	0,00%	1	50,00%	0	0,00%
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	38	2	5,26%	12	31,58%	2	5,26%	2	5,26%	2	5,26%	0	0,00%
<i>Staphylococcus</i> spp.	63	1	1,59%	34	53,97%	3	4,76%	4	6,35%	5	7,94%	0	0,00%
<i>Total</i>	148	4	2,70%	77	52,03%	10	6,75%	11	7,43%	15	10,14%	0	0,00%
Cabras													
<i>Staphylococcus aureus</i>	8	1	12,5%	6	75,0%	0	0,0%	0	0,0%	6	75,0%	0	0,0%
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	27	0	0,0%	22	81,5%	4	14,8%	0	0,0%	13	48,1%	0	0,0%
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	32	2	6,3%	12	37,5%	1	3,13%	0	0,0%	8	25,0%	0	0,0%
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	14	3	21,4%	5	35,7%	1	7,1%	1	7,1%	1	7,1%	0	0,0%
<i>Staphylococcus</i> spp.	38	0	0,0%	8	21,1%	0	0,0%	1	2,6%	8	21,1%	0	0,0%
<i>Total</i>	119	6	5,0%	53	44,5%	6	5,0%	2	1,7%	36	30,3%	0	0,0%

CFO: cefoxitina; PEN: penicilina; ERI: eritromicina; CLI: clindamicina; TET: tetraciclina; CFT: ceftiofur

Tabela 4 Identificação dos fenótipos observados na prova D-teste.

	Vacas		Cabras	
	N° isolados	Frequência	N° isolados	Frequência
S	135	91,22%	112	94,12%
D ⁻ , (MS)	2	1,35%	0	0,00%
R, cMLS _b	7	4,73%	1	0,84%
D ⁺ , iMLS _b	1	0,68%	5	4,20%
L ⁺	3	2,03%	1	0,84%
Total	148	100,00%	119	100,00%

D⁺, iMLS_b induzível; R, cMLS_b constitutiva (resistência à eritromicina e à clindamicina); D⁻, MS (resistente à Eritromicina e sensível à Clindamicina); L⁺, resistente à Clindamicina e sensível à eritromicina; e S, sensível aos dois antibióticos

Detecção de genes associados à resistência às diferentes classes de antibióticos

Os resultados dos testes genotípicos aos diferentes grupos de antibióticos estão apresentados na Tabela 5. O gene *blaZ* foi o mais prevalente nos isolados de *Staphylococcus* spp. tanto de origem bovina como caprina, com 40,54% (60/148) dos isolados de vacas e 50,42% (60/119) dos isolados de cabras positivos para o gene. Dentre os isolados que expressaram gene *blaZ*, nas vacas, 62,16% (37/60) foram *Staphylococcus aureus*, enquanto em cabras, predominou *Staphylococcus epidermidis* com 21,85% (26/119). Nenhum isolado bovino e caprino foi positivo para os genes *mecA* e *mecC*.

Os genes codificadores da resistência às tetraciclina também apresentaram frequências importantes; o gene *tetK* foi o mais frequente nos isolados de ambas as espécies com 22,3% (33/148) nos isolados bovinos e 44,54% (53/119) nos caprinos. Os demais genes associados à resistência às tetraciclina, *tet38*, *tetL* e *tetM*, também foram detectados, porém, com menor frequência (Tabela 5).

Dentre os determinantes genéticos de resistência aos MLS testados, tanto em isolados bovinos como caprinos, todos foram identificados pelo menos em um isolado bacteriano, sendo importante destacar que os genes associados à resistência induzida à clindamicina (D⁺, iMLS_b) foram observados em maior frequência nos isolados caprinos que nos bovinos com 10,08% (12/119) do gene *ermA*, 8,40% (10/119) do gene *ermB*, 3,36% (4/119) do gene *ermC* e 0,84% (1/119) do gene *mphC*. Dos 5 isolados de caprinos com fenótipo D⁺, iMLS_b, quatro carregavam um ou dois

genes codificadores desse tipo de resistência, enquanto o único isolado bovino com aquele fenótipo apresentou o gene *msrA*, o qual codifica a resistência aos macrolídeos, mas não à lincosamidas.

Tabela 5 Perfil genotípico de resistência às diferentes classes de antimicrobianos.

Agente	N° de isolados	Perfil genotípico de resistência																							
		<i>blaZ</i>	<i>mecA</i>	<i>mecC</i>	<i>tet38</i>	<i>tetK</i>	<i>tetL</i>	<i>tetM</i>	<i>ermA</i>	<i>ermB</i>	<i>ermC</i>	<i>msrA</i>	<i>mphC</i>												
Vacas																									
<i>Staphylococcus aureus</i>	37	23	62,16%	0	0,00%	0	0,00%	19	62,16%	17	45,95%	3	8,11%	1	2,70%	2	5,41%	0	0,00%	0	0,00%	1	2,70%	0	0,00%
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	8	8	100,0%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	2	25,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	2	1	50,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	2	100,0%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	38	11	28,95%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	6	15,79%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	1	2,63%	1	2,63%
<i>Staphylococcus spp.</i>	63	17	26,98%	0	0,00%	0	0,00%	1	1,59%	6	9,52%	0	0,00%	0	0,00%	1	1,59%	1	1,59%	1	1,59%	2	3,17%	0	0,00%
Total	148	60	40,54%	0	0,00%	0	0,00%	20	13,51%	33	22,30%	3	2,03%	1	0,67%	3	2,03%	1	0,67%	1	0,67%	4	2,70%	1	0,67%
Cabras																									
<i>Staphylococcus aureus</i>	8	6	5,04%	0	0,00%	0	0,00%	6	5,04%	4	3,36%	0	0,00%	4	3,36%	4	3,36%	4	3,36%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	27	26	21,85%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	19	15,97%	0	0,00%	1	0,84%	4	3,36%	4	3,36%	4	3,36%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	32	16	13,45%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	17	14,29%	1	0,84%	4	3,36%	2	1,68%	1	0,84%	0	0,00%	3	2,52%	0	0,00%
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	14	6	5,04%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	1	0,84%	1	0,84%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
<i>Staphylococcus spp.</i>	38	6	5,04%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	12	10,08%	0	0,00%	3	2,52%	2	1,68%	1	0,84%	0	0,00%	0	0,00%	1	0,84%
Total	119	60	50,42%	0	0,00%	0	0,00%	6	5,04%	53	44,54%	2	1,68%	12	10,08%	12	10,08%	10	8,40%	4	3,36%	3	2,52%	1	0,84%

A associação estatística entre o perfil genético e fenotípico de resistência encontram-se na tabela 6. Tanto para bovinos como para caprinos observou-se uma associação estatística significativa para a ocorrência do gene *blaZ* e resistência fenotípica à penicilina e o gene *tetK* à ocorrência de resistência fenotípica à tetraciclina. Nos bovinos foi observada uma associação significativa entre as variáveis *tetM* (gene) e a resistência a tetraciclina. Para os isolados de cabras comprovou-se associação entre o gene *ermC* e a ocorrência de resistência fenotípica à eritromicina (macrolídeos).

Tabela 6 Resultado da análise do teste exato de Fisher entre a presença do gene e a expressão fenotípica, estratificada por espécie (bovina e caprina).

Espécie	Blaz · PEN	ErmA · ERI	ErmA · CLI	ErmB · ERI	ErmB · CLI	ErmC · ERI	ErmC · CLI	MphC · ERI	Tet38 · TET	TetK · TET	TetL · TET	TetM · TET	Msr (A) · ERI
Bovino	0,000*	0,685	0,469	0,317	0,189			0,535	0,107	0,010*	0,002*	0,135	0,094
Caprino	0,000*	0,654	0,114	0,489	0,198	0,003*	0,493	0,739	0,105	0,000*	0,116	0,189	0,400

* Significância estatística

Discussão

Nesse estudo identificou-se o padrão de resistência fenotípica e genotípica de isolados de *Staphylococcus* spp. de leite bovino e caprino no estado de Pernambuco, Brasil. Os resultados obtidos na identificação de espécies de *Staphylococcus* spp. demonstraram uma diferença marcante nas espécies identificadas entre os isolados de vacas e cabras. A maioria dos isolados bovinos corresponderam a *Staphylococcus chromogenes* e *Staphylococcus aureus*, enquanto os isolados caprinos foram identificados com maior frequência em *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus haemolyticus*, coincidindo com os estudos de Oliveira et al. (2022) e Aragão et al. (2021), que também realizaram estudo sobre a mastite bovina e caprina do Nordeste do Brasil.

Na análise do perfil fenotípico de resistência aos antimicrobianos, independentemente da espécie animal de origem dos isolados assim como da espécie de *Staphylococcus* spp., a resistência à penicilina foi a mais prevalente, seguida da tetraciclina, fato também já relatado previamente na região nordeste (ARAGÃO et al., 2021; FRANÇA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2022; SANTOS et al., 2020) e em outras

regiões do Brasil com destaque para elevadas frequências de resistência (ALVES et al., 2020; PÉREZ et al., 2020; SANTOS et al., 2016; SIQUEIRA et al., 2017; STELLA et al., 2017).

A frequência dos genes codificadores de resistência à penicilina (*blaZ*), em nosso estudo foi a mais elevada tanto nos isolados de bovinos como de caprinos, padrão também similar a estudos anteriores (ARAGÃO et al., 2021; OLIVEIRA et al., 2022). Dos genes codificadores da resistência à tetraciclina, a maior prevalência foi para o gene *tetK* tanto em isolados de *Staphylococcus* spp. de bovinos (22,30% [33/148]) como de caprinos (44,54% [53/119]), apresentando também uma associação significativa (p-valor [bovinos] 0,010; p-valor [caprinos] 0,000) entre o gene *tetK* e a resistência fenotípica à tetraciclina. Pérez et al. (2020) determinaram uma frequência acima de 50% do gene *tetK* em isolados de *Staphylococcus aureus* de leite de vaca na região sul do Brasil; o gene *tet38* também teve uma prevalência significativa para isolados de vacas e cabras; ambos os genes estão associados com o mecanismo de resistência de bombas de efluxo (NG et al., 2001; TRUONG-BOLDUC et al., 2015). Apesar de que o gene *tetL* não apresentou frequência elevada em nenhuma das espécies animais estudadas, mostrou uma associação significativa (p-valor 0,002) entre o gene *tetL* e a resistência à tetraciclina na espécie bovina, gene que também já foi identificado em estudo prévio no estado do Piauí (OLIVEIRA et al., 2022).

A classe das tetraciclinas é uma das principais utilizadas no sistema de criação de bovinos e caprinos devido ao amplo espectro do antibiótico e os baixos custos quando comparados a outras classes, e durante anos foi utilizado como promotor de crescimento em animais de produção, principalmente em países em desenvolvimento (GRANADOS-CHINCHILLA; RODRÍGUEZ, 2017). Durante a coleta das amostras nas propriedades de bovinos e caprinos leiteiros foi reportada uma ampla utilização, sobretudo da oxitetraciclina, em bovinos no tratamento de mastite, pododermatite e infecções reprodutivas. A penicilina, ampicilina ou amoxicilina só foram reportadas em duas propriedades de produção caprina, porém, na análise estatística observou-se uma associação estatisticamente significativa entre as variáveis: gene *blaZ* e resistência fenotípica à penicilina (p-valor 0,000*), tanto nos bovinos como nos caprinos.

No estudo de Thanner; Drissner; Walsh (2016) foi relatado que a maioria dos agentes antimicrobianos vendidos, na Suíça, para uso veterinário foram sulfonamidas, penicilinas e tetraciclinas, sendo que 59% foram utilizados em animais de produção

de alimentos, dados similares foram apresentados no estudo de Priyanka et al. (2017), no Irã. Nos Estados Unidos, TEMPINI et al. (2018) relataram que as classes de antibióticos mais utilizadas em animais produtores de leite são os β -lactâmicos, tetraciclina e lincosamidas. No Brasil, Andretta; Call; Nero (2023) descreveram que o tratamento de mastite em animais de produção está baseado principalmente no uso de aminoglicosídeos, cefalosporinas e penicilinas, enquanto que tetraciclina são utilizados em casos de pododermatite, infecções reprodutivas e respiratórias.

A resistência fenotípica à cefoxitina foi observada em baixa prevalência em nosso estudo nos isolados de vacas e cabras (2,70% e 5,0%), respectivamente, demonstrando que a resistência à metilina continua sendo baixa no ambiente agropecuário no Nordeste brasileiro, como já foi reportado em estudos prévios (ARAGÃO et al., 2021; DA SILVA et al., 2022; OLIVEIRA et al., 2022). Por outro lado, não foram identificados os genes *mecA* e *mecC* em nenhum dos isolados obtidos; esta discordância observada entre os perfis fenotípico e genotípico pode estar associada com a superprodução de β -lactamases ou pela presença de outros tipos de proteínas ligadas às penicilinas que não são codificadas pelos genes *mecA* e *mecC* (VIRDIS et al., 2010).

Nas fazendas de bovinos e caprinos, os produtores reportaram o uso de ceftiofur no tratamento de doenças infecciosas, tanto para mastite como para outras infecções, principalmente na espécie bovina, contudo, não foi verificada resistência fenotípica *in vitro* em nenhum isolado de *Staphylococcus* spp.

As resistências fenotípica e genotípica aos macrolídeos (eritromicina) e lincosamidas (clindamicina) também apresentaram frequências baixas, porém, relevantes. A maior parte dos isolados de *Staphylococcus* spp. que apresentaram resistência à eritromicina, exibiram resistência à clindamicina, seja induzida ou constitutiva, significando um risco potencial de fracasso quando o tratamento da mastite pretende ser com antibiótico da classe das lincosamidas (WANG et al., 2008).

No nordeste brasileiro já foram descritas cepas de *Staphylococcus* spp. de origem bovina apresentando fenótipo positivo no D-teste (PEREIRA et al., 2018). Contudo, esse é o primeiro registro do D-teste positivo em isolados de amostras de leite cru de vaca no estado de Pernambuco e em leite de cabra no Nordeste do Brasil. Na análise estatística foi observada associação significativa entre a presença do gene *ermC* e a resistência fenotípica à eritromicina nos caprinos (p-valor 0,003), e não foi observada associação entre os demais genes codificadores de resistência aos MLS

com a resistência fenotípica aos mesmos. Nenhuma das propriedades reportou o uso de pirlimicina ou qualquer outro antibiótico da classe de lincosamidas, no entanto, o uso de macrolídeos, especificamente tilosina foi citado em quatro propriedades caprinas que fizeram parte desse estudo. Nas propriedades de bovinos não foi informado o uso de macrolídeos ou lincosamidas para nenhum tipo de infecção, e a presença de cepas resistentes ou carreadoras de genes codificadores de resistência aos MLS poderia estar relacionada à transmissão interespécies, devido à eliminação de resíduos no meio ambiente (seja por água residual ou estrume) produzindo a contaminação ambiental ou por contato direto com indivíduos portadores de microrganismos resistentes (FAO et al., 2016; THANNER; DRISSNER; WALSH, 2016).

Elaborar programas de vigilância epidemiológica para o monitoramento de cepas multirresistentes é uma atividade que deveria ser considerada essencial para as entidades públicas, devido à rápida propagação de cepas resistentes e de genes determinantes de resistência entre indivíduos, e do risco que essa propagação representa para a saúde pública.

Conclusão

A presença de cepas de *Staphylococcus* spp. multirresistentes em leite de vacas e cabras com mastite subclínica representa um importante risco para a saúde pública, devido às doenças veiculadas por alimentos e à transmissão de cepas multirresistentes que podem estar envolvidas com doenças incuráveis. Os resultados obtidos nesse estudo justificam a importância de se realizar o monitoramento de cepas bacterianas resistentes que circulam no ambiente agropecuário no estado de Pernambuco.

Referências

- ALVES, M. DE F. N. F. et al. First report of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* harboring mecC gene in milk samples from cows with mastitis in southeastern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 4, p. 2175–2179, 2020.
- ANDRETTA, M.; CALL, D. R.; NERO, L. A. Insights into antibiotic use in Brazilian dairy production. **International Journal of Dairy Technology**, v. 76, n. 1, 2023.
- ARAGÃO, B. B. et al. Multiresistant zoonotic pathogens isolated from goat milk in Northeastern Brazil. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious**

Diseases, v. 79, n. August, 2021.

BRAKSTAD, O. D. D. G.; AASBAKK, K.; MAELAND, J. A. Detection of *Staphylococcus aureus*_nuc pcr und primer. **Journal of clinical microbiology**, v. 30, n. 7, p. 1654–1660, 1992.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance Standars for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated from Animals**. 5th. ed. USA: Clinical and laboratory Standars Institute, 2020.

DA COSTA, P. M.; LOUREIRO, L.; MATOS, A. J. F. Transfer of multidrug-resistant bacteria between intermingled ecological niches: The interface between humans, animals and the environment. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 10, n. 1, p. 278–294, 2013.

DA SILVA, J. G. et al. Meca positive *Staphylococcus* spp. in bovine mastitis, milkers, milking environment, and the circulation of different MRSA clones at dairy cows farms in the northeast region of Brazil. **Ciencia Rural**, v. 52, n. 3, 2022.

FAO et al. Drivers. Dynamics and Epidemiology of Antimicrobial Resistance in Animal Production. p. 211–219, 2016.

FRANÇA, C. A. et al. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp . from small ruminant mastitis in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 8, p. 747–753, 2012.

GRANADOS-CHINCHILLA, F.; RODRÍGUEZ, C. Tetracyclines in Food and Feedingstuffs : From Regulation to Analytical Methods , Bacterial Resistance , and Environmental and Health Implications. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2017, p. 1315497, 2017.

JENSEN, L. B.; FRIMODT-MØLLER, N.; AARESTRUP, F. M. Presence of erm gene classes in Gram-positive bacteria of animal and human origin in Denmark. **FEMS Microbiology Letters**, v. 170, n. 1, p. 151–158, 1999.

KACZOREK, E. et al. Phenotypic and genotypic antimicrobial susceptibility pattern of *Streptococcus* spp . isolated from cases of clinical mastitis in dairy cattle in Poland. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 8, p. 1–12, 2017.

KYSELKOVÁ, M. et al. Spread of tetracycline resistance genes at a conventional dairy farm. v. 6, n. May, p. 1–14, 2015.

LONCARIC, I. et al. Prevalence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus* sp . (MRS) in Different Companion Animals and Determination of Risk Factors for Colonization with MRS. **Antibiotics**, v. 8, n. 36, p. 1–9, 2019.

LÜTHJE, P.; SCHWARZ, S. Antimicrobial resistance of coagulase-negative staphylococci from bovine subclinical mastitis with particular reference to macrolide-lincosamide resistance phenotypes and genotypes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, n. 5, p. 966–969, 2006.

MORRIS, D. O. et al. Recommendations for approaches to meticillin-resistant staphylococcal infections of small animals: diagnosis, therapeutic considerations and preventative measures.: Clinical Consensus Guidelines of the World Association for Veterinary Dermatology. **Veterinary Dermatology**, v. 28, n. 3, p. 304–329, 2017.

NG, L. K. et al. Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. **Molecular and Cellular Probes**, v. 15, n. 4, p. 209–215, 2001.

- OLIVEIRA, R. P. DE et al. Diversity and emergence of multi - resistant *Staphylococcus* spp . isolated from subclinical mastitis in cows in of the state of Piauí , Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 53, p. 2215–2222, 2022.
- PEREIRA, C. T. M. et al. Microbiology quality, detection of enterotoxin genes and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from milk and Coalho cheese. **Semina:Ciencias Agrarias**, v. 39, n. 5, p. 1957–1968, 2018.
- PÉREZ, V. K. C. et al. Virulence factors and antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 4, p. 2111–2122, 2020.
- PRIYANKA et al. Antibiotic residues in milk- a serious public health hazard. **Journal of Environment and Life Sciences**, v. 2, n. 4, p. 99–102, 2017.
- RABELLO, R. F. et al. Antimicrobial resistance in farm animals in Brazil: An update overview. **Animals**, v. 10, n. 4, p. 1–43, 2020.
- SANTOS, A. D. S. et al. Antimicrobial resistance profile of non-aureus Staphylococci isolates from buffalo, goat and sheep mastitis in the Northeast region of Brazil. **Journal of Dairy Research**, v. 87, n. 3, p. 290–294, 2020.
- SANTOS, A. DA R. DOS; SCHERER, S.; SCHMIDT, V. Validação Da Contagem De Células Somáticas E Do California Mastitis Test Como Método Diagnóstico Da Mamite Subclínica Em Caprinos. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 3, n. 1, p. 50–55, 2004.
- SANTOS, F. F. DOS et al. Presence of mecA-positive multidrug-resistant *Staphylococcus epidermidis* in bovine milk samples in Brazil. **Journal of Dairy Science**, v. 99, p. 1374–1382, 2016.
- SHOME, B. R. et al. Multiplex PCR assay for species identification of bovine mastitis pathogens. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, n. 6, p. 1349–1356, 2011.
- SIQUEIRA, A. K. et al. Genes de enterotoxinas, multirresistência a antimicrobianos e caracterização molecular de espécies de *Staphylococcus* spp. Isoladas de leite bovino orgânico. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 54, n. 1, p. 81–87, 2017.
- STELLA, A. E. et al. Subclinical Bovine Mastitis-Causing Microorganisms In Southwestern Of Goiás State, Brazil. **Veterinária e Zootecnia**, v. 24, n. 4, p. 754–762, 2017.
- STEWART, C. D. et al. Testing for induction of clindamycin resistance in erythromycin-resistant isolates of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1716–1721, 2005.
- TEMPINI, P. N. et al. Multidrug residues and antimicrobial resistance patterns in waste milk from dairy farms in Central California. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 9, p. 8110–8122, 2018.
- THANNER, S.; DRISSNER, D.; WALSH, F. Antimicrobial Resistance in Agriculture. **ASM Journals**, v. 7, n. 2, p. e02227-15, 2016.
- TRUONG-BOLDUC, Q. C. et al. Role of the Tet38 Efflux Pump in *Staphylococcus aureus* Internalization and Survival in Epithelial Cells. **Infection and immunity**, v. 83, n. 11, p. 4362–4372, 2015.
- VIRDIS, S. et al. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase

negative staphylococci isolated from goats with subclinical mastitis. **Veterinary Medicine International**, v. 2010, 2010.

WANG, Y. et al. Macrolide-lincosamide-resistant phenotypes and genotypes of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis. **Veterinary Microbiology**, v. 130, n. 1–2, p. 118–125, 2008.

WENDLANDT, S. et al. The diversity of antimicrobial resistance genes among staphylococci of animal origin. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 303, n. 6–7, p. 338–349, 2013.

WERCKENTHIN, C.; SCHWARZ, S. Molecular analysis of the translational attenuator of a constitutively expressed erm(A) gene from *Staphylococcus intermedius*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 46, n. 5, p. 785–788, 2000.

WONDRACK, L. et al. Clinical strain of *Staphylococcus aureus* inactivates and causes efflux of macrolides. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 4, p. 992–998, 1996.

7. Considerações Finais

- As bactérias da família *Enterobacteriaceae* são agentes ambientais da mastite bovina e caprina, e são encontradas no ambiente, assim como nas fezes e urina. A presença da mastite ambiental produzida por enterobactérias é considerada um risco crítico para a saúde pública, pela presença de cepas potencialmente patogênicas para o ser humano que são capazes de carrear genes de resistência aos antimicrobianos. A grande capacidade das enterobactérias de transferir e receber genes de resistência não unicamente entre espécies do mesmo gênero, mas também entre outros gêneros bacterianos podem produzir infecções incuráveis ou dando origem a um indivíduo como reservatório de genes de resistência.
- Apesar da importância das bactérias da família *Enterobacteriaceae* na saúde pública, os estudos da mastite bovina e caprina produzida por bactérias desta família são escassos. A relevância de estudos genéticos e filogenéticos para realizar um monitoramento em rede é importante pela necessidade urgente de elaborar um sistema de vigilância e políticas públicas para evitar a disseminação de cepas multirresistentes.
- O gênero *Staphylococcus* como causadores de mastite, apesar de ser uma temática já estudada, ainda carece de um constante monitoramento pela capacidade das bactérias de receber genes de resistência, assim como a capacidade de mutações em condições de estresse (presença de antimicrobianos). Desta forma, a vigilância epidemiológica das cepas resistentes e multirresistentes é uma atividade importante para a saúde animal e pública para atualizar os protocolos para evitar uma maior disseminação destas cepas.

8. Anexos

8.1. Anexo A Lista de substâncias proibidas e legislação correspondente (Atualizado em 20/02/2020). MAPA.



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO
SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA
DEPARTAMENTO DE FISCALIZAÇÃO DE INSUMOS PECUÁRIOS

Substâncias proibidas

Substância	Legislação
Organoclorados	Portarias nº 329/1985 e 191/1986
Avoparcina	Of. Circ. DFPA nº 047/1998
Arsenicais e antimoniais	Portaria nº 31, 29/01/2002
Cloranfenicol e Nitrofuranos	IN nº 09, 27/06/2003
Substâncias com efeito tireostático, androgênico, estrogênico, gestagênico e β agonista em aves	IN nº 17, 18/06/2004
Olaquinox	IN nº 11, 24/11/2004
Carbadox	IN nº 35, 14/11/2005
Violeta de Genciana	IN nº 34, 13/09/2007
Anfenicois, tetraciclina, B-Lactâmicos (penicilinas e cefalosporinas), quinolonas e sulfonamidas sistêmicas	IN nº 26, 9/07/2009 (Portaria nº 193/1998)
Substâncias, naturais ou artificiais, com atividade anabolizante hormonal em bovinos de abate	IN nº 55, 01/12/2011
Espiramicina e eritromicina	IN nº 14, 17/05/2012
β -agonista em bovinos	Ato nº 01, 01/11/2012
Colistina (como aditivo melhorador de desempenho)	IN nº 45, 22/11/2016
Tilosina, lincomicina e tiamulina (como aditivo melhorador de desempenho)	IN nº 01, de 13/01/2020

8.2. Anexo B Comprovante de submissão à revista Brazilian Journal of Microbiology.

Brazilian Journal of Microbiology
Occurrence of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in raw milk from cows with subclinical mastitis in northeast Brazil
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Occurrence of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in raw milk from cows with subclinical mastitis in northeast Brazil
Article Type:	Short Communication
Section/Category:	Veterinary Microbiology
Funding Information:	
Abstract:	Extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing Gram negative bacteria are becoming increasingly important in veterinary and human medicine because they can hydrolyze the third generation β -lactams, penicillins, and monobactams. The aim of this study was to identify ESBL-producing Enterobacteriaceae in raw cow milk samples from northeast Brazil. Twenty-six bacterial isolates belonging to the Enterobacteriaceae family were obtained from milk samples from 257 cows with subclinical mastitis. Using microbiological tests, 53.85% (14/26) were identified as Escherichia coli, 15.38% (4/26) as Proteus mirabilis, 26.92% (7/26) as Klebsiella spp., and 3.85% (1/26) as Citrobacter spp. Of all the isolates, 61.54% (16/26) were positive in the ESBL screening test, of which, 12.5% (2/16) were positive in the double-disc synergy test using three types of cephalosporins and amoxicillin/clavulanic acid. The two isolates were identified as Klebsiella spp. Among all the isolates, 53.85% (14/26) tested positive for possessing one or both of the ESBL-encoding genes blaSHV and blaTEM; among these, 71.43% (10/14) were identified as E. coli. This study demonstrates that ESBL-producing bacteria can be found in raw cow milk from northeast Brazil. Cows with subclinical mastitis should be recognized as reservoirs of these strains, which can propagate to humans.
Corresponding Author:	Tania Alexandra Ortega Sierra, M.D. Universidade Federal Rural de Pernambuco Recife, PE BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Universidade Federal Rural de Pernambuco
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Tania Alexandra Ortega Sierra, M.D.
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Tania Alexandra Ortega Sierra, M.D. Atzel Candido Acosta, Ph.D. Renata Pimentel Bandeira de Melo, Ph.D. Pollyanne Raysa Fernandes de Oliveira, M.D. Rodolfo de Moraes Peixoto, Ph.D. Erika Fernanda Torres Samico Fernandes Cavalcanti, Ph.D. José Wilton Pinheiro Junior, Ph.D. Rinaldo Aparecido Mota, Ph.D.
Order of Authors Secondary Information:	
Author Comments:	Cover letter