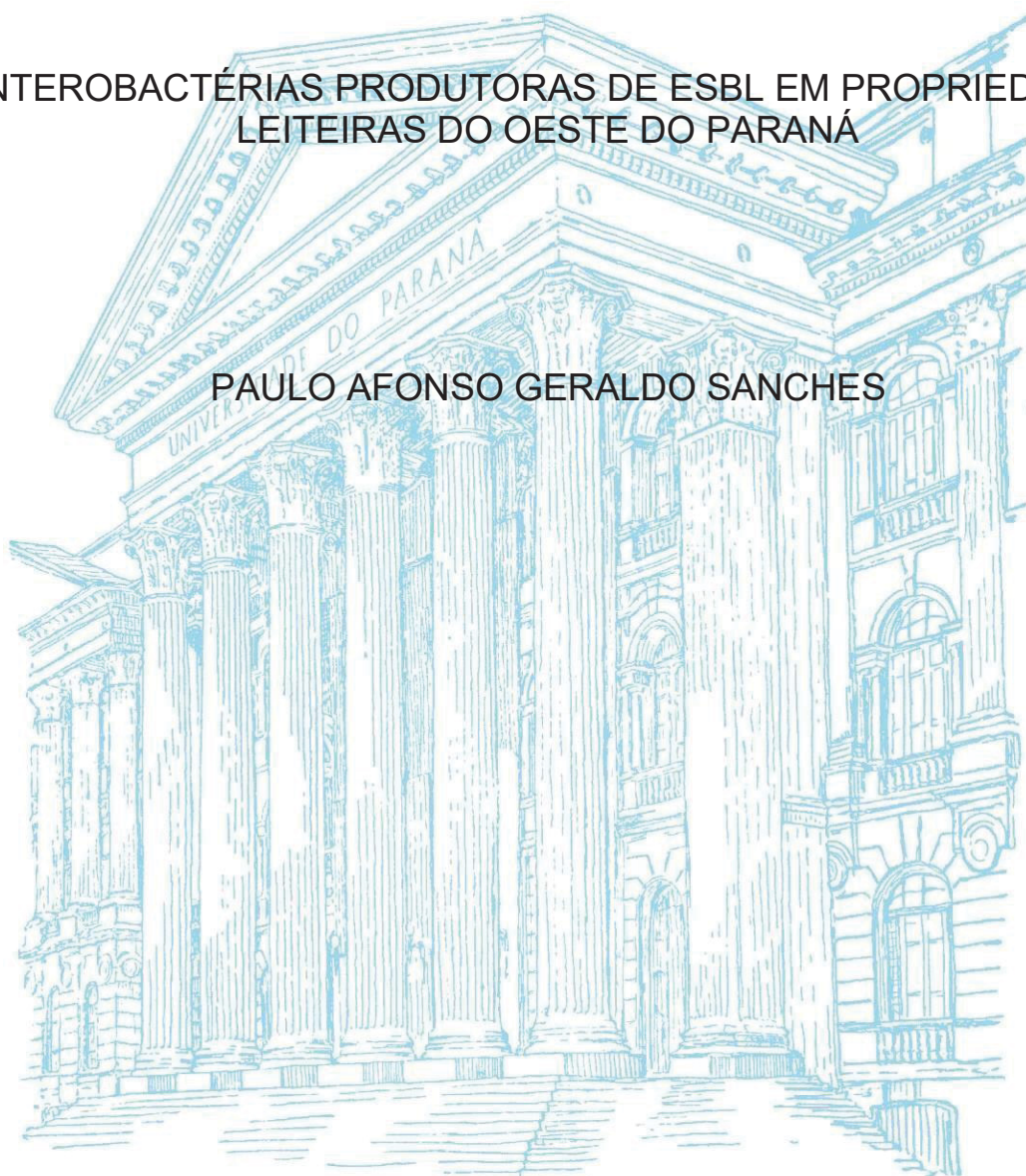


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ENTEROBACTÉRIAS PRODUTORAS DE ESBL EM PROPRIEDADES
LEITEIRAS DO OESTE DO PARANÁ

PAULO AFONSO GERALDO SANCHES



Palotina – PR
2018

PAULO AFONSO GERALDO SANCHES

ENTEROBACTÉRIAS PRODUTORAS DE ESBL EM PROPRIEDADES
LEITEIRAS DO OESTE DO PARANÁ

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração em Saúde Animal, linha de pesquisa em Microbiologia aplicada à Produção Animal, Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Sílvia Cristina Osaki
Co-orientadora: Prof.^a. Dr.^a. Sheila Rezler Wosiacki

PALOTINA - PR
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

S211 Sanches, Paulo Afonso Geraldo
Enterobactérias produtoras de ESBL em propriedades leiteiras do oeste do Paraná / Paulo Afonso Geraldo Sanches – Palotina, 2021.
70f.

Orientadora: Silvia Cristina Osaki
Coorientadora: Sheila Rezler Wosiacki
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal.

1. Bovinos. 2. Sensibilidade fenotípica. 3. Resistência bacteriana. I. Osaki, Silvia Cristina. II. Wosiacki, Sheila Rezler. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

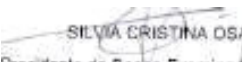
CDU 636.2

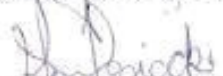


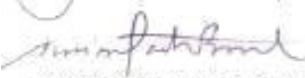
SETOR PALOTINA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIA ANIMAL

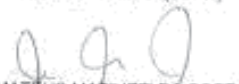
TERM DE ARRIDVA AO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **PAULO AFONSO GERALDO SANCHES** intitulada: **Enterobactérias produtoras de ESKL em propriedades leiteiras do oeste do Paraná**, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito


SILVIA CRISTINA OSAKI
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)


SHEILA REZLER WOSIACKI
Co-orientador - Avaliador Externo: (UEM)


LUCIANO DOS SANTOS BERSOT
Avaliador Interno (UFPR)


MATEUS MATIUZZI DA COSTA
Avaliador Externo (UNIVASF)

AGRADECIMENTOS

Deus, obrigado por ter concedido a mim o dom da vida. Por guiar meus passos, iluminando todo meu caminho e mantendo meu equilíbrio espiritual. E também por me permitir conhecer, viver e aprimorar meus conhecimentos com as seguintes pessoas e instituições:

Agradeço imensamente a realização desse trabalho aos meus pais Edgar e Elizabete por estarem continuamente apoiando, dando estímulo e confiança para desenvolver minha melhor performance. Transmitiram o real valor do amor, humildade para com o próximo e até hoje me orientam no trabalho e projetos de vida. São minhas referências como seres humanos, meus primeiros e eternos professores. Dedico todo esse trabalho a vocês.

Aos meus dois irmãos Edgar e Renan a quem exibio meu total amor, respeito e compartilho todas minhas experiências. Graças a vocês dois, meus parceiros, vivo meus dias com força, perseverança, vencendo o sórdido fingimento.

À Prof.^a Dr^a. Silvia Cristina Osaki, obrigado de coração pela orientação, por toda paciência e dedicação ao projeto. E pela oportunidade de realizar esse trabalho que considero de vanguarda. Desejo imensamente levar sua amizade e ensinamentos para toda vida.

À Prof.^a Dr^a. Sheila Rezler Wosiacki por dispende seu tempo, orientação e colaboração nas etapas e sugestões de trabalho.

À colaboração direta e indireta dos seguintes: Prof. Dr. Nelson Luís Mello Fernandes, Prof. Dr. Luciano dos Santos Bersot, Prof. Dr. Marco Antônio Bacellar Barreiros, Prof^a. Dr^a. Elisabete Takiuchi, Prof^a. Dr^a. Luciana Grange, Prof. Dr. Roberto Rochadelli e aos professores da UFV: Prof. Dr. Luís Augusto Nero e Prof. Dr. Ricardo Seiti Yamatogi.

À minha namorada Jamile que neste tempo juntos me passou confiança, agiu com paciência, compreensão e apoio. O cuidado que exerce comigo me estimula diariamente.

Aos alunos, colegas e profissionais Wellington Augusto Sinhorini, Ricardo Babinski Bregonde, Arielle Lara, Myrian Granemann, Dalton Piasecki, Daniel Royer, Alexandre Herzog que atuaram com grande competência em fases específicas desta pesquisa.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Marthin Luther King)

IDENTIFICAÇÃO DA PROPOSTA

ENTEROBACTÉRIAS PRODUTORAS DE ESBL ENVOLVIDAS EM CASOS DE
MASTITE EM FAZENDAS LEITEIRAS NO PARANÁ.

Equipe

Prof^a Dr^a. Silvia Cristina Osaki (Orientadora)

Prof^a Dr^a. Sheila Wosiaki (Co-orientadora)

Paulo Afonso Geraldo Sanches (Mestrando)

RESUMO

A mastite é a mais prevalente infecção que atinge a produção leiteira, configurando como um quadro clínico de difícil prevenção e controle terapêutico. Porém, esta última prática empregada de forma errônea e a forma como os microrganismos colonizam a glândula mamária, contribuem para o aumento da resistência dos agentes infecciosos a antibióticos, sendo o seu uso apontado como item de seleção no microbioma bacteriano do úbere bovino. O objetivo deste trabalho foi determinar o perfil epidemiológico, molecular e de resistência associados à produção de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) isoladas em Enterobactérias e os fatores de risco para mastite de criatórios de bovinos leiteiros de oito municípios do Oeste do Estado do Paraná. Para tanto, foi aplicado questionário e efetuadas análises de sensibilidade fenotípica para alguns antimicrobianos e também a pesquisa molecular através da reação em cadeia pela polimerase (PCR) da presença dos genes *bla*CTX-M, *bla*SHV, *bla*TEM e *bla*OXA. Amostras de leite, obtidas de resfriadores em 69 propriedades foram coletadas e submetidas à identificação microbiológica por cultura, juntamente com teste de resistência fenotípica. A partir deste último teste, quatro propriedades foram visitadas novamente e o leite das vacas em lactação que se mostraram positivas acima de uma cruz (+) no exame CMT - *California Mastitis Test* foi coletado. Também foram realizados suabes dos tetos, teteiras, mãos e mucosa nasal de manipuladores e, colheita de leite cru do tanque de expansão. Todas essas amostras foram semeadas em ágar screen com ceftriaxona e posteriormente submetidas à extração de DNA e reação de cadeia pela polimerase (PCR) para a detecção dos genes de resistência. Das amostras de leite cru colhidas, 27 amostras, foram sensíveis a pelo menos um antibiótico. Foram identificadas também na pesquisa, 9,90% (11/111) de cepas portadoras do gene *bla*CTX-M, 26,31% (5/19) de *bla*SHV, 3,5% (1/27) *bla*TEM e não foram encontradas amostras positivas para o gene *bla*OXA. No presente estudo foi observado, a partir de cálculo feito pelo *software* Epi info™ 7 que nenhum fator de risco estudado foi significativo.

Palavra – chave: bovinos, sensibilidade fenotípica, resistência bacteriana

ABSTRACT

Mastitis is the most prevalent infection that affects dairy production, configuring a clinical condition of difficult prevention and therapeutic control. However, this last practice is used erroneously and the way in which microorganisms colonize the mammary gland, contribute to the increase in the resistance of infectious agents to antibiotics, and its use is indicated as a selection item in the bacterial microbiome of the bovine udder. The objective of this work was to determine the epidemiological, molecular and resistance profile associated with the production of extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) isolated from Enterobacteriaceae and the risk factors for mastitis in dairy cattle farms in eight municipalities in the west of the state of Paraná. For this purpose, a questionnaire was applied and phenotypic sensitivity analyzes were carried out for some antimicrobials, as well as molecular research through polymerase chain reaction (PCR) for the presence of blaCTX-M, blaSHV, blaTEM and blaOXA genes. Milk samples, obtained from coolers in 69 properties were collected and submitted to microbiological identification by culture, together with phenotypic resistance test. From this last test, four properties were visited again and the milk of the lactating cows that were positive above a cross (+) in the CMT exam - California Mastitis Test was collected. Teat swabs, teat cups, hands and nasal mucosa of handlers were also carried out, and raw milk was collected from the expansion tank. All these samples were seeded on agar screen with ceftriaxone and subsequently subjected to DNA extraction and polymerase chain reaction (PCR) for detection of resistance genes. From the raw milk samples collected, 27 samples were sensitive to at least one antibiotic. The research also identified 9.90% (11/111) of strains carrying the blaCTX-M gene, 26.31% (5/19) of blaSHV, 3.5% (1/27) of blaTEM and no positive samples for the blaOXA gene. In the present study, based on the calculation made using the Epi info™ 7 software, it was observed that no risk factor studied was significant.

Keywords: cattle, phenotypic sensitivity, bacterial resistance

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 – FLUXOGRAMA DE TODAS ETAPAS DE COLHEITA DE AMOSTRA E PROCESSAMENTO DE DADOS DE PROPRIEDADES LEITERAS**26**

FIGURA 02 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE (1,5%) MOSTRANDO OS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DE FRAGMENTO DO GENE *blaCTX-m* POR PCR. A SETA INDICA A POSIÇÃO DO FRAGMENTO ESPERADO NA AMPLIFICAÇÃO (598 pb). 01: MARCADOR MOLECULAR; 5, 8, 11 E 12: AMOSTRAS DE CAMPO POSITIVAS; 2-4, 6, 7, 9, 10, 13-18: AMOSTRAS DE CAMPO NEGATIVAS; 19: CONTROLE NEGATIVO.;.....**37**

FIGURA 03 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE (1,5%) MOSTRANDO OS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DE FRAGMENTO DO GENE *blaCTX-m* POR PCR. A SETA INDICA A POSIÇÃO DO FRAGMENTO ESPERADO NA AMPLIFICAÇÃO (598 pb). 01: MARCADOR MOLECULAR; 2: CONTROLE POSITIVO (AMOSTRA DE CAMPO 63); 4, 11, 13 E 14: AMOSTRAS DE CAMPO POSITIVAS; 3, 5-10, 12, 15, E 16: AMOSTRAS DE CAMPO NEGATIVAS; 17: CONTROLE NEGATIVO**39**

FIGURA 04 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE (1,5%) MOSTRANDO OS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DE FRAGMENTO DO GENE *blaSHV-m* POR PCR. A SETA INDICA A POSIÇÃO DO FRAGMENTO ESPERADO NA AMPLIFICAÇÃO (475pb). 01: MARCADOR MOLECULAR; 4, 9, 15, 18, 19: AMOSTRAS DE CAMPO POSITIVAS.....**40**

FIGURA 05 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE (1,5%) MOSTRANDO OS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DE FRAGMENTO DO GENE *blaTEM* POR PCR. A SETA INDICA A POSIÇÃO DO FRAGMENTO ESPERADO NA AMPLIFICAÇÃO (716pb). 01: MARCADOR MOLECULAR; 9: AMOSTRA DE CAMPO POSITIVA;**41**

LISTA DE TABELAS

TABELA 01. DISTRIBUIÇÃO DAS PROPRIEDADES RURAIS POR MUNICÍPIOS DE COLHEITA NA REGIÃO OESTE DO ESTADO DO PARANÁ PARA ISOLAMENTO DE ENTEBACTERIAS PROVENIENTES DE TANQUES DE EXPANSÃO DE LEITE BOVINO.....	26
TABELA 02. SEQUÊNCIAS DE OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES E TAMANHO DOS PRODUTOS OBTIDOS POR PCR DOS GENES DE RESISTÊNCIA <i>bla</i> CTX-M, <i>bla</i> SHV, <i>bla</i> OXA E <i>bla</i> TEM E REFERÊNCIA	32
TABELA 03 – ETAPAS DA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE PARA DETECÇÃO DOS GENES <i>bla</i> TEM, <i>bla</i> SHV, <i>bla</i> CTX-M, <i>bla</i> OXA.....	32
TABELA 04. OCORRÊNCIA FENOTÍPICA (ESBL) E GENOTÍPICA (GENES) EM ISOLADOS DE TANQUE DE EXPANSÃO NAS PROPRIEDADES RURAIS EM MUNICÍPIOS DA REGIÃO OESTE DO ESTADO DO PARANÁ NO PERÍODO DE JANEIRO A JULHO DE 2016	34
TABELA 05. TRIAGEM E IDENTIFICAÇÃO DAS PROPRIEDADES COM ISOLAMENTO DE <i>ENTEROBACTÉRIAS</i> PRODUTORAS DE ESBL.....	35
TABELA 06. OCORRÊNCIA DO GENE CTX-M ISOLADOS DE DIFERENTES AMOSTRAS EM PROPRIEDADES RURAIS EM MUNICÍPIOS DA REGIÃO OESTE DO ESTADO DO PARANÁ.	39
TABELA 07. DETECÇÃO DO GENE <i>bla</i> SHV ISOLADOS DE DIFERENTES AMOSTRAS BIOLÓGICAS EM PROPRIEDADES RURAIS NOS MUNICÍPIOS ESTUDADOS	43

TABELA 08. OCORRÊNCIA DO GENE <i>bla</i> TEM EM ISOLADOS DE DIFERENTES AMOSTRAS BIOLÓGICAS EM PROPRIEDADES RURAIS NOS MUNICÍPIOS PESQUISADOS	45
---	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

CMT - *California Mastite Test*

PIB – Produto Interno Produto

ESBL - *Extended Spectrum β -lactamases*

DNA - *Deoxyribonucleic Acid*

BHI – *Brain heart Infusion*

TBE - Tris/Borato/EDTA

CLSI - *Clinical & Laboratory Standards Institute*

pb – Pares de Base

°C - Graus Celsius

rpm – Rotações por minuto

pH - Potencial hidrogeniônico

blaCTX-M - cefotaxima enzima-Munique

blaTEM, blaOXA, blaSHV

LISTA DE SÍMBOLOS

♥ - copyright

@ - arroba

® - marca registrada

β - Beta

μL - Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 OBJETIVOS	18
1.1.2 Objetivo Geral	18
1.1.3 Objetivos Específicos	18
2. REVISÃO DE LITERATURA.	20
2.1 MASTITE BOVINA	20
2.2 FAMÍLIA <i>Enterobacteriaceae</i>	21
2.3 RESISTÊNCIA BACTERIANA.....	23
3 MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 COMITÊ DE ÉTICA.....	26
3.2 SELEÇÃO DAS PROPRIEDADES E AMOSTRAGEM.....	26
3.3 PRIMEIRA ETAPA DE COLHEITA E ANÁLISES DE AMOSTRAS.....	27
3.3.1 Cultivo Microbiológico	28
3.3.2 Teste de Sensibilidade Antimicrobiana.....	28
3.3.3 Extração de DNA.....	29
3.3.4 Reação em Cadeia pela Polimerase	29
3.3.5 Questionário Epidemiológico.....	30
3.4 SEGUNDA ETAPA DE COLHEITA E ANÁLISES	30
3.4.1 Seleção das Propriedades	30
3.4.2 Triagem Utilizando CMT (<i>California Mastitis Test</i>)	31
3.4.3 Cultivo Microbiológico	32
3.4.4 Ágar Screening com Ceftriaxona.....	32
3.4.5 Extração de DNA.....	32
3.4.6 Reação em Cadeia Pela Polimerase.....	32
3.4.7. Análise do Questionário	37
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
4.1 DETECÇÃO FENOTÍPICA DE ESBL E REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE	35
4.1.1 Teste de Sensibilidade a Antibióticos Por Disco Difusão	35
4.1.2 Detecção de Perfil Genético de Resistência.....	38
4.1.2.1 Gene blaCTX-M	38
4.1.2.2 Gene blaSHV.	42
4.1.2.3 Gene blaTEM	45

4.1.2.4 Gene blaOXA	47
5. CONCLUSÕES	49
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	50
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
ANEXO 1 - RESULTADOS DA TRIAGEM A PARTIR DE TESTE GENOTÍPICO (PCR) DAS AMOSTRAS DE LEITE DO TANQUE DE EXPANSÃO, PROVENIENTES DAS PROPRIEDADES DO OESTE DO PARANÁ. P= AMOSTRAS POSITIVAS E N= AMOSTRAS NEGATIVAS	56
ANEXO 2 – QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO.....	57

1. INTRODUÇÃO

O crescimento da bovinocultura leiteira na última década deu-se de forma exponencial, atingindo valores de 2,7% ao ano em todo o mundo e 4,2% no Brasil (FAO, 2013). Segundo dados do IBGE, a produção brasileira em 2017 alcançou valores de 24,12 bilhões de litros de leite (IBGE, 2018)

O sistema agroindustrial leiteiro, devido à sua enorme relevância social, é um dos setores mais significantes do país. A atividade é praticada em todo o território nacional em mais de um milhão de propriedades rurais, e somente na produção primária gera acima de três milhões de empregos e agrega mais de R\$ 6 bilhões ao valor da produção agropecuária nacional. Três importantes fatores marcaram o setor leiteiro nacional, principalmente na última década: o aumento da produção, a redução do número de produtores e o decréscimo dos preços recebidos (VILELA et al., 2002).

A atividade leiteira no Paraná tem parcela expressiva não só no PIB agropecuário como segundo maior produtor do país, mas também representa item social como única fonte de renda para famílias rurais (IBGE, 2015). Porém, nota-se ainda uma cadeia produtiva de leite carente de gestão, incentivo e orientação técnica, para estimular os produtores a continuarem se desenvolvendo na atividade (ROSSI et al., 2018)

A medicina veterinária evoluiu de um perfil focado em diagnóstico para um perfil voltado ao tratamento, identificando-se assim a resolução de muitas moléstias. No entanto, após a chegada massiva dos antimicrobianos à produção animal, pouco tempo se levou até que a resistência bacteriana culminasse na redução da eficácia terapêutica (PAPHITOU, 2013). A seleção de bactérias multirresistentes é justificada pela utilização excessiva destas substâncias além de um dos problemas de saúde pública mais graves atualmente (LOUREIRO, et. al., 2016).

Os agentes etiológicos da mastite estão segregados conforme as fontes de infecção e as vias de transmissão, e classificados como contagiosos ou ambientais (RADOSTITS, 2002; LANGONI, 2013). No primeiro caso, a etiologia da infecção é causada por patógenos encontrados na pele e mucosas. Já o tipo ambiental causado por microrganismos do próprio ambiente onde estão alojados, e instalações

que os animais são manejados. Sendo que ambas formas de transmissão podem manifestar quadros clínicos ou subclínicos (LANGONI, 2013).

Os agravos causados pela mastite justificam-se porque há estimativa no rebanho brasileiro de uma prevalência de 20% a 38% desta doença, corroborando perda da produção entre 12 a 15%, portanto um dos prejuízos econômicos mais significativos na indústria leiteira. Necessita haver inclusão de gastos com medicamentos, leite descartado, serviços veterinários, descarte prematuro e a diminuição do valor comercial dos animais (FONSECA & SANTOS, 2000; REIS et al., 2005).

Em quase a sua totalidade, os casos de mastite são tratados empiricamente, sem fazer uso de testes diagnósticos para real identificação da etiologia da doença e fármaco de escolha. Pelo fato do órgão responsável por controlar o comércio de medicamentos não ser efetivo, existe o acesso fácil e indiscriminado por parte dos produtores rurais que agrava a resistência de algumas cepas a antimicrobianos. A grande exigência das empresas do setor lácteo imposta aos produtores de leite com penalizações e a não captação do leite fraudado, é de suma importância para produzir matéria-prima livre de resíduos (RANGEL, 2007).

O Brasil, no ano de 2010, figurou entre os três países do mundo que dentro da produção animal, obtiveram a maior aplicação de antimicrobianos (VAN BOECKEL et al., 2015). Para a secagem de vacas em lactação ou administração errônea em quadros de mastites, o uso desses princípios ativos faz com que genes de resistência se mantenham em atividade, além de forçar sua seleção. O componente genético também pode ser transferido para bactérias ambientais e fornecer genes de resistência quando há constatação de moléculas residuais destas substâncias. (WEDLEY et al., 2011).

O fato de bactérias adquirirem resistência a antimicrobianos pode ser uma consequência natural das várias espécies ou ser adquirida por cepas individuais dentro de uma população sensível. As ESBLs são frequentemente localizadas em plasmídeos que são transferíveis de uma estirpe para outra e entre espécies bacterianas. Além do gene das ESBLs, a maioria destes plasmídeos também transmite outros genes resistentes a vários antibióticos beta-lactâmicos e não-beta-lactâmicos (TODAR, 2011)

Ao caracterizar a resistência genotípica e fenotípica das enterobactérias frente aos antimicrobianos, uma evolução nas formas de tratamento empírico pode

ser observada. Servindo também como base para orientação técnica, o perfil epidemiológico buscado tende a ser bem distinto devido às diversas fontes de colheita. É necessário e se faz relevante salientar que não há comprovações concretas de que terapias antimicrobianas bem aplicadas possam corroborar com o aumento da prevalência de cepas resistentes (ERSKINE *et al.*, 2002). Portanto os isolados de mastites subclínicas podem ser encontrados em menor número em relação aos de mastites clínicas, pelo fato do primeiro não ser tratado rotineiramente. Em contrapartida, a resistência antimicrobiana pode ser menor em isolados de mastites subclínicas do que em isolados oriundos de mastites clínicas devido ao fato de casos subclínicos não serem tratados comumente (BAL *et al.*, 2010).

É qualificado como um quadro de urgência clínica as ESBL entre os membros da família Enterobacteriaceae, além de estarem bem difundidas pelo território brasileiro e se fazendo presente em diversos patógenos. Alguns estados até então não relataram a presença de ESBL, visto que não há um programa nacional de vigilância que abranja resistência microbiana. Na Saúde Pública também é emergente quando se constata que o relato de ESBL em *Klebsiella* spp. e *Escherichia coli* nosocomiais é corriqueiro, principalmente as do grupo CTX-M (cefotaxima enzima-Munich) (SILVA *et al.*, 2012). A transmissão por alimentos pode ser a principal rota para a aquisição humana de bactérias entéricas resistentes ou com potencial para transmitir genes de resistência (Vieira *et al.* 2011). Podendo, portanto figurar o leite como um potencial veículo de microrganismos patogênicos resistentes, principalmente para antimicrobianos utilizados em medicina humana.

Existem argumentos contundentes que o uso de antimicrobianos em animais de produção acabe por consequência afetando a medicina humana (KARP e ENGBERG, 2004). A informação genética de microrganismos pode ser transferida entre suas diferentes espécies e isso está muito fundamentado, uma vez que isolados de humanos e animais contém semelhanças genotípicas (VAN LOO *et al.*, 2007; WANNAPRASAT *et al.*, 2011; GUENTHER *et al.*, 2010; GUENTHER *et al.*, 2012; GANDOLFI-DECRISTOPHORIS *et al.*, 2013)

Diversas atividades humanas, que incluem o uso de antibiótico, como na clínica veterinária, pecuária e aquicultura, bem como outras aplicações de AB e eliminação de resíduos, formam grandes reservatórios de resistência no ambiente

(DOYLE, 2006) e, muito provavelmente, de genes de virulência e dos organismos que os detêm (MOURA, HENRIQUES, SMALLA & CORREIA, 2010).

Segundo Vieira et al. (2011) o contato direto e a via alimentar são vias importantes na transmissão animal para humano, de bactérias patogênicas e comensais resistentes aos antimicrobianos, demonstrando a importância para a Saúde Pública.

Ainda que seja comprovado o destaque Paranaense na produção leiteira e o foco dado à mastite para a cadeia de lácteos e para a indústria de alimentos, os estudos com avaliações de distribuição e frequência de ocorrência de resistência causada por β -lactamases são escassos.

1.2. OBJETIVOS

1.2.2 Objetivo Geral

Determinar o perfil epidemiológico, molecular e de resistência pela detecção de genes associados às cepas produtoras de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) em enterobactérias isoladas de criatórios de bovinos leiteiros no Oeste do Estado do Paraná.

1.2.3 Objetivos Específicos

- Isolar e avaliar a distribuição de cepas de enterobactérias produtoras de ESBL em 69 propriedades leiteiras de oito municípios do Oeste do Paraná.
- Isolar e avaliar a distribuição de cepas de enterobactérias produtoras de ESBL em leite, *swab* de teteiras e teto de vacas em lactação, com mastite subclínica e clínica, e *swab* de mão e fossa nasal de manipuladores destes animais em quatro propriedades leiteiras do Oeste do Paraná.

- Pesquisar a presença das cepas CTX-M (gene *bla_{ctx-m}*), OXA (gene *bla_{oxa}*), TEM (gene *bla_{tem}*) e SHV (gene *bla_{shv}* que infectam quartos mamários de vacas em lactação.
- Identificar se há fatores de risco associados aos genes de resistência

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MASTITE BOVINA AMBIENTAL

Uma das enfermidades mais onerosas para o produtor de leite é a mastite, cuja manifestação se dá por inúmeras razões e assim culminam com a inflamação da glândula mamária. Por sua vez, há consequente queda de produção ocasionando descarte de leite ao administrar medicamentos para o tratamento do quadro clínico e também por alterações sensoriais apresentadas (DALANEZI et al., 2016)

Caracterizando a mastite ambiental pelo fato do reservatório do patógeno estar localizado no próprio ambiente das vacas leiteiras, as enterobactérias são as encontradas com mais frequência e causam a maioria dos casos de mastite clínica (RANGEL, 2007; OLIVEIRA et al., 2016). Durante o período seco, quando vacas estão fora da lactação, e logo após o parto geralmente aparecem mais casos de mastite por *E. coli*. Na maioria das vezes são transitórias levando a episódios clínicos agudos ou superagudos, resultando alguns deles em óbito (BURVENICH et al., 2003; HOGAN & LARRY SMITH, 2003; BANSAL et al., 2005). Em outros países e também no Brasil, existe atualmente maior cuidado para casos subclínicos de mastite bovina por enterobactérias. Uma hipótese é de que esta mastite está vinculada a criações com bom controle de mastite contagiosa, gerando infecções constantes e persistentes em glândula mamária, tanto em animais lactentes quanto em período seco (DÖPFER et al., 1999; RADOSTITS et al., 2000).

Os microrganismos ambientais, até então, não são considerados como colonizadores do microbioma da glândula mamária. Porém causam mastite devido à contaminação ambiental, do conjunto de teteiras, do equipamento de ordenha, parte externo dos tetos ou úbere, permitindo então que acessem o canal do teto e chegando à cisterna da glândula. Alguns agentes ambientais são: mais frequentes *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, leveduras, algas e fungos (Langoni et al. 2011).

Glândulas acometidas ficam disfuncionais na produção de leite, por ser constatada destruição irreversível do parênquima, com fibrose e microabscessos que encapsulam o microrganismo dificultando ação de defesa do úbere, impedindo neutrófilos de fazer fagocitose (RIBEIRO, 2016).

2.2 FAMÍLIA *Enterobacteriaceae*

Agentes gram-negativos de origem ambiental que afetam os quartos mamários e que têm grande potencial de produção de ESBL são pertencentes à família *Enterobacteriaceae*. Apresentam-se em forma de bacilos, medindo em geral 0,3-1,8µm, podendo ser imóveis ou móveis. *E. coli* é um exemplo clássico de microrganismo pertencente a esta família, comensal do trato gastrointestinal como microbiota normal em humanos e animais (RYU et al., 2012; WU et al., 2013). Este bacilo detém habilidade para obtenção e disseminação de genes de resistência a antibióticos (BLANC, et al., 2006; BUTAYE et al., 2014). Um dos mecanismos de resistência mais estudados atualmente é baseado no plasmídeo mediado, com produção de β -lactamases de espectro estendido (ESBL) (ZURFLUH et al., 2013; NJAGE e BUYS, 2015).

Das principais enterobactérias oportunistas e patogênicas ao úbere, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* são as mais encontradas. Fezes, água, solo, aparas e outras sujidades do ambiente são responsáveis por carrear essas bactérias e contaminar o canal do teto (RADOSTITS et al., 2007). Alguns resultados demonstram que após infecções intramamárias causadas por *Escherichia coli*, houve uma elevada proliferação de enterobactérias no microbioma glandular, durando aproximadamente 12 dias. (SCHUKKEN et. al, 2017).

As formas de infecção ocorrem por diferentes vias e em qualquer fase da vida do animal, mas as principais são as seguintes: pelo canal do teto, durante ordenha, período entre ordenhas e período seco (RADOSTITS et al., 2007). Os patógenos da família *Enterobacteriaceae* isolados de forma constante em quadros de mastite clínica em bovinos leiteiros são *E. coli*, *Klebsiella* spp., seguidos por *Serratia* spp. e *Enterobacter* spp. (LOCATELLI et al. 2010). Os casos em que *K. pneumoniae* está envolvida são devido ao ambiente dos animais permanecer contaminado (WENZ et al., 2001; SAPIMON et al., 2006), com contínuo contato das vacas no período entre ordenhas com matéria orgânica e esterco mal manejados (MUNOZ et al., 2006).

Em estudo relacionado à gênese da mastite em Minas Gerais, prevalência significativa de microrganismos ambientais, como *E.coli*, foi observada em 13,51% dos isolados. Relatando também que a possibilidade de mastite clínica ser maior

que 5% no rebanho, era 12 vezes maior em propriedades que não adotavam medidas higiênicas no ambiente das vacas (DA CUNHA et al., 2016). Em outro estudo epidemiológico, na região central do Paraná identificou-se etiologia e prevalência de Bacilos gram-negativos em 7,7% das amostras de mastite coletadas (BITTAR SAAD, et. al., 2014)

No ambiente onde se produz o leite, é comum a permanência desses microrganismos, posto que estão presentes como microbiota comensal no intestino dos bovinos (MUNOZ et al., 2008). Um exemplo de bactéria reconhecidamente patogênica ao homem e animais e está naturalmente distribuída em uma gama considerável de ambientes são da espécie *Enterobacter*. Animais vertebrados e invertebrados albergam esse microrganismo, além do solo, água, indústria alimentícia e vegetação (COONEY et al. 2011). Possuem também a mesma capacidade da *Klebsiella* spp. na contaminação de instrumentos médicos e soluções para administração parenteral. Muitas espécies de *Enterobacter* são isoladas de moscas, grãos, bebidas fermentadas e leite UHT (MARTINEZ; TRABULSI, 2008).

Os fatores de virulência que favorecem o estabelecimento e acentuam os sinais clínicos de Enterobactérias são os antígenos. O antígeno capsular K são polissacarídeos da cápsula que confere resistência bacteriana diante do sistema complemento. Este elemento antigênico é um componente bacteriano que representa reduzida patogenicidade, sendo facilmente eliminada quando submetida à temperatura de 100°C por uma hora (FERREIRA & KNÖBL, 2009). Antígenos flagelares H são proteínas não utilizadas usualmente na identificação antigênica das cepas de *E. coli*, e a presença deste flagelo não tem relevante relação com sua patogenicidade (ANDREATTI FILHO, 2007; FERREIRA & KNÖBL, 2009). Os antígenos F, conhecidos também como adesinas, píli ou fímbrias, são moléculas proteicas que preenchem a superfície bacteriana, com função de reconhecer receptores específicos na superfície de células eucarióticas. A expressão de fímbrias é considerada um fator de virulência importante para aderência e multiplicação no organismo invadido, conferindo predileção da bactéria a determinados tecidos e órgãos do hospedeiro. Apesar dessas adesinas apresentarem poucas diferenças morfológicas, existem características antigênicas e hemaglutinantes distintas (FERREIRA & KNÖBL, 2009).

Desde o final dos anos 80, as β -lactamases do tipo Cefotaxima-Munique (CTX-M) se desenvolvem e atingiram atualmente o patamar das enzimas mais

prevalente em todo o mundo (EWERS et al., 2012). Um vasto número de diferentes produtoras de ESBL foi descrito na literatura, incluindo Temoniera mediada por plasmídeos (TEM) e sulfidrilas lactamases variáveis (SHV), que já figuravam entre as mais frequentemente encontradas entre as enterobactérias desde a década de 1970. (D'ANDREA et al., 2013).

Fungos, algas e enterobactérias figuram como os agentes mais frequentemente encontrados na gênese das mastites de origem ambiental (RIBEIRO et al., 2008, YAMAMURA et al., 2007). No período entre as ordenhas, em que os animais acessam locais com excesso de dejetos, água e matéria orgânica, ocorre a infecção da glândula mamária por esses microrganismos (RIBEIRO et al., 2006).

Relatos de infecções clínicas por estirpes produtoras de ESBL em animais, e particularmente as espécies produtoras de alimentos são ainda escassos. Em estudo, Locatelli et al. (2010) relataram a produção de CTX-M-1 a partir de isolados de *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* e também por cepas de *E. coli* de quadros confirmados de mastite bovina na Itália. *Klebsiella* é geralmente referida como particularmente agressiva e propensa a causar mastite clínica severa, respondendo mal ao tratamento e é provável que venha a culminar um desfecho fatal (ERSKINE et al., 2002; MUNOZ et al., 2007).

2.3 RESISTÊNCIA BACTERIANA

As cefalosporinas de terceira geração foram criadas com objetivo de eliminar esses agentes produtores de beta-lactamase. As beta-lactamases são enzimas produzidas pelos microrganismos com função de inibir a ação de antimicrobianos da classe beta-lactâmicos (BAL et al., 2010; BARGUIGUA et al., 2013). A atividade catalítica destas enzimas baseia-se na anulação do anel beta-lactâmico do princípio ativo.

Até estes novos antimicrobianos já estão sendo hidrolisados por uma categoria de enzimas recentemente descrita. São as chamadas beta-lactamases de espectro estendido ou espectro ampliado (ESBL), que são originadas a partir das beta-lactamases convencionais. É nos plasmídeos onde são encontrados os genes que as codificam, sendo que os principais para as ESBL do tipo CTX-M (gene *blactx-m*), TEM (*blatem*), e SHV (*blashv*) (PATERSON et al., 2003; JEMINA e VERGHESE, 2008).

Elementos genéticos móveis como integrons, plasmídeos e transposons albergam genes que são capazes de codificar ESBL com frequência e também carregam genes resistentes a outras categorias de antibióticos. Sendo assim, o estudo e isolamento de bactérias produtoras de ESBL multirresistentes é a causa substancial de falhas terapêuticas, corroborando com a elevação de morbidade e mortalidade por infecções. Em contrapartida, a utilização massiva de antimicrobianos em animais de produção auxilia na pressão de seleção de enterobactérias ESBL produtoras. Tudo isso leva a um potencial risco para o ser humano e animais pelo contato direto (ordenhadores e manejadores), consumo de alimentos contaminados e possível instalação no ambiente. (SILVA & LINCOPAN, 2012). A manifestação de formas bacterianas apresentando resistência às drogas de comum utilização em humanos acarreta aumento de multirresistência a drogas, por parte dos microrganismos. E os elementos móveis favorecem a disseminação destes genes pelo ambiente, solo e água permitindo maior sobrevivência do agente (ALTHERTUM, 2015)

Por conceito, qualquer cepa considerada produtora de ESBL é resistente às penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos, porém devem ser sensíveis à associação com clavulanato (PEIRANO et al., 2011).

Atualmente, de todas as variantes de ESBL conhecidas, a maioria são codificadas por genes plasmidiais e as mais identificadas rotineiramente são TEM, SHV, OXA e CTX-M (MINARINI et al., 2007; PEIRANO et al., 2011; LAGO et al., 2010).

Dentre as mais de 600 variantes de ESBL descobertas até o momento, mais de 100 são do tipo CTX-M. As enzimas até agora relatadas podem ser agrupadas em cinco subgrupos principais de acordo com a sua sequência de aminoácidos (grupo 1: CTX-M-1, grupo 2: CTX-M-2, grupo 8: CTXM-8, grupo 9: CTX-M-9 e grupo 25: CTX-M-25) (GESER et al., 2012). Os tipos CTX-M de β -lactamases é o grupo de genes mais dominante de ESBLs em *E. coli*, com subtipos particulares associados a diferentes regiões geográficas (WU et al., 2013). Em outros países como o Canadá, a administração de antimicrobianos beta-lactâmicos é usual na produção leiteira. Um exemplo é o emprego de penicilinas, cefalosporinas, lincosamidas e macrolídeos que são administrados como bisnagas intramamárias não só no período de lactação,

mas também no período seco como terapia e profilaxia da mastite bovina (SAINI et al., 2012b).

Muitas teorias sobre a forma de dispersão de *E. coli* CTX-M são descritas, por exemplo em uma unidade de produção pode ocorrer contaminação fecal dentro do rebanho criado em alta densidade, em consequência levar contaminação para os produtos derivados desses animais durante o processamento desses alimentos (HORTON et al., 2011). Consequentemente, sem boas práticas de higiene, os alimentos podem atuar como um veículo de transferência de bactérias resistentes a β -lactâmicos para o trato gastrointestinal dos consumidores (GUNDOGAN e AVCI, 2013).

Como uma questão que está em crescente preocupação, a resistência causada por ESBLs é frequentemente associada à resistência a outras classes de antimicrobianos como fluoroquinolonas, aminoglicosídeos e trimetoprim/sulfametoxazol (GESER et al., 2012). As ESBLs afetam também a Saúde Pública estando frequentemente associadas a infecções urinárias, pneumonias, septicemias, bacteremias e meningites, entre outras moléstias (BOCHIA et al., 2001; ZAR et al., 2002).

Nas enterobactérias, a estrutura termorresistente que se projeta da membrana externa para o meio extracelular corresponde ao lipopolissacarídeo (LPS) e denomina-se antígeno somático O. O lipídeo A (endotoxina), componente do LPS, é liberado durante a multiplicação ou após a morte da bactéria, atua na ativação de macrófagos e de mediadores da inflamação (FERREIRA & KNÖBL, 2009).

As origens de boa parte das ESBLs conhecidas são das primeiras β -lactamases tipo TEM-1, TEM-2, e SHV-115 contendo mínimas diferenças na sequência de aminoácidos (SCHWABER, 2003).

Plasmídeos, transposons e integrons são estruturas móveis que fazem a troca de genes de resistência, e colaboram muito com a ampla distribuição das beta-lactamases (WELDAGHEN, 2004).

Outras enzimas que interferem na ação de beta-lactâmicos são as carbapenemases. São beta-lactamases que agem por hidrolisar as carbapenemas, drogas de escolha para combater enterobactérias produtoras de ESBLs (BOUCHILLON et al., 2013). Uma consequência desse quadro é a ineficiência no tratamento das infecções causadas por esses microrganismos já resistentes por haver seleção de bactérias produtoras de carbapenemases (AVLAMI et al., 2010).

Três grandes grupos de carbapenemases são conhecidos de acordo com a classificação estrutural de Ambler: Ambler classe A; Ambler classe B ou metallo- β -lactamases e Ambler classe D produtoras de oxacilinases (tipo OXA-, principalmente a OXA-48 e OXA-23) (PEIRANO *et al.*, 2009).

Além das ESBL, essa classe de enzimas possui outros mecanismos de inibição dos antimicrobianos, originando um perfil de co-resistência composto. Além disso, não há teste de inibição apropriado para detecção do gene *bla*OXA produtores em razão de suas enzimas de resistência não serem inibidas por ácido clavulânico, tazobactam, sulbactam ou qualquer outro quelante de zinco (HUANG *et al.*, 2014).

Quando há infecções comprovadamente causadas por produtores de ESBL, há simultaneamente a inativação de grande parte das penicilinas, cefalosporinas de primeira à quarta geração, monobactâmico e as associações dos inibidores de β -lactamase (WOLLHEIM, 2014).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COMITÊ DE ÉTICA

O Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos setor de Ciências da Saúde (SD – UFPR) e o Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA – UFPR Palotina) aprovaram o projeto realizado com parecer respectivamente CEP/SD – PB nº 1654362 e protocolo nº 34/2015.

3.2 SELEÇÃO DAS PROPRIEDADES E AMOSTRAGEM

Sessenta e nove propriedades foram selecionadas a partir de cálculo proporcional dos oito municípios escolhidos e contidos nas Microrregiões de Cascavel-PR, Toledo-PR e Foz do Iguaçu-PR (Cascavel, Céu Azul, Marechal Cândido Rondon, Palotina, Santa Tereza do Oeste, Toledo, Vera Cruz do Oeste, São Pedro do Iguaçu). E para isso, propriedades foram escolhidas de acordo com o conhecimento já existente de cada produtor através de indicações de Médicos Veterinários que prestam assistência nestas localidades (Tabela 1).

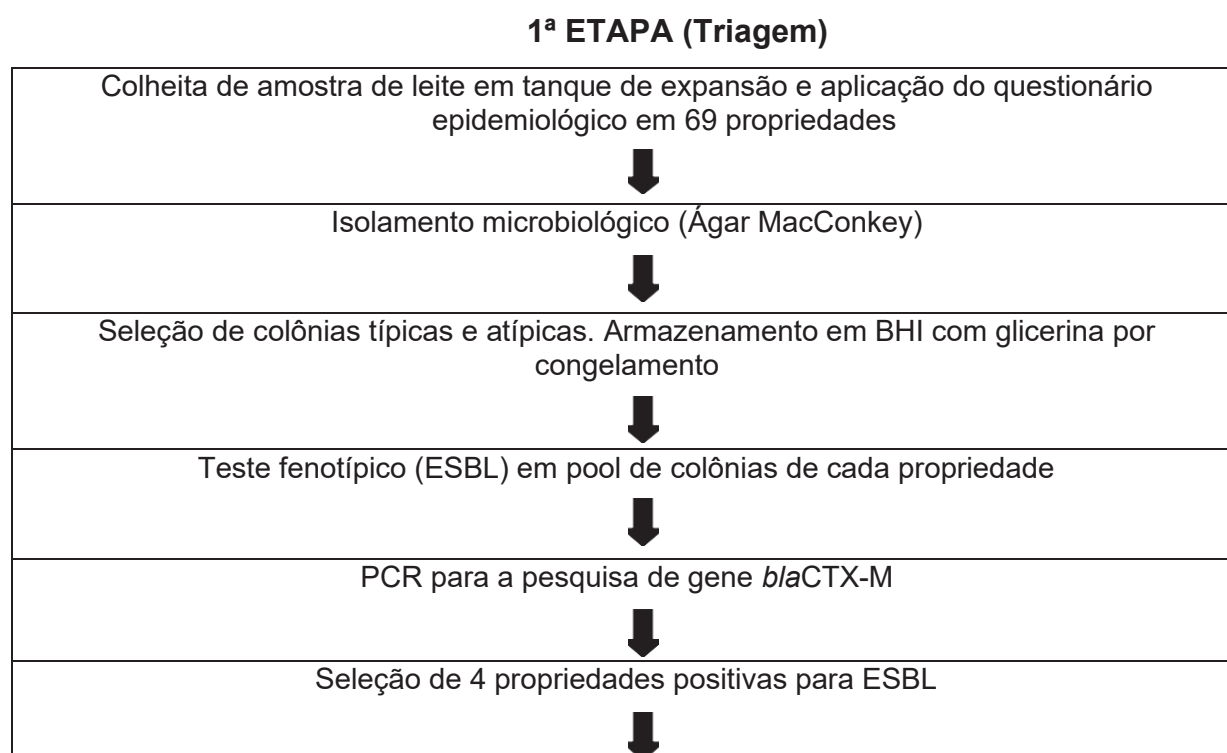
Tabela 1. DISTRIBUIÇÃO DAS PROPRIEDADES RURAIS POR MUNICÍPIOS DE COLHEITA NA REGIÃO OESTE DO ESTADO DO PARANÁ PARA ISOLAMENTO DE ENTEROBACTERIAS PROVENIENTES DE TANQUES DE EXPANSÃO DE LEITE BOVINO.

Município	Nº de propriedades
Cascavel	4
Céu Azul	1
Marechal Cândido Rondon	17
Palotina	18
Santa Tereza do Oeste	13
São Pedro do Iguaçu	3
Toledo	7
Vera Cruz do Oeste	6
Total	69

3.3 PRIMEIRA ETAPA DE COLHEITA E ANÁLISES DE AMOSTRAS

Nessa etapa foi realizada uma triagem a partir da colheita das amostras de tanques resfriadores de leite em tubos Falcon® esterilizados. As amostras foram armazenadas refrigeradas em caixa de isopor com gelo, sendo encaminhadas ao LACOMA – Laboratório de controle microbiológico de água e alimento, onde foram realizadas as análises específicas para isolamento de enterobactérias seguido de testes fenotípicos para caracterizar a produção de ESBL. A figura 1 sumariza as etapas realizadas.

Figura 1. FLUXOGRAMA DA ETAPA 1 DE COLHEITA DE AMOSTRA E PROCESSAMENTO DE DADOS DE PROPRIEDADES LEITERAS.



3.3.1 Cultivo Microbiológico

Alíquotas do leite colhido foram semeadas com auxílio de alças de *Drigalski*, utilizando um inóculo de 100 µL em placas de petri contendo Ágar MacConkey, e incubadas a 37°C, sendo o crescimento bacteriano avaliado após 24 e 48 horas. As colônias com crescimento característico neste ágar foram avaliadas para a produção de ESBL.

Como parâmetros de controle em todos os métodos microbiológicos foram utilizados controles positivos ATCC 8739 (*E.coli*) e controle negativo ATCC 25923 (*S. aureus*).

3.3.2 Detecção Fenotípica de ESBL

As estirpes de enterobactérias isoladas no cultivo microbiológico foram submetidas ao teste de sensibilidade antimicrobiana pela técnica de difusão em

disco descrita por Bauer et al. (1966). Colônias com crescimento de 18 a 24 horas em ágar nutriente foram inoculadas em tubos estéreis contendo solução salina (5%), comparando-se o grau de turvamento com a escala 0,5 de MacFarland. Em seguida, com o auxílio de um *swab*, a solução foi semeada na superfície de placas de Petri com ágar Mueller Hinton e logo após, colocados os seguintes discos de antimicrobianos: amoxicilina com clavulonato (no centro) e aztreonam, ceftriaxona, cefotaxima, ceftazidima e cefepima (ao redor). A leitura dos resultados com 24 horas foi realizada segundo Souza Júnior (2004). As estirpes bacterianas consideradas produtoras de ESBL e ampC foram testadas pelo e comparadas com os padrões do CLSI (2013) e CLSI (2014).

3.3.3 Extração de DNA

Após o isolamento microbiológico as colônias ficaram armazenadas em cada microtubo com BHI adicionados de 150-200 µL de glicerol, previamente autoclavado, homogeneizados e então armazenados em *freezer* a temperatura de -20 °C. Para a extração de DNA foi utilizado um *pool* das cepas isoladas de cada propriedade, onde de cada cepa foram utilizados 10 µL do armazenado, este *pool* foi adicionado em 3 mL de caldo BHI (Caldo de Infusão de Cérebro e Coração) e incubado em estufa a 36°C overnight.

O procedimento para a extração de DNA foi realizado de acordo com o protocolo descrito por PERES et al. (2010), utilizando o método de lise térmica com adaptações: foram transferidos 400 µL de cultura *overnight* em BHI, para microtubos estéreis e adicionados 300 µL de Etanol 70°. As amostras foram centrifugadas a 4.000 rpm durante cinco minutos, sendo o sobrenadante descartado e o *pellet* diluído em 100 µL de água ultrapura autoclavada (pH 7,8) com auxílio da micropipeta. Posteriormente foi incubado a 99-100°C por 10 minutos em banho úmido e submetido a uma centrifugação por 10 minutos a 10.000 rpm. Para finalizar, armazenou-se o sobrenadante em microtubo novo mantido a -20°C para posterior uso.

3.3.4 Reação em Cadeia Pela Polimerase Para o Gene *bla*CTX-M

O DNA obtido passou por avaliações genotípicas utilizando a PCR para verificar a presença do gene *bla*CTX-M utilizando as seguintes sequências de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) CTX-MU1 (5'-ATGTGCACCAGTAARGT-3') e CTX-MU2 (5'-TGGGTRAARTARGTSACCAGA-3') que amplificaram um fragmento de 593 pb. Esta técnica da PCR foi realizada no LABIOTEC – Laboratório de Biotecnologia para todas as 69 amostras. O volume final das reações foi de 25 µL, contendo 12,5 µL GoTaq®*Green Master Mix*, 8,5 µL água *free* DNA, 1 µL de cada um dos dois oligonucleotídios iniciadores (10 pmol) e 2 µL de DNA extraído. As reações foram realizadas em termociclador modelo PCR *Amplitherm Thermal Cycles*. Os seguintes parâmetros de reação foram usados: desnaturação inicial a 94° C por 7 min, desnaturação a 94° C por 50 segundos, anelamento a 50° C por 40 segundos e extensão a 72° C por 60 segundos repetidos por 35 ciclos, com extensão final a 72° C por 5 minutos. (PAGANI et al., 2003). Foi utilizado como controle positivo uma amostra de campo de *Salmonella Heidelberg* comprovadamente produtora de ESBL.

Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5 % contendo brometo de etídeo como corante e visualizados em transiluminador UV. Para ter como base a dimensão do fragmento amplificado foi usado um marcador de tamanho molecular de 1kb da marca comercial *Thermo Scientific GeneRuler 1kb DNA Ladder*.

3.3.5 Questionário Epidemiológico

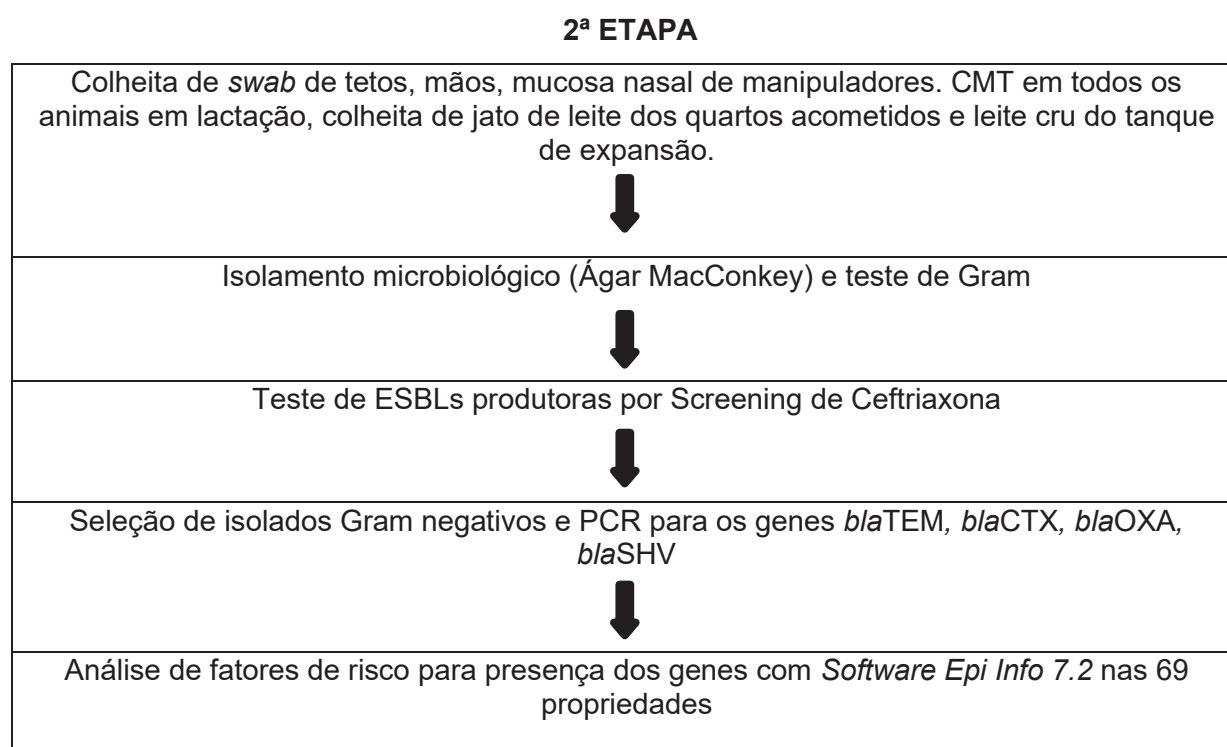
Um questionário epidemiológico (anexo 1) foi aplicado para ordenhadores simultaneamente à colheita de amostras em forma de perguntas. Utilizando então, como base para o conhecimento do histórico do rebanho, tratamentos usualmente adotados para mastite contagiosa e ambiental, se existiam animais com persistência da mastite e quais as formas de higienização empregadas pelos manipuladores e também nos tetos e equipamentos de ordenha.,,,,,,,,,,,,,,

3.4 SEGUNDA ETAPA DE COLHEITA E ANÁLISES

3.4.1 Seleção de Propriedades

Do total das propriedades positivas para a presença de bactérias produtoras de ESBL, apenas quatro foram selecionadas para segunda etapa de colheita. Esta escolha foi feita de acordo com as observações técnicas anotadas, com as seguintes características de propriedade: contendo entre cinco a 20 animais na ordenha, tipo de ordenha (mecânica), qualidade de ordenha e de manejo insatisfatórios e municípios diferentes ou uma distância considerável entre elas. Sendo assim, as propriedades estavam contidas nos municípios de Toledo, Palotina e Santa Tereza do Oeste. A figura 2 sumariza as etapas realizadas

Figura 2. FLUXOGRAMA DA ETAPA 2 DE COLHEITA DE AMOSTRA E PROCESSAMENTO DE DADOS DE PROPRIEDADES LEITERAS.



3.4.2 Triagem Utilizando CMT (*California Mastitis Test*)

Nas propriedades novamente visitadas, todas as vacas lactantes foram analisadas para verificar a presença de mastite clínica ou subclínica utilizando o método CMT (*California Mastitis Test*). Esta triagem foi realizada utilizando uma raquete contendo quatro poços onde se inseriu o leite de cada quarto com o reagente. Ao constatar a formação de gel desta solução, o resultado foi interpretado

da seguinte maneira: escore 1 (negativa/sem reação entre reagente e leite); 2: reação suspeita (traços); 3: reação fracamente positiva (+); 4: reação positiva (++) e; 5: reação fortemente positiva (+++) (Philpot & Nickerson, 1991).

Os animais que apresentaram resultados positivos ao CMT foram analisados a partir de colheitas de alíquota de leite e utilizando *swab* do ducto papilar do quarto afetado. Além dos animais, amostras também foram colhidas dos manipuladores através de *swab* da mucosa nasal e da palma das mãos.

As amostras, após colheita, foram acondicionadas em caldo cérebro coração (BHI) e enviadas ao laboratório em caixa refrigerada.

3.4.3 Cultivo Microbiológico

As amostras desta etapa foram manipuladas e processadas de acordo com o método utilizado no item 3.3.1

3.4.4 Ágar Screening com Ceftriaxona

Após a colheita das amostras, o método Ágar Screening com Ceftriaxona foi empregado. Foi diluído o princípio ativo Ceftriaxona na concentração 1µg/mL em Ágar Mueller-Hinton em placas com estriamento de colônias pré-armazenadas. Segundo CLSI (2013; 2014), o crescimento bacteriano neste ágar confirma a produção de ESBL. Foi utilizada uma amostra de campo de *Salmonella* Heidelberg produtora de ESBL como controle positivo.

3.4.5 Extração de DNA

Após cultivo microbiológico, as colônias foram isoladas e manipuladas com metodologia idêntica ao item 3.3.2.

3.4.6 Reação em Cadeia pela Polimerase

O material obtido da extração de DNA passou por avaliações genotípicas através do PCR utilizando-se *primers* que codificam genes *bla*CTX-M, *bla*OXA,

*bla*TEM e *bla*SHV. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados estão listados na Tabela 2. Esta metodologia foi realizada no Laboratório de Biotecnologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa (UFV)

Tabela 2- SEQUÊNCIAS DE OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES E TAMANHO DOS PRODUTOS OBTIDOS POR PCR DOS GENES DE RESISTÊNCIA *bla*CTX-M, *bla*SHV, *bla*OXA E *bla*TEM E REFERÊNCIA.

Gene	Sequência de Nucleotídeos 5'-3'	Amplificado	Referência
<i>bla</i> CTX-M	TTTGCGATGTGCAGTACCAGTAA CGATATCGTTGGTGGTGCCATA	544bp	Edelstein et al. (2003)
<i>bla</i> SHV	TCAGCGAAAAACACCTTG TCCCGCAGATAAATCACCA	475bp	M'zali et al. (1996)
<i>bla</i> OXA	ATCTACAGCAGCGCCAGTTG CGCATCAAATGCCATAAGTG	199bp	Feria (2002)
<i>bla</i> TEM	TACGATACGGGAGGGCTTAC TTCCTGTTTTTGCTCACCCA	716 bp	Belaouaj et al. (1994)

As técnicas para reação em cadeia pela polimerase e amplificação do DNA das amostras foram realizadas segundo descrito por cada autor, com modificações de acordo com Tabela 03. O volume final da reação foi de 16 µL, onde foram utilizados 8 µL de *GoTaq*, 5,8 µL de H₂O, 0,6 µL (6 pmol) de cada oligonucleotídeo iniciador e 1 µL de DNA. Todas as reações foram realizadas por termociclador modelo *Applied Biosystems Veriti Thermal Cycle*. Os produtos amplificados foram inseridos em poços de gel de agarose a 1,5%, TBE a 1%, e o gel revelado por meio de Corante intercalante para ácidos nucléicos UniSafe Dye®

Tabela 03 – ETAPAS DA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE PARA DETECÇÃO DOS GENES *bla*TEM, *bla*SHV, *bla*CTX-M, *bla*OXA

Gene	Ciclo	Referências
<i>bla</i> TEM	94 ° C por 7 minutos 60° C por 5 minutos 72° C por 1 minuto 30 ciclos de: 94° C por 1 minuto 60° C por 2 minutos 72° C por 1 minuto Extensão final 72° C por 5 minutos	Belaouaj et al. (1994)
<i>bla</i> SHV	30 ciclos de: 94 ° C por 15 seg, 60 ° C por 30 seg 72 ° C por 1 min. Extensão final 72 ° C por 5 min	M'zali et al. (1996)
<i>bla</i> OXA	94 ° C por 7 min 60 ° C por 5 min 72 ° C por 1 min 30 ciclos de: 94 ° C por 1 min 60 ° C a 2 min 72 ° C por 1 min Extensão final 72 ° C por 5 min	Feria et al. (2002)
<i>Bla</i> CTX-M	94 ° C por 2 min 30 seg 35 ciclos de: 94 ° C durante 30 seg, 47 ° C durante 1 min 72 ° C durante 1 min. Extensão final 72° C por 4 minutos	Edelstein et al. (2003)

3.4.7 Análise do Questionário

Os dados do questionário epidemiológico foram adicionados no programa EpiInfo (versão 7.2.0.1) e os resultados encontrados a partir da análise foram observados os cálculos de qui-quadrado tabelado na ordem 2x2 e correção de Yates, com o objetivo de avaliar os principais fatores de risco relacionados com a presença de genes ESBL.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DETECÇÃO FENOTÍPICA DE ESBL E REACÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE

4.1.1 Teste de Sensibilidade a Antibióticos por Disco Difusão em Tanques de Expansão

Das 111 estirpes submetidas ao teste fenotípico, 27 (24,32%) se mostraram positivas como cepas produtoras de ESBL (Tabelas 4 e 5). Da primeira etapa de colheita de amostras analisadas, 28,98% (20/69) resultaram em positividade e 16,66% (7/42) nas quatro propriedades contidas na segunda etapa.

Tabela 4. OCORRÊNCIA FENOTÍPICA (ESBL) E GENOTÍPICA (PRESENÇA DE GENES) EM ISOLADOS DE TANQUE DE EXPANSÃO NAS PROPRIEDADES RURAIS EM MUNICÍPIOS DA REGIÃO OESTE DO ESTADO DO PARANÁ.

Município	Genes				
	ESBL	<i>bla</i> CTX-M	<i>bla</i> SHV	<i>bla</i> TEM	<i>bla</i> OXA
Cascavel	1	2	0	0	0
Céu Azul	0	0	0	0	0
Marechal Cândido Rondon	2	1	0	0	0
Palotina	8	3	1	0	0
Santa Tereza do Oeste	6	2	1	0	0
São Pedro do Iguaçu	3	1	0	0	0
Toledo	4	0	2	1	0
Vera Cruz	3	2	1	0	0
Total	27	11	5	1	0

Diferentes isolados exibiram uma ligeira variação nos seus perfis de susceptibilidade aos antibióticos contra os cinco antibióticos testados (Anexo 2). A maioria dos isolados apresentou resistência à quarta geração cefepima (28,98%), já as cefalosporinas de terceira geração ceftriaxona, cefotaxima e ceftazidima tiveram respectivamente 10,14%, 14,49% e 17,39% de positividade.

A utilização indiscriminada destes princípios ativos nas propriedades visitadas foi evidenciada através do inquérito epidemiológico realizado durante as visitas, onde foi possível constatar que β -lactâmicos e seus derivados são um dos antibióticos mais escolhidos para o tratamento empírico dos casos de mastite e

outras doenças bacterianas de bovinos, uma vez que o grupo dos β -lactâmicos ainda é o agente antimicrobiano mais comumente utilizado em todo mundo contra infecções bacterianas complicadas, causadas por gram-negativas (DE OCA et al., 2015)

Tabela 5. TRIAGEM E IDENTIFICAÇÃO DAS PROPRIEDADES COM ISOLAMENTO DE ENTEROBACTÉRIAS PRODUTORAS DE ESBL

<u>Propriedade</u>	<u>Resultado</u>	<u>Antibiótico com Halo fantasma</u>
17	ESBL +	Todos
19	ESBL +	CTX, ATM, CPM
21	ESBL +	CAZ, CPM, ATM, CTX
22	ESBL +	CPM, CAZ, ATM
23	ESBL +	ATM, CPM, CAZ, CTX
24	ESBL +	ATM, CPM, CAZ, CRO
29	ESBL +	CPM
31	ESBL +	CPM
32	ESBL +	CPM
33	ESBL +	CAZ
34	ESBL +	Todos
35	ESBL +	Todos
37	ESBL +	ATM, CAZ, CTX, CPM
38	ESBL +	CPM
39	ESBL +	CPM, CRO
43	ESBL +	CTX, CPM
44	ESBL +	CPM, CAZ
55	ESBL +	ATM, CTX, CPM, CRO
66	ESBL +	CPM
63	ESBL +	CTX, CPM, CRO, CAZ
58	ESBL +	CPM, CAZ

CRO: ceftriaxona; ATM: aztreonam; CAZ: ceftazidima; CTX: cefotaxima; CPM: cefepima.

O teste de sensibilidade para o monobactâmico aztreonam foi também realizado e 14,92% das amostras apresentaram halo fantasma para esse princípio ativo. Em isolados de *E. coli* de vacas com mastite na China testou-se a resistência aos mesmos antibióticos e foram observadas divergências em comparação com o presente estudo. Um número bem superior foi a resistência para cefotaxima e ceftazidima, prevalentes em 100% e 66,67% das cepas respectivamente (ALI et al., 2016). Isso pode ser gerado pelo uso indiscriminado de cefalosporinas de terceira geração como ceftiofur para tratamento de mastite clínica. Muito indicado por ser denominado como “descarte zero”, ou seja, não havendo necessidade de aguardar o período de carência para consumir o leite. Estas taxas encontradas em várias

regiões do mundo justificam a diferença de padrão de distribuição de ESBL, uma vez que antimicrobianos β -lactâmicos são amplamente utilizados na medicina veterinária de diversas formas, tanto em tratamentos quanto de forma profilática na dieta de bovinos, aumentando a pressão seletiva para isolados resistentes a estes fármacos (CHENEY et. al., 2015).

Fenótipos de multirresistência de bactérias isoladas de mastite bovina foi relatada em muitos países; no entanto, os padrões de resistência das populações bacterianas variam entre determinados pontos geográficos, o que pode refletir diferenças em terapia antimicrobiana (BENGTSSON, 2009; HAWARI, 2008). O perfil de multirresistência ESBL para o mínimo de duas classes de antimicrobianos foi encontrado em 21,73% das amostras de leite cru testadas. Na região sudeste de São Paulo, Siqueira et al., 2015 observou 47,6% para o mesmo item testado.

A dinâmica de ocorrência dos sorotipos não é homogênea em muitos países. Em estudos similares aos realizados no presente estudo, 90,7% de *E. coli* isolada de vacas leiteiras com mastite nos EUA eram tipos multi droga resistentes (SRINIVASAN, 2007); enquanto apenas 11% de *E. coli* isolado de mastite bovina clínica na Finlândia e em Israel eram do mesmo tipo (LEHTOLAINEN, 2003). As grandes diferenças observadas na resistência a antibióticos para bactérias isoladas em casos de mastite em diferentes países, indicam a importância do testes de suscetibilidade a antibióticos e vigilância periódica de bactérias causadoras de mastite (AHMED, 2011).

Das 27 positivas identificadas como produtoras da enzima β -lactamase, três manifestaram halo fantasma ao redor de todos antibióticos testados, seis amostras representaram resistência para 4 ativos testados (Tabela 5.) Diferenciando-se de Locatelli et al., (2010) que encontram apenas um isolado, identificado como *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, positivo para o teste de duplo disco e foi resistente a todas os princípios contidos, incluindo cefotaxime e ceftriaxona, porém sensível à amoxicilina-clavulanato. Rangel e Marin (2009) relataram 17,7% de cepas de *E. coli* apresentando resistência à ceftriaxona isolado a partir de leite de mastite. Uma possível explicação para essas divergências entre os dados é de que o microbioma leiteiro e ambiental, além das práticas terapêuticas, podem ser diferentes da região oeste do Paraná. Um exemplo muito comum é uso de

compostos que contém formulações com antibióticos e com baixa finalidade terapêutica. Favorecendo a seleção de patógenos resistentes no meio ambiente e que podem causar doenças de difícil tratamento (ORÚS et al., 2015).

A partir de achados como estes, observa-se indicativos potenciais de falhas na higiene do ambiente antes, durante e depois da ordenha, particularmente em procedimentos de limpeza e desinfecção de tetos dos animais, na higienização das ordenhadeiras, nas mãos dos ordenhadores, tanques e utensílios de armazenamento do leite. Existem também, deficiências na prevenção de agentes ambientais de mastite, o que leva a crer que há riscos preocupantes a partir da ingestão do leite cru produzidos nestas propriedades (SIQUEIRA et. al., 2014). Explicações possíveis para este fato pode ser a aquisição de plasmídeos em gêneros e espécies distintas contendo genes que codificam ESBL. Tanto *E. coli* quanto *K. pneumoniae* demonstraram elevada resistência para cefalosporinas. (Blanco et al., 1997; Davies, 1997; Paterson, 2006).

Os aumentos significativos destes níveis e achados de genes de resistência, pode ser o uso generalizado de antibacterianos em protocolos de tratamento para distúrbios gastrointestinais e outras doenças em bovinos (ROCHA et. al., 2014). Esses princípios ativos entram no ambiente de várias formas, dentre elas, através das excretas e da lavagem de tratamentos tópicos de animais, por meio da utilização do esterco como meio de adubação de lavoura e pastagem, descartes inapropriados, possibilitando que estes compostos sejam absorvidos pelos tecidos vegetais, animais e humanos (CAPLETON et al., 2006).

Dado este é sustentado pela identificação de mais de 72% de cepa com multirresistência no grupo filogenético B1, conhecidos como comensais, sendo o mais frequente em *E. coli* de animais (TENAILLON et al., 2010). Os percentuais de resistência observados tanto nos isolados do leite quanto na linha de ordenha, apontam que as medidas que previnem a disseminação destes patógenos no ambiente não estão sendo aplicadas. Conferindo assim características estruturais que facilitam o deslocamento entre os fômites presente nas propriedades.

4.1.2 Detecção de Perfil Genético de Resistência

4.1.2.1 Gene CTX-M

Com relação à técnica de PCR, resultados diferentes dos quais eram esperados foram observados ao gene CTX-M. Das 111 amostras (69 da primeira etapa e 42 da segunda) analisadas, cinco (4,5 %) foram positivas (Figura 2 e Tabela 6), sendo que três delas também foram positivas para ESBL. Resultado superior ao constatado por Geser et al. (2012), onde apenas 1,5 % das cepas de *E. coli* isoladas foram ESBL produtoras e portadoras do gene blaCTX-M isoladas de leite mastítico e nenhuma de isolados de leite de tanque a granel. Os dados comprovam que existe grande diferença da qualidade de leite na região estudada quando comparada à estudada pelo autor (Suíça). O modo com que os animais são manejados no ambiente de criação e tratados para mastite até a obtenção do leite, reflete no número e frequência de administrações antimicrobianas (VIEIRA et al. 2016)

Tabela 6. OCORRÊNCIA DO GENE CTX-M ISOLADOS DE DIFERENTES AMOSTRAS EM PROPRIEDADES RURAIS EM MUNICÍPIOS DA REGIÃO OESTE DO ESTADO DO PARANÁ.

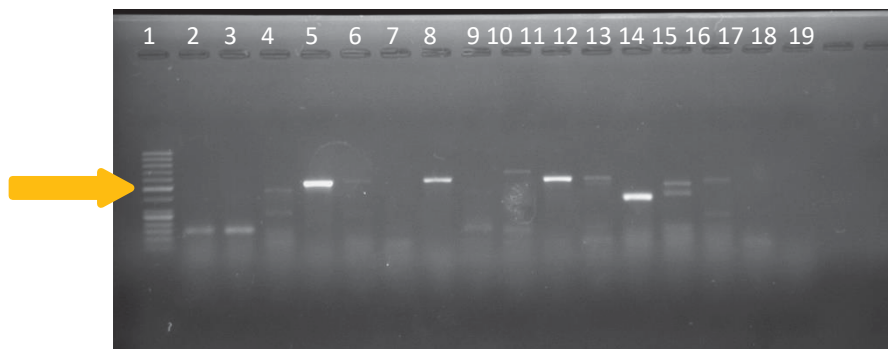
Município/amostra	Leite Cru	Teteira
Cascavel		
Propriedade 63	2	
Marechal Candido Rondon		
Propriedade 43	1	
São Pedro do Iguaçu		
Propriedade 37	1	
Santa Tereza do Oeste		
Propriedade 58	1	
Propriedade 7		1
Vera Cruz do Oeste		
Propriedade 36	1	
Propriedade 34	1	
Palotina		
Propriedade 21	1	
Propriedade 23		1
Propriedade 24	1	

O grupo CTX-M-1 é o tipo de gene predominante em fazendas leiteiras na Alemanha. As enterobactérias portadoras deste gene contaminam com frequência todo o volume de leite contido no tanque de expansão, e mesmo o tratamento térmico inativando esses agentes, o consumo de leite cru dentro da propriedade se torna um risco para a saúde e circulação do gene (ODENTHAL et al., 2016).

Também na Alemanha, Freitag (2017) relatou que num total de 12 isolados de *E.coli* houve maior prevalência de genes de resistência do grupo *bla*CTX-M, sendo que cinco deles também abrigavam o gene *bla*TEM-1. Os genes ESBL predominantes pertenciam ao grupo *bla*CTX-M-1 (41,7%). Essa maior resistência reflete a consequência em se criar bovinos leiteiros em locais inapropriados com excesso de umidade e contato direto com fezes. Numa delas (propriedade 63 em Cascavel) constatou-se animais com elevada contaminação de úbere, levando a um maior número de infecções e consequente antibioticoterapia excessiva. O mesmo autor comenta que os isolados genéticos foram obtidos em diferentes momentos de diferentes vacas do mesmo rebanho e diferiram em seus padrões. Estes exemplos sugerem que, mesmo dentro do mesmo rebanho, a causa de mastite e seus respectivos isolados de enterobactérias variam com o tempo.

Desde 2000, a cefotaxima enzima-Munique (CTX-M) tornou-se uma das mais frequentes produtoras de ESBL em *Escherichia coli* e vem emergindo como um importante agente patogênico na comunidade (COELHO et al., 2011). Já em rebanhos leiteiros de todo o mundo, existe uma ampla variedade de microrganismos ambientais em um mesmo ambiente. Além disso pode ser observado casos de uma mesma cepa isolada em diferentes vacas e recidivas de mastite pela mesma cepa (SANTOS et. al, 2014).

FIGURA 02 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE (1,5%) MOSTRANDO OS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DE FRAGMENTO DO GENE *bla*CTX-M POR PCR. A SETA INDICA A POSIÇÃO DO FRAGMENTO ESPERADO NA AMPLIFICAÇÃO (598 pb). 01: MARCADOR MOLECULAR; 5, 8, 11 E 12: AMOSTRAS DE CAMPO POSITIVAS; 2-4, 6, 7, 9, 10, 13-18: AMOSTRAS DE CAMPO NEGATIVAS; 19: CONTROLE NEGATIVO.



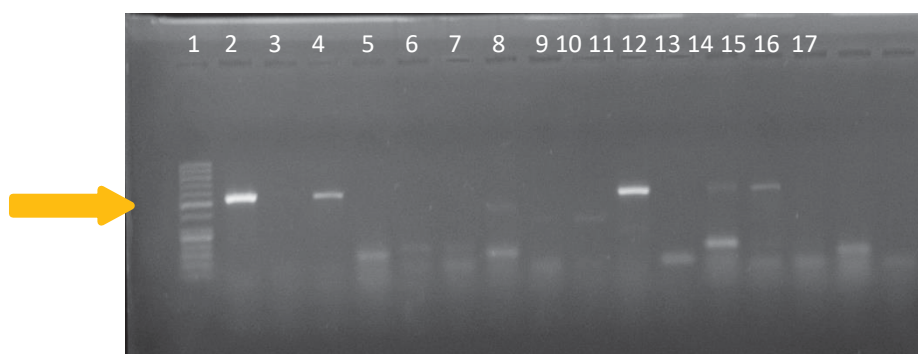
Uma segunda técnica de PCR foi utilizada para a detecção do gene *bla*CTX-M (tabelas 2 e 3) partindo-se das 29 amostras ESBL positivas fenotipicamente, resultando em cinco (17,24%) amostras carreadoras do gene e com detecção de ESBL de forma fenotípica. A elevada troca de genes em microrganismo tem grande relação com a alta densidade microbiana intestinal de bovinos, proporcionando maior frequência de achados em rebanhos (MACIEL, 2017)

Das 29 amostras ESBL positivas testadas segundo métodos da Tabela 2, seis se mostraram positivas, totalizando 20,7% (Figura 3). Este baixo percentual mostra que a pré-seleção dos isolados de forma fenotípica aumenta a probabilidade de selecionar realmente as cepas resistentes, porém como existem centenas de genes envolvidos nesta resistência, pode-se descartar a presença de apenas um destes genes pela PCR, não sendo possível afirmar a não existência de genes de resistência. Outro importante aspecto a ser considerado é a questão genético-racial, pois os animais desta propriedade eram da raça holandesa, que embora apresentem características genéticas que lhe conferem maior produção de leite, possuem tetos pendulares mais próximos ao chão e musculatura mais flácida. A profundidade do úbere é um quesito de muita relevância, porque animais com essa característica são mais suscetíveis às contaminações com agentes ambientais (COENTÃO et al. 2008).

Em sua caracterização molecular, Timofte et al. (2014) mostraram que em 17 amostras testadas, dois (11.76%) isolados de *E. coli* carregavam o gene do grupo

CTX-M-1. Desse modo, novas estirpes resistentes vêm dando sinais favoráveis para sua manutenção no ambiente de criação.

FIGURA 03: ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE (1,5%) MOSTRANDO OS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DE FRAGMENTO DO GENE *bla*CTX-M POR PCR. A SETA INDICA A POSIÇÃO DO FRAGMENTO ESPERADO NA AMPLIFICAÇÃO (598 pb). 01: MARCADOR MOLECULAR; 2: CONTROLE POSITIVO (AMOSTRA DE CAMPO 63); 4, 11, 13 E 14: AMOSTRAS DE CAMPO POSITIVAS; 3, 5-10, 12, 15, E 16: AMOSTRAS DE CAMPO NEGATIVAS; 17: CONTROLE NEGATIVO. (Teste segundo Tabela 2 – UFV)



Em um estudo recente, 490 estirpes de *E.coli* foram isoladas de vacas leiteiras que manifestavam mastite clínica na Alemanha, sendo constatado que somente seis (1,22%) portavam o gene *bla*CTX-M-1, número inferior ao encontrado no presente estudo (EISENBERGER, 2018).

Algumas amostras que haviam sido testadas anteriormente para esse gene e que haviam apresentado resultado positivo, foram negativas para o teste na UFV. Provavelmente isto se deve ao fato dos primers inicialmente testados serem genéricos para CTX-M, ou seja, capazes de amplificar um maior número de positivos. Já a segunda reação (UFV), foram usados Primers mais específicos, com probabilidade de identificar um menor número.

4.1.2.2 Gene *bla*SHV

O teste genotípico para busca do gene *bla*SHV foi realizado somente em 19 cepas bacterianas, onde o percentual de positividade foi de 26,3% (5/19) (Figura 4 e Tabela 8). Esse achado é superior ao de Ali et al. (2016) que identificaram o gene de resistência em 16,67% (6/36) dos ESBL-positivos isolados de leite de vacas com

mastite na China. Buscando bactérias Gram-negativas no Egito, Ahmed et al., (2011) encontraram apenas uma amostra em isolado de mastite clínica bovina identificada como *Klebsiella oxytoca* contendo o gene *blaSHV-1*. Ao contrário do presente trabalho, onde foi buscado resistência a partir de Enterobactérias, contemplando todas espécies contidas neste gênero.

Em estudo com amostras de leite cru e outros alimentos de origem animal na Turquia, Tekiner et.al., (2016) demonstrou que o gene *blaSHV* foi o menos frequente dentre todos os isolados. O gene esteve presente em 33,3% (8/24) dos isolados positivos para ESBL em leite cru de vaca. Esse número foi menor pelo fato de os autores terem realizado o trabalho a partir de espécies isoladas, diminuindo assim o número de estirpes testadas. Outros autores relataram que os resíduos de antibióticos na urina de bezerros resulta na ampliação da população de bactérias resistentes na pastagem; é presumivelmente, a maior probabilidade de transmissão dessas populações resistentes entre animais de qualquer idade e depois à cadeia alimentar derivada de animais (RUPP et al., 2003; HAQUE et al., 2014).

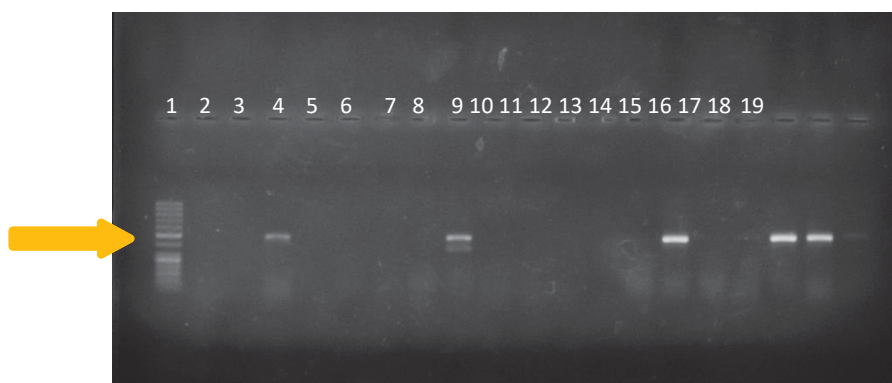
Tabela 7. DETECÇÃO DO GENE *blaSHV* ISOLADOS DE DIFERENTES AMOSTRAS BIOLÓGICAS EM PROPRIEDADES RURAIS NOS MUNICÍPIOS ESTUDADOS.

	Leite Cru	Ordenhador/mão	Ordenhador/nasal
Toledo			
Propriedade 66	1		
Propriedade 69			1
Santa Tereza do Oeste			
Propriedade 7		1	
Vera Cruz do Oeste			
Propriedade 33	1		
Palotina			
Propriedade 22	1		

Uma pequena propriedade, no município de Santa Tereza do Oeste apresentou duas amostras carreadoras dos genes *blaSHV* e *blaCTX-M*, detectada respectivamente a partir de isolados obtidos de swab de mãos do ordenhador e da teteira pós-ordenha. Esta unidade produtora de leite também produz derivados como queijos e sorvetes para consumo próprio. Este dado confirma o homem como um

portador e potencial dissipador de gene de resistência para o rebanho leiteiro e para população, especialmente pelo fato de comercializarem além do leite, seus subprodutos. Tal conhecimento é relevante para avaliar relações entre hospedeiros e microorganismos existentes em indivíduos (homem e animal) saudáveis ou doentes (MALMUTHUGE et al., 2017).

FIGURA 04 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE (1,5%) MOSTRANDO OS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DE FRAGMENTO DO GENE *bla*SHV-M POR PCR. A SETA INDICA A POSIÇÃO DO FRAGMENTO ESPERADO NA AMPLIFICAÇÃO (475pb). 01: MARCADOR MOLECULAR; 4, 9, 15, 18, 19: AMOSTRAS DE CAMPO POSITIVAS.



Ao ser identificadas porcentagem de enterobactérias produtoras de ESBL em animais saudáveis, há alto risco zoonótico para pessoas que trabalham em contato próximo com animais. Com este fim, Dahms et al. (2015) investigaram diferentes fazendas buscando bactérias produtoras de ESBL em amostras coletadas dos animais e também de trabalhadores agrícolas. No total, 70,6% das fazendas testadas e 5,8% dos trabalhadores rurais foram positivos para produção de ESBL. No presente estudo foram identificadas cepas ESBL em duas pessoas que trabalham diretamente com animais.

Uma cepa foi negativa no fenotípico (ESBL), porém a forma genotípica foi identificada (detectado o gene *bla*CTX-M). Das 21 cepas produtoras de ESBL, seis apresentaram o gene *bla*CTX-M, três apresentaram o gene *bla*SHV e em uma foi possível detectar tanto o gene *bla*CTX-M quanto o gene *bla*TEM. Em 11 amostras ESBL positivas fenotipicamente não foi possível a amplificação de nenhum dos

genes testados. Sugere-se nestas amostras a existência de outros genes de resistência não estudados ou degradação do material genético.

4.1.2.3 Gene *bla*TEM

O gene *bla*TEM também foi submetido à pesquisa no laboratório da UFV em conformidade com os métodos descritos nas Tabelas 2 e 3. A pesquisa resultou em apenas uma (3,7%) amostra positiva, (Figura 5 e Tabela 8), dentre as 27 testadas. Esta amostra também se mostrou positiva para o teste de triagem fenotípica, ou seja, quando inoculada em Ágar Mueller-Hinton com Ceftriaxona 1µg/mL foi observada formação de colônia bacteriana. Este isolado foi colhido a partir de um *swab* de teteira antes da ordenha da manhã, ou seja, esse equipamento, após o fim da ordenha da tarde deveria ter passado pelo menos 12 horas devidamente higienizado até a ordenha do dia seguinte.

Tabela 8. OCORRÊNCIA DO GENE *bla*TEM EM ISOLADOS DE DIFERENTES AMOSTRAS BIOLÓGICAS EM PROPRIEDADES RURAIS NOS MUNICÍPIOS PESQUISADOS

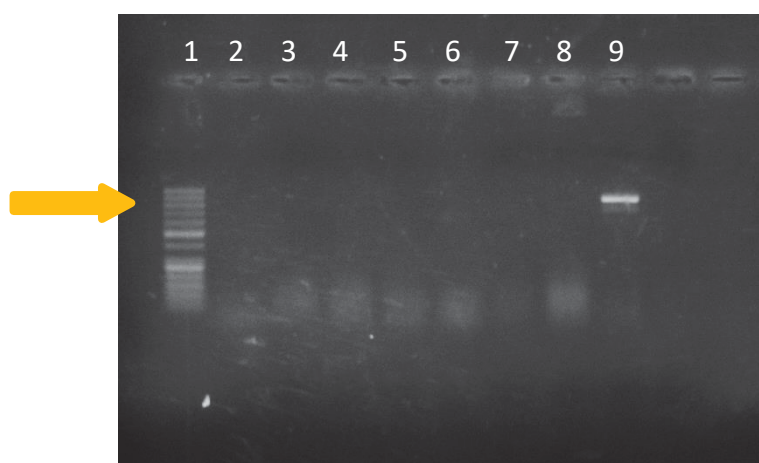
<u>Município/amostra</u>	<u>Teteira</u>
Toledo	
<u>Propriedade 69</u>	<u>1</u>

O momento da ordenha é preconizado que esteja em devidas condições de higiene para não se tornar um ponto de contaminação. As vacas que entraram em contato com esta teteira provavelmente se infectaram com bactérias portadoras deste gene de resistência. O esfíncter do teto é a via de acesso para entrada e infecção causada por bactérias (CARNEIRO, 2009), e sua contaminação pode ocorrer pelas mãos do ordenhador ou através dos equipamentos de ordenha como teteiras (ALENCAR, 2014). Se houver ordenhadores ou equipamentos de ordenha com presença de cepas portadoras de genes de resistência, essa contaminação pode alcançar os quartos mamários após o contato.

Um número maior de positivos foi encontrado por Ahmed et al., (2011) quando isolaram as principais espécies de enterobactérias de quartos mamários de

vacas com mastite no Egito. Neste estudo, o autor identificou *bla*TEM-1 produtor de β -lactamase, que confere resistência às penicilinas e cefalosporinas em 20,5% dos isolados bacterianos. Ali et al., (2016) relataram 55,56% (20/36) de *E. coli* isoladas de leite mastítico consideradas ESBL positivas. Erros de prescrição veterinária e tratamentos empíricos podem ocasionar esse elevado número de cepas resistentes, com distribuição mundial.

FIGURA 05– ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE (1,5%) MOSTRANDO OS PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DE FRAGMENTO DO GENE *bla*TEM POR PCR. A SETA INDICA A POSIÇÃO DO FRAGMENTO ESPERADO NA AMPLIFICAÇÃO (716pb). 01: MARCADOR MOLECULAR; 9: AMOSTRA DE CAMPO POSITIVA;



Na Suíça, apenas um isolado de *E. Coli* de amostras de leite de mastite continha o gene *bla*TEM-1 porém nenhuma amostra foi considerada positiva para β -lactamases oriundas do leite do tanque de expansão (GESER et al., 2012). Este quadro pode acabar por desmistificar a associação do cenário tecnológico aos parâmetros como qualidade do leite e sanidade do rebanho, apontando para a importância da capacitação específica da mão de obra atuante na linha de ordenha vinculada a hábitos sistemáticos de higiene, independentemente do nível de tecnificação da propriedade.

A identificação de cepas resistentes aos antimicrobianos testados e a presença do gene *bla*TEM em Enterobactérias há possibilidade de associação de práticas adotadas nos sistemas de produção que promovem pressão seletiva sobre estes micro-organismos; um exemplo é administração de antimicrobianos como promotor de crescimento e envolvidos na profilaxia de mastite em vaca seca (VAN

DEN BOGARD, 2000; CALL et al., 2008; OLIVER, 2012). No entanto, em produções orgânicas, mesmo havendo longo tempo de manejo livre de antimicrobianos houve persistência dessas cepas, sugerindo que existam outros fatores envolvidos na ocorrência de bactérias resistentes Call et. al, (2008). Portanto, independentemente da origem, a disseminação de bactérias resistentes através dos alimentos representa riscos à saúde humana. (NJAGE, 2012; GESER, 2012).

A presença de cepas de enterobactérias (*C. Sakazakii*) resistentes aos ESBLs e portadores do gene *blaTEM* sugere que pode ocorrer risco de infecções por estes agentes, além de indicar associação de leite cru com a disseminação destas bactérias (ALVES et. al., 2015).

Foi analisado um tipo de produto em uma única espécie animal, porém como são produzidos em ambiente rural, existem também outros animais domésticos que são manipulados originando outros tipos de alimentos como ovos, carne bovina, suína e aves. De certa forma, está corroborando como importante fator de disseminação de ESBL para humanos que manipulam e consomem produtos de origem animal que saem das propriedades para ser comercializados

4.1.2.4 Gene *blaOXA*

Assim como outros já testados, o gene *blaOXA* também foi pesquisado a partir de colônias positivas para o fenotípico ESBL. E apenas para este gene, dentre todas as 19 amostras testadas, não houve identificação de cepa portadora. Porém, não podendo afirmar que todas as amostras são negativas, em razão de possuir variáveis desse gene como exemplo OXA-1, OXA-3 e OXA-21, que não foram testadas no presente trabalho.

Assim como neste trabalho, em três isolados de *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* e dois de *E. coli*, Timofte et al., (2014) não encontraram o gene *blaOXA* em amostras de mastite clínica no Reino Unido. Apenas uma cepa de *E. coli* O157-D14 colhida de leite de tanque de expansão apresentou perfil genotípico contendo *blaOXA-1* (AHMED et al., 2015). Em outro estudo, Ahmed et al. 2014 constatou que este mesmo gene resultou na menor incidência (3,7%) dentre todas as β -lactamases testadas em produtos cárneos e lácteos. Os autores justificam essa ausência ou baixa incidência deste patógeno, pela perda aparente ou redução no nível de expressão das porinas presentes nos isolados.

Mudanças no microbioma mamário por exemplo estimula a evolução de novos micro-organismos patogênicos e ao desenvolvimento de novos fatores de virulência em patógenos já conhecidos (MELLMANN; BIELASZEWSKA; KARCH, 2009). Assim emerge a resistência antimicrobiana, um problema global de saúde pública, que é impactado e provocado pelo uso de antimicrobianos tanto em humanos quanto na medicina veterinária (ARIAS; CARRILHO, 2012; GONZALES, MELLO; CAFÉ, 2012).

Ainda há mais a ser pesquisado para aproximar-se de uma conclusão mais concreta sobre genes e sua direção de transmissão, animal-homem ou homem-animal.

As colônias resistentes a múltiplos fármacos e ESBL representou moderada incidência em nosso estudo, sendo assim ainda é preocupante, pois há reservatórios de genes resistentes a antibióticos dentro da comunidade e que os genes de resistência e os genes virulentos codificados por plasmídeos são facilmente transferível para outras cepas. Além disso, o resultado deste estudo demonstrou que muitos organismos que abrigam as enzimas β -lactamase de espectro estendido (ESBL) são resistentes a múltiplos fármacos mostrando resistência a 2 ou mais drogas testadas e, portanto, podem representar sério desafio à saúde pública (RASHEED et al., 2014).

A utilização indiscriminada destes princípios ativos nas propriedades visitadas foi evidenciada através do inquérito epidemiológico realizado durante as visitas, onde foi possível constatar que β -lactâmicos e seus derivados são um dos antibióticos mais escolhidos para o tratamento empírico dos casos de mastite e outras doenças bacterianas de bovinos.

5. CONCLUSÕES

- Existem, nas propriedades leiteiras do Oeste do Paraná, cepas de enterobactérias produtoras de ESBL;
- Cepas de enterobactérias ESBL positivas estão presentes no leite cru, ser humano e os animais de criação portam-nas em fossas nasais, mãos, tetos e úbere;
- Os genes *bla_{ctx-m}*, *bla_{tem}*, *bla_{shv}*; estão presentes nos isolados;
- O gene *bla_{oxa}* não está presente nas cepas isoladas.
- Higiene pessoal e de ordenha, e a forma como os animais recebem tratamento para enfermidades são significativos para aparecimento de genes de resistência

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presente pesquisa revelou a presença de genes de resistência para β -lactâmicos, bem como o fenótipo ESBL de *Enterobacteriaceae* isoladas de leite bovino avaliado, indicando que o uso excessivo ou não racional pode favorecer o desenvolvimento de resistência bacteriana aos antimicrobianos.

A evolução do impacto da resistência em bactérias isoladas de animais na saúde animal e humana não deve ser limitada às bactérias patogênicas, mas devem incluir comensais, considerados também fontes de genes de resistência.

Esses resultados demonstram um grande risco à Saúde Pública, uma vez que os animais, o homem e o ambiente compartilham de agentes patogênicos e comensais. A partir do momento em que ocorre uma pressão de seleção pela utilização indiscriminada de antibióticos na produção animal, bactérias multirresistentes poderão ser selecionadas e podem acometer o homem, levando a infecções sérias que não respondem ao tratamento, muitas vezes levando o paciente ao óbito.

A identificação de cepas produtoras de ESBL vem para endossar um melhor resultado medicamentoso para Enterobactérias envolvidas na mastite, ressaltando o fato de a resistência antimicrobiana não ser único fator que afeta a eficácia da terapia.

Portanto, o isolamento descrito salienta o acontecimento de um fenômeno de evolução sob a terapêutica, como o uso de cefalosporinas de espectro amplo em medicina veterinária selecionando produtores ESBL, gerando consequências graves para saúde pública, como infecções de difícil resolução.

Os princípios ativos utilizados nas técnicas de sensibilidade não são de comum uso na atividade leiteira. Porém, houve achados de resistência para esses antimicrobianos de uso não convencional, reforçando a emergência de que a proporção e a capacidade em adquirir resistência por parte dos microrganismos estão além do estimado. Antes de adotar medidas para evitar uma maior disseminação destas bactérias multirresistentes é primordial que se busque o real status de resistência.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, A. M., & SHIMAMOTO, T. Molecular characterization of antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria isolated from bovine mastitis in Egypt. **Microbiology and immunology**, 55(5), 318-327. 2011.

AHMED, ASHRAF M.; SHIMAMOTO, TOSHI; SHIMAMOTO, TADASHI. Characterization of integrons and resistance genes in multidrug-resistant *Salmonella enterica* isolated from meat and dairy products in Egypt. **International journal of food microbiology**, v. 189, p. 39-44, 2015

ALENCAR, T. A. Aspectos das condições higiênico-sanitárias em unidades leiteiras em municípios do Rio de Janeiro e utilização de ferramentas moleculares para caracterização dos principais agentes bacterianos envolvidos na etiologia das mastites. 113p. Tese (Doutorado em Ciência, Tecnologia e Inovação Agropecuária). **Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**. Seropédica, RJ: UFRRJ, 2014.

ALI, T., ZHANG, L., SHAHID, M., ZHANG, S., LIU, G., GAO, J., & HAN, B. (2016). ESBL-producing *Escherichia coli* from cows suffering mastitis in China contain clinical class 1 integrons with CTX-M linked to ISCR1. **Frontiers in microbiology**, 7, 1931.

ALVES, T. D. S., SIQUEIRA, A. K., FERRAZ, M. M. G., & LEITE, D. D. S. Identificação e perfil de sensibilidade de enterobacter spp. Isolados de leite bovino cru. **Veterinária e Zootecnia**, 22(01), 114-122. 2015

ANDREATTI FILHO, L. R. Saúde aviária e doenças. **São Paulo: Roca, 2007**. vol. 10, p. 112-117.

ARIAS, M. L.; MONGE-ROJAS R.; CHAVES, C.; ANTILLÓN F. Effect of storage temperatures on growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 inoculated in foods from a neotropical environment. **Rev. Biol. Trop.** 2001;49(2):517-24.

ARIAS, M. V. B.; CARRILHO, C. Antimicrobial resistance in animals and in human being. There is reason for concern? **Semina-Ciencias Agrarias**, v. 33, n. 2, p. 775-790, 2012.

AVLAMI, A.; BEKRIS, S.; GANTERIS, G.; KRANIOTAKI, E.; MALAMOU-LADA, E.; ORFANIDOU, M.; PANIARA, O.; PANTAZATOU, A.; PAPAGIANNITSIS, C. C.; PLATSOUKA, E.; STEFANO, I.; TZELEPI, E.; VAGIAKOU, H.; MIRIAGOU, V. Detection of metallo-beta-lactamase genes in clinical specimens by a commercial multiplex PCR system. **J Microbiol Methods**, v. 83, n. 2, p. 185-7, Nov 2010.

BAL, E. B.; BAYAR, S.; BAL, M. A. Antimicrobial susceptibilities of coagulase- negative staphylococci (CNS) and streptococci from bovine subclinical mastitis cases. **J Microbiol**, v. 48, n. 3, p. 267-74, Jun 2010.

BELAAOUAJ, A.; LAPOUMEROULIE, C.; CANIÇA, M. M.; VEDEL, G.; NÉVOT, P.; KRISHNAMOORTHY, R.; PAUL, G. Nucleotide sequences of the genes coding for

the TEM-like beta-lactamases IRT-1 and IRT-2 (formerly called TRI-1 and TRI-2). **FEMS microbiology letters**, v. 120, n. 1-2, p. 75–80, 1994.

BENGTSSON B., UNNERSTAD H.E., EKMAN T., ARTURSSON K., NILSSON-OST M., WALLER K.P. Antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of acute clinical mastitis in dairy cows. **Vet Microbiol** 136: 142–9. 10. 2009

BANSAL, B. K.; HAMANN. J.; GRABOWSKIT, N. T.; SINGH, K. B. Variation in the composition of selected milk fraction samples from healthy and mastitic quarters, and its significance for mastitis diagnosis. **J. Dairy Res.**, v. 72, p. 144-152, 2005.

BARBOSA, R C.; SILVA, C. M. C; HIZUKA, S. M; CAVASSIN, E. D.; PERUGINI, M R. E. Beta-lactamase de espectro estendido: prevalência e comparação de métodos de screening. **Semina: Cio Biol. Saúde**, Londrina, V. 20/21, n. 2, p.17-24,jun. 1999/2000.

BARGUIGUA, A.; EL OTMANI, F.; TALMI, M.; ZEROUALI, K.; TIMINOUNI, M. Prevalence and types of extended spectrum beta-lactamases among urinary *Escherichia coli* isolates in Moroccan community. **Microb. pathogenesis**, v. 61-62C, p. 16-22, May 2 2013.

BITTAR SAAB, A. et al. Prevalência e etiologia da mastite bovina na região de Nova Tebas, Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 2, 2014.

BLATT, J. M. Mecanismo de resistência e detecção das Betalactamases de espectro ampliado. **NewsLab**, v. 40, p. 86 97,2000.

BLANC V., MESA R., SACO M., LAVILLA S., PRATS G., MIRÓ E., et al. ESBL- and plasmidic class C β -lactamase-producing *E. coli* strains isolated from poultry, pig and rabbit farms. **Vet Microbiol** 2006; 118: 299-304.

BOCCIA, D, STOLFI I, LANA S, MORO ML. Nosocomial necrotizing enterocolitis outbreaks: epidemiology and control measures. **Eur J Pediatr** 2001; 160:385-391.

BOUCHILLON, S. K.; BADAL, R. E.; HOBAN, D. J.; HAWSER, S. P. Antimicrobial Susceptibility of Inpatient Urinary Tract Isolates of Gram-Negative Bacilli in the United States: Results from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART) Program: 2009-2011. **Clin Therap**, v. 35, n. 6, p. 872-7, Jun 2013.

BRADLEY, A. J., AND M. J. GREEN. 2009. Factors affecting cure when treating bovine clinical mastitis with cephalosporin-based intramammary preparations. **J. Dairy Sci.** 92:1941–1953.

BRITO, J. R.; BRITO, M. A. **Qualidade higiênica do leite**. Juiz de Fora: Embrapa, 1998.

BURVENICH, C.; VAN MERRIS, V.; MEHRZAD, J. et al. Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. **Vet. Res.**, v.34, p.521-64, 2003.

CALL D. R.; DAVIS M. A.; SAWANT A. A.; Antimicrobial resistance in beef and dairy cattle production. **Animal Health Res Rev.** 2008;9:159-67.

CAMPOS, L. C.; FRANZOLIN, M. R.; TRABULSI, L. R. Diarrheagenic *Escherichia coli* categories among the traditional Enteropathogenic *E. coli* O serogroups - A review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 545-552, 2004.

CAPLETON, A.C.; COURAGE, C.; RUMSBY, P.; HOLMES, P.; STUTT, E.; BOXALL, A.B.A. & LEVY, L.S. Prioritising veterinary medicines according to their potencial indirect human exposure and toxicity profile. **Toxicology Letters Journal**, v. 163, p. 213-223, 2006.

CHENEY, T. E. A.; SMITH, R. P.; HUTCHINSON, J. P.; BRUNTON, L. A.; PRITCHARD, G.; TEALE, C. J. Cross-sectional survey of antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolated from diseased farm livestock in England and Wales. **Epidemiology and Infection**, 143:2653-2659, 2015.

COELHO, A. et al. Spread of *Escherichia coli* O25b:H4 - B2-ST131 producing CTX-M-15 and SHV-12 with high virulence gene content in Barcelona (Spain). **J Antimicrob Chemother**, v. 66, n. 3, p. 517-26, 2011.

COENTÃO C.M., SOUZA G.N., BRITO J.R.F., BRITO M.A.V.P. & LILENBAUM W. Fatores de risco para mastite subclínica em vacas leiteiras. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 60:283-288, 2008.

COONEY S, IVERSEN C, HEALY B, O'BRIEN S, FANNING S. *Enterobacter* spp. **Encyclopedia of Dairy Sci.** 2. ed. Boston: Elsevier; 2011.

CONSTABLE, P. D., AND D. E. MORIN. 2003. Treatment of clinical mastitis using antimicrobial susceptibility profiles for treatment decisions. **Vet. Clin. Food Anim.** 19:139–155.

COSTA, E. O. Importância da mastite na produção leiteira do país. **Rev. Educação Continuada.** CRMV-SP, v. 1, p. 3- 9, 1998.

COSTA, E. O. et al. Estudo da etiologia das mastites bovinas nas sete principais bacias leiteiras do Estado de São Paulo. **Napgama**, v. 4, p. 6-13, 2000.

DA CUNHA, Adriano França et al. Prevalência, etiologia e fatores de risco de mastite clínica em rebanhos leiteiros de Viçosa-mg. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 10, n. 1, p. 48-54, 2016.

DAHMS, C., HUBNER, N. O., KOSSOW, A., MELLMANN, A., DITTMANN, K., AND KRAMER, A. Occurrence of ESBL-producing *Escherichia coli* in livestock and farm workers in Mecklenburg-Western Pomerania, Germany. *PLoS ONE* 10:e0143326. doi: 10.1371/journal.pone.0143326. 2015

DALANEZI, F. M. et al. Importância das leveduras como agentes causadores de mastite clínica em diferentes estados do Brasil. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 14, n. 3, p. 89-89, 2016.

DE OCA, S. A. M.; TALAVERA-ROJAS, M.; SORIANO-VARGAS, E.; BARBA-LEÓN, J. VAZQUEZ-NAVARRETE, J. Determination of extended spectrum β -lactamases/AmpC β -lactamases and plasmidmediated quinolone resistance in *Escherichia coli* isolates obtained from bovine carcasses in Mexico. **Trop. Anim. Health Prod.** 47, 975-981. 2015.

D'ANDREA, M. M., ARENA, F., PALLECCHI, L., & ROSSOLINI, G. M. (2013). CTX-M-type β -lactamases: a successful story of antibiotic resistance. **International Journal of Medical Microbiology**, 303(6-7), 305-317.

DÖPFER, D.; BARKEMA, H.W.; LAM, T.J.G.M. et al. Recurrent clinical mastitis caused by *Escherichia coli* in dairy cows. **J. Dairy Sci.**, v.82, p.80-85, 1999.

DOYLE, M. P. Antimicrobial resistance: implications for the food system. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, vol. 5, 71–137. 2006

EDELSTEIN, M.; PIMKIN, M.; PALAGIN, I.; EDELSTEIN, I.; STRATCHOUNSKI, L. Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian hospitals. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 47, n. 12, p. 3724–32, 2003.

Eisenberger, D., Carl, A., Balsliemke, J., Kämpf, P., Nickel, S., Schulze, G., & Valenza, G. Molecular characterization of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from milk samples of dairy cows with mastitis in Bavaria, Germany. **Microbial Drug Resistance**, 24(4), 505-510. 2018

ERSKINE, R.J., WALKER, R.D., BOLIN, C.A., BARTLETT, P.C., WHITE, D.G. Trends in antibacterial susceptibility of mastitis pathogens during a seven year period. **J. Dairy Sci.** 85, 1111– 1118. 2002.

EWERS, C., BETHE, A., SEMMLER, T., GUENTHER, S., & WIELER, L. H. Extended-spectrum β -lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective. **Clinical Microbiology and Infection**, 18(7), 646-655. 2012

FAO. The state of world fisheries and aquaculture. Roma, 2012. 209p.

FERIA, C. Patterns and mechanisms of resistance to beta-lactams and beta-lactamase inhibitors in uropathogenic *Escherichia coli* isolated from dogs in Portugal. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, n. 1, p. 77–85, 2002.

FERREIRA, A. J. P.; KNÖBL, T. Enfermidades bacterianas. In: JÚNIOR BERCHIERI, A.; SILVA, NEPOMUCENO, E.; DI FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. **Doenças das aves. Campinas: Facta**, 2009. cap.4, p. 457-474.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. Qualidade do Leite e Controle de Mastite. **São Paulo: Lemos Editorial**, 2000.

FREITAG, C., MICHAEL, G. B., KADLEC, K., HASSEL, M., & SCHWARZ, S. Detection of plasmid-borne extended-spectrum β -lactamase (ESBL) genes in *Escherichia coli* isolates from bovine mastitis. **Veterinary microbiology**, 200, 151-156. 2017

GANDOLFI-DECRISTOPHORIS, P.; PETRINI, O.; RUGGERI-BERNARDI, N.; SCHELLING, E. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in healthy companion animals living in nursing homes and in the community. **Am J Infect Control**, Feb 16 2013.

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. **BMC veterinary research**, 8(1), 21. 2012

GESER N., STEPHAN R, KORCZAK BM, BEUTIN L, HÄCHLER H. Molecular identification of extended spectrum β -lactamase genes from Enterobacteriaceae isolated from healthy human carriers in Switzerland. **Antimicrob Agents Chemother.**;56(3): 1609-1612. 2012. 2

GONZALES, E.; MELLO, H. H. D. C.; CAFÉ, M. B. Uso de antibióticos promotores de crescimento na alimentação animal. **Revista UFG**, v. Ano XIII, n. 13, p. 06, 2012.

GUENTHER, S.; BETHE, A.; FRUTH, A.; SEMMLER, T.; ULRICH, R. G.; WIELER, L. H.; EWERS, C. Frequent combination of antimicrobial multiresistance and extraintestinal pathogenicity in *Escherichia coli* isolates from urban rats (*Rattus norvegicus*) in Berlin, Germany. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. e50331, 2012.

GUENTHER, S.; GROBBEL, M.; BEUTLICH, J.; GUERRA, B.; ULRICH, R. G.; WIELER, L. H.; EWERS, C. Detection of pandemic B2-O25-ST131 *Escherichia coli* harbouring the CTX-M-9 extended-spectrum beta-lactamase type in a feral urban brown rat (*Rattus norvegicus*). **J Antimicrob Chemother**, v. 65, n. 3, p. 582-4, Mar 2010.

GUNDOGAN N., AVCI E. Prevalence and antibiotic resistance of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species isolated from foods of animal origin in Turkey. **Afr. J. Microbiol. Res.** 2013; 7(31): 4059-64.

HAQUE A, YOSHIKUMI A, SAGA T, ISHII Y, TATEDA K. ESBL-producing Enterobacteriaceae in environmental water in Dhaka, Bangladesh. **J Infect Chemother.** 2014;20:735–737

HAWARI A.D., AL-DABBAS F. Prevalence and distribution of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Jordan. *AmJ Animal Vet Sci* 3: 36–9. 2008

HITCHINS, A. D.; HARTMAN, P. A.; TODD, E. C. D. Coliforms-*Escherichia coli* and its toxins. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**, v. 3, p. 325-69, 1992.

HOGAN, J.; SMITH, K. L. Coliform mastitis. *Veterinary Research*, **BioMed Central**, 2003, 34 (5), pp.507-519.

HORTON R.A., RANDALL L.P., SNARY E.L., COCKREM H., LOTZ S., WEARING H., et al. Fecal carriage and shedding density of CTX-M extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in cattle, chickens, and pigs: implications for environmental contamination and food production. **Appl Environ Microbiol** 2011; 77(11): 3715-9.

HUANG T.D., POIREL L., BOGAERTS, P., BERHIN, C., NORDMANN, P., GLUPCZYNSKI, Y. Temocillin and piperacillin/tazobactam resistance by disc diffusion as antimicrobial surrogate markers for the detection of carbapenemase- producing Enterobacteriaceae in geographical areas with a high prevalence of OXA- 48 producers. **J Antimicrob Chemother**. 2014;69:445-50

JEMIMA, S. A.; VERGHESE, S. Multiplex PCR for bla(CTX-M) & bla(SHV) in the extended spectrum beta lactamase (ESBL) producing gram-negative isolates. *Indian J Med Res*, v. 128, n. 3, p. 313-7, Sep 2008.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 2, p. 123-140, 2004.

KARP, B. E.; ENGBERG, J. Comment on: Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. **J Antimicrob Chemother**, v. 54, n. 1, p. 273-4; author reply 276-8, Jul 2004.

LAGO, A.; FUENTERIA, S. R.; FUENTEFRIA, D. B. Enterobactérias produtoras de ESBL em Passo Fundo Estado do Rio Grande do sul, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 4, p. 430-434, 2010.

LEHTOLAINEN T., SHWIMMER A., SHPIGEL N.Y., HONKANEN-BUZALSKI T., PYORALA S. In vitro antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolates from clinical bovine mastitis in Finland and Israel. **J Dairy Sci** 86: 3927–32. 2003

LIPMAN, L. J., DE NIJS, A., & GAASTRA, W. Isolation and identification of fimbriae and toxin production by *Escherichia coli* strains from cows with clinical mastitis. **Veterinary microbiology**, 47(1), 1-7.1995.

LOCATELLI C., SCACCABAROZZI L., PISONI G., MORONI P. CTX-M1 ESBLproducing *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* isolated from cases of bovine mastitis. **J. Clin. Microbiol.** 48:3822–3823. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00941-10>. 2010

LOCATELLI C., CARONTE I., SCACCABAROZZI L., MIGLIAVACCA R., PAGANI L., MORONI P. Extended-spectrum beta-lactamase production in *E. coli* strains isolated from clinical bovine mastitis. **Vet. Res. Commun.** 33(Suppl 1):S141–S144. <http://dx.doi.org/10.1007/s11259-009-9263-y>. 2009

LOUREIRO, R. J., ROQUE, F., RODRIGUES, A. T., HERDEIRO, M. T., & RAMALHEIRA, E. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**, 34(1), 77-84. 2016.

MACIEL, J. F. Caracterização genotípica e fenotípica de isolados de *Escherichia coli* oriundos de animais de produção. **Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Maria**. 2017

MADEC, J.-Y., C. LAZIZZERA, P. CHAÎTRE, D. MEUNIER, S. MARTIN, G. LEPAGE, M.-F. MEËNARD, P. LEBRETON, AND T. RAUMBAUD. Prevalence of fecal carriage of acquired expanded-spectrum cephalosporin resistance in *Enterobacteriaceae* strains from cattle in France. **J. Clin. Microbiol.** **46**:1566–1567. 2008.

MALMUTHUGE, N., & GUAN, L. L. Understanding the gut microbiome of dairy calves: Opportunities to improve early-life gut health 1. **Journal of Dairy Science**, 100(7), 5996–6005. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12239>. 2017

MARKS, S.; ROBERTS, L. D.; WELLS, J. G.; POTTER, M. E. *Escherichia coli* O157:H7 ranks as fourth most costly foodborne disease. **Special Reprint from Food Review**, v. 16, p.3, 1993.

MARTINEZ MB, TRABULSI LR. ENTEROBACTERIACEAE.IN: TRABULSI LR, ALTERTHUM F. **Microbiologia**. 5.ed. São Paulo: Atheneu; 2008. p.271-80.

MINARINI, L. A. R.; GALES, A. C.; PALAZZO, I. C. V.; DARINI, A. L. C. Prevalence of community- occurring extended spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Brazil. **Current Microbiology** , Berlim, v. 54, n. 5, p. 335-341, 2007.

MELLMANN, A.; BIELASZEWSKA, M.; KARCH, H. Intrahost genome alterations in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Gastroenterology**, v. 136, n. 6, p. 1925-1938, doi:10.1053/j.gastro.2008.12.072. May, 2009

MENG, J.; DOYLE, M. P.; ZHAO, T. Detection and control of *Escherichia coli* O157:H7 in foods. **Trends in food & Technology**, v. 51, p. 179-184, 1994.

M'ZALI, F. M.; GASCOYNE-BINZI, D. M.; HERITAGE, J.; HAWKEY, P. M. Detection of mutations conferring extended-spectrum activity on SHV / Beta-lactamases using polymerase chain reaction single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 37, n. 4, p. 797–802, 1996.

MOURA, A., HENRIQUES, I., SMALLA, K. & CORREIA, A. Wastewater bacterial communities bring together broad-host range plasmids, integrons and a wide diversity of uncharacterized gene cassettes. **Research in Microbiology**, vol. 161, 58–66. 2010

MUNOZ, M. A., F. L. WELCOME, Y. H. SCHUKKEN, AND R. N. ZADOKS. 2007. Molecular epidemiology of two *Klebsiella pneumoniae* mastitis outbreak on a dairy farm in New York State. **J. Clin. Microbiol.** **45**:3964–3971.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 11, p. 142-201, 1998

NJAGE P. M. K; DOLCI S; JANS C; WANGO H J; LACROIX C; MEILE L. Ampicillin resistance and extended spectrum β -lactamases in Enterobacteriaceae isolated from raw and spontaneously fermented camel milk. **Afr. J. Microbiol. Res.** 2012;6:1446-52.

NJAGE P.M., BUYS E.M. Pathogenic and commensal *Escherichia coli* from irrigation water show potential in transmission of extended spectrum and AmpC β -lactamases determinants to isolates from lettuce. **Microb Biotechnol** 2015; 8: 462-73.

ODENTHAL, S., AKINEDEN, Ö., & USLEBER, E. (2016). Extended-spectrum β -lactamase producing Enterobacteriaceae in bulk tank milk from German dairy farms. **International journal of food microbiology**, 238, 72-78.

OLIVEIRA, W. A. et al. Principais bactérias gram-negativas isoladas de mastite bovina e seu perfil de resistência a antimicrobianos em propriedades do município de Uberaba, estado de Minas Gerais, Brasil. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 14, n. 3, p. 83-83, 2016.

OLIVER SP, MURINDA SE. Antimicrobial resistance of mastitis pathogens. **Vet Clin North Am Food Anim Pract.** 2012;28:165-85.

ORÚS, P. et al. Increasing Antibiotic Resistance in Preservative-Tolerant Bacterial Strains Isolated from Cosmetic Products. **International Microbiology**, n.18, p. 51- 59, 2015

PAGANI, L., DELL'AMICO, E., MIGLIAVACCA, R., D'ANDREA, M. M., GIACOBONE, E., AMICOSANTE, G., ... & ROSSOLINI, G. M. (2003). Multiple CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases in nosocomial isolates of Enterobacteriaceae from a hospital in northern Italy. **Journal of Clinical Microbiology**, 41(9), 4264-4269.

PAPHITOU, N. I. Antimicrobial resistance: action to combat the rising microbial challenges. **Int J Antimicrob Ag**, v. 42 Suppl, p. S25-8, Jun 2013

PASSEY, S., BRADLEY, A., & MELLOR, H. *Escherichia coli* isolated from bovine mastitis invade mammary cells by a modified endocytic pathway. *Veterinary microbiology*, 130(1), 151-164. 2008.

PATERSON, D. L.; HUJER, K. M.; HUJER, A. M.; YEISER, B.; BONOMO, M. D.; RICE, L. B.; BONOMO, R. A. Extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence of SHV- and CTX-M-type beta-lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 47, n. 11, p. 3554-60, Nov 2003.

PATERSON D. L. Resistance in gram-negative bacteria: enterobacteriaceae. **The American Journal of Medicine**, 119 (6 Suppl 1): S20-28; discussion S62-70. 2006

PERES, N. D. et al. Detecção de *Listeria monocytogenes* pela técnica de PCR em leite contaminado artificialmente. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte. v. 62, n. 4, p. 973-979. 2010.

PEIRANO, G.; SEKI, L. M.; VAL PASSOS, V. L.; PINTO, M. C.; GUERRA, L. R.; ASENSI, M. D. Carbapenem-hydrolysing beta-lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. **J Antimicrob Chemother**, v. 63, n. 2, p. 265-8, Feb 2009.

PEIRANO, G.; ASENSI, M. D.; PITONDO-SILVA, A.; PITOUT, J. D. Molecular characteristics of extended- Spectrum β -lactamase-producing *Escherichia Coli* from Rio de Janeiro, Brazil. **Clinical Microbiology and Infection**, London, v. 17, n. 7, p. 1039-1043, 2011.

PEDROSO, J. A. R., PASKULIN, D. D. A., DIAS, F. S., FRANÇA, E. D., & ALHO, C. S. (2010). Temporal trends in acute renal dysfunction among critically ill patients according to I/D and-262A> T ACE polymorphisms. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, 32(2), 182-194.

PHILPOT, W.N; NICKERSON, S.C. **Mastitis: counter attack**. Babson Bros Co, 150p. 1991.

RADOSTITS, O.M; GAY, C.C.; BLOOD, D.C. et al. Clínica Veterinária, um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos. 9.ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2002. 1770p.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; HINCHCLIFF, K.W. et al. (Eds). Veterinary medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats. 10.ed. **Philadelphia: Saunders**, 2007. p.673-762.

RANGEL, P. M. Perfil genético e microbiológico de cepas de *Escherichia coli* isoladas de leite mastítico bovino. 2007. xii, 58 f. **Dissertações (Mestrado)- Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias**, 2007.

RANGEL, P. AND MARIN, J. M. Analysis of *Escherichia coli* isolated from bovine mastitic milk. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, 29(5): 363-368. 2009.

RIBEIRO M. G., LANGONI H., DOMINGUES P. F. & PANTOJA J.C.F. Mastite em animais domésticos, p.1155-1205. In: Megid J., Ribeiro M.G. & Paes A.C. (Eds), **Doenças Infecciosas em Animais de Produção e de Companhia**. Roca, Rio de Janeiro. 2016.

RASHEED, H. U.; THAJUDDIN, N.; AHAMED, P.; TEKLEMARIAM, Z.; JAMIL, K. Antimicrobial drug resistance in strains of *Escherichia coli* isolated from food sources. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 4. doi: 10.1590/S0036- 46652014000400012. 2014

RIBEIRO, M.G.; MOTTA, R.G.; PAES, A.C. et al. Peracute bovine mastitis caused by *Klebsiella pneumoniae*. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.60, p.485-488, 2008.

RIBEIRO, M.G.; COSTA, E.O.; LEITE, D.S. et al. Fatores de virulência em linhagens de *Escherichia coli* isoladas de mastite bovina. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.58, p.724-731, 2006.

RIBEIRO, M. G.; PINTO, J. P. A. N.; SILVA, E. O. T. R. De hambúrguer, leite, e outros gêneros alimentícios à colite hemorrágica e síndrome urêmico-hemolítica. **Hig. Aliment.**;13(66-67):88-97. 1999

ROCHA, B., MENDONÇA, D., & NIZA-RIBEIRO, J. Trends in Antibacterial Resistance of Major Bovine Mastitis Pathogens in Portugal. **RCPV**, 109, 79-88. 2014.

ROSSI, R., MENOZZI, B. D., & LANGONI, H.. Parâmetros de qualidade do leite bovino em. **Pesq. Vet. Bras**, 38(4), 573-578. 2018.

RUPP M. E, FEY P. D. Extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae: considerations for diagnosis, prevention and drug treatment. **Drugs.**;63:353–365. 2003

RYU S.H., LEE J.H., PARK S.H., SONG M.O., PARK S.H., JUNG H.W., et al. Antimicrobial resistance profiles among *Escherichia coli* strains isolated from commercial and cooked foods. **Int J Food Microbiol** 2012; 159: 263-6.

SANTOS, M. V.; LEITE, R. F. Mastite clínica por *Streptococcus uberis*: Falhas no tratamento ou nova infecção? www.milkpoint.com.br/colunas/marco-veiga-dos-santos/mastite-clinica-por-streptococcus-uberis-falhas-no-tratamentoouovainfeccao-205478n.aspx. 2014

SALYERS, A. A., SHOEMAKER, N. B., STEVENS, A. M., & LI, L. Y. Conjugative transposons: an unusual and diverse set of integrated gene transfer elements. **Microbiological reviews**, 59(4), 579-590. 1995.

SADER H. S. Principais problemas de resistência bacteriana encontrados pelo Programa SENTRY no Brasil. **SENTRY News**, v. 2, p. 1-7, 2000^a.

SAINI, V., MCCLURE, J. T., SCHOLL, D. T., DEVRIES, T. J., & BARKEMA, H. W.. Herd-level association between antimicrobial use and antimicrobial resistance in bovine mastitis *Staphylococcus aureus* isolates on Canadian dairy farms. **Journal of Dairy Science**, 95(4), 1921-1929. 2012

SAMPIMON OC, SAOL J, KOCK PA. An outbreak of *Klebsiella pneumoniae* mastitis. **Tijdschr Diergeneeskde**. 2006; 131:2-4.

SCALCO, A. R.; TOLEDO, J. C. Um modelo para gerenciar a qualidade na cadeia de produção do leite. In: **Encontro Nacional De Engenharia De Produção**, 22., 2002, Curitiba. Anais... Curitiba: ENEGEP, 2002.

SCHWABER MJ, GRAHAM CS, SANDS BE, GOLD HS, CARMELI Y. Treatment with a broad-spectrum cephalosporin versus piperacillin-tazobactam and the risk for isolation of broad-spectrum cephalosporin-resistant *Enterobacter* species. **Antimicrob Agents Chemother** 2003; 47:1882-1886.

SEVERIN JA, MERTANIASIH NM, KUNTAMAN K, LESTARI ES, PURWANTA M, LEMMENS-DEN TOOM N, DUERINK DO, HADI U, VAN BELKUM A, VERBRUGH HA, GOESSENS WH, Study Group 'Antimicrobial Resistance in Indonesia: **Prevalence and Prevention**' (AMRIN). Molecular

SCHUKKEN Y. H., POMEROY B., SIPKA A. New Developments in Bovine Mastitis: **International Summit on Dairy Cattle – Health and Innovation**, Rome, Italy. 2017

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo. Varela, 1997. 295p.

SILVA, K. C.; LINCOPAN, N. Epidemiologia das betalactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio. **J. Bras Patol Med Lab**. v. 48, n. 2, p. 91-99. Abril 2012.

SIQUEIRA, A. K. et. al. Resistência antimicrobiana em coliformes totais isolados de tanques de refrigeração de leite bovino. **Atas de Saúde Ambiental-ASA** (ISSN 2357-7614), 2(3), 2-15. 2015

SMITH, D. L.; HARRIS, A. D.; JOHNSON, J. A.; SILBERGELD, E. K.; MORRIS, J. G., JR. Animal antibiotic use has an early but important impact on the emergence of antibiotic resistance in human commensal bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 9, p. 6434-9, Apr 30 2002.

SRINIVASAN V., GILLESPIE B.E., LEWIS M.J., NGUVEN L.T., HEADRICK S.J., SCHUKKEN Y.H., OLIVER S.P. Phenotypic and genotypic antimicrobial resistance patterns of *Escherichia coli* isolated from dairy cows with mastitis. **Vet Microbiol** **124**: 319–28. 2007

SU, Y., et al. Fluoroquinolone-resistant and extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* from the milk of cows with clinical mastitis in Southern Taiwan. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, 2014.

SZABO, R. A., TODD, E. C., JEAN, A. Method to Isolate *Escherichia coli* O157. H7 from Food. **Journal of Food Protection**, 49(10), 768-772. 1986.

TAVARES, W. **Manual de quimioterápicos antinfeciosos**. Rio de Janeiro: Atheneu, 1990. 770p.

TEKINER, İ. H., & ÖZPINAR, H. (2016). Occurrence and characteristics of extended spectrum beta-lactamases-producing Enterobacteriaceae from foods of animal origin. **Brazilian journal of microbiology**, 47(2), 444-451.

TIMOFTE, D., MACIUCA, I. E., EVANS, N. J., WILLIAMS, H., WATTRET, A., FICK, J. C., & WILLIAMS, N. J. (2014). Detection and molecular characterization of *Escherichia coli* CTX-M-15 and *Klebsiella pneumoniae* SHV-12 β -lactamases from

bovine mastitis isolates in the United Kingdom. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 58(2), 789-794.

TODAR K., Todar's online text book of bacteriology. 2011. Available From: <http://www.textbookofbacteriology.net>

TRABULSI, L. R.; KELLER, R.; GOMES, T. A. T. **Typical and atypical Enteropathogenic Escherichia coli**. *Emerg. Infect. Dis.*, v. 8, p. 508-513, 2002.

VAN BOECKEL, T. P.; BROWER, C.; GILBERT, M.; GRENFELL, B. T.; LEVIN, S. A.; ROBINSON, T. P.; TEILLANT, A.; LAXMINARAYAN, R. Global trends in antimicrobial use in food animals. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 112, n. 18, p. 5649-54, May 5 2015.

VAN DEN BOGARD A. E.; STOBBERINGH E. E.; Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. **Int J Antimicrob Agents**. 2000;14:327-35.

VAN LOO, I.; HUIJSDENS, X.; TIEMERSMA, E.; DE NEELING, A.; VAN DE SANDEBRUINSMA, N.; BEAUJEAN, D.; VOSS, A.; KLUYTMANS, J. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of animal origin in humans. **Emerg Infect Dis**, v. 13, n. 12, p. 1834-9, Dec 2007.

VIEIRA, V. A., DE OLIVEIRA, N. J. F., DE ALMEIDA, A. C., PEREIRA, A. A., & FÉLIX, T. M. Práticas de uso de antimicrobianos em rebanhos bovinos de unidades de agricultura familiar no Norte de Minas Gerais. **Caderno de Ciências Agrárias**, 8(1), 8-15. 2016

VIEIRA A.R., COLLIGNON P., AARESTRUP F.M., MCEWEN S.C., HENDRIKSEN R.S., HALD T, WEGENER H.C. Association between antimicrobial resistance in *E. coli* isolates from food animals and blood stream isolates from humans in Europe: An ecological study. **Foodborne Pathog Dis**. 2011; 8:1295-1301.

VILELA, D.; LEITE, J. L. B.; RESENDE, J. C. Políticas para o leite no Brasil: passado presente e futuro. In: Santos, G. T.; Jobim, C. C.; Damasceno, J. C. **Sul-Leite Simpósio sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil**, 2002, Maringá. Anais. Maringá: UEM/CCA/DZONUPEL, 2002.

WANNAPRASAT, W.; PADUNGTO, P.; CHUANHUEN, R. Class 1 integrons and virulence genes in *Salmonella enterica* isolates from pork and humans. **Int J Antimicrob Ag**, v. 37, n. 5, p. 457-61, May 2011.

WEDLEY, A. L.; MADDOX, T. W.; WESTGARTH, C.; COYNE, K. P.; PINCHBECK, G. L.; WILLIAMS, N. J.; DAWSON, S. Prevalence of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* in dogs in a cross-sectional, community-based study. **Vet. Rec.**, v. 168, n. 13, p. 354, Apr 2 2011.

WELDHAGEN, G. F. Integrons and β -lactamases- a novel perspective on resistance. **Int J Antimicrob Agents**, v. 23, n. 6, p. 556-62, 2004.

WENZ JR, BARRINGTON GM, GARRY FB, MCSWEENEY KD, DINSMORE RP, GOODELL G, CALLAN RJ. Bacteremia associated with naturally occurring acute coliform mastitis in dairy cattle. **J Am Vet Med Assoc**. 2001; 219:976-81.

WOLLHEIM, C. Epidemiologia molecular de *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp produtoras de beta-lactamase de espectro ampliado. **Programa de Doutorado Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul**. 2014

WU G., DAY M.J., MAFURA M.T, NUNEZ-GARCIA J., FENNER J.J., SHARMA M., et al. Comparative analysis of ESBL-positive *Escherichia coli* isolates from animals and humans from the UK, the Netherlands and Germany. **Plos One** 2013; 8(9): e75392.

YAMAMURA, A. A. M. et al. Isolamento de *Prototheca* spp. de vacas com mastite, de leite de tanques de expansão e do ambiente dos animais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28, n. 1, p. 105-114, 2007. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2007v28n1p105>

ZAR, H.J.; COTTON, M.F. Nosocomial pneumonia in pediatric patients: practical problems and rational solutions. **Paediatr Drugs** 2002; 4:73-83.

ZEINHOMA, MOHAMED MA, ABDEL- LATEFB, GIHAN K. Risco para a saúde pública de alguns patógenos do leite. **Universidade Beni-Suef J Basic App Scienc** 2014; 3 (3): 209-215. 2014

ZURFLUH K., HÄCHLER H., NÜESCH-INDERBINEN M., STEPHAN R. Characteristics of extended spectrum β -lactamase- and carbapenemase producing Enterobacteriaceae isolates from rivers and lakes in Switzerland. **Appl Environ Microbiol** 2013; 79: 3021-6.

ANEXO 1

RESULTADOS DA TRIAGEM A PARTIR DE TESTE GENOTÍPICO (PCR) DAS AMOSTRAS DE LEITE DO TANQUE DE EXPANSÃO, PROVENIENTES DAS PROPRIEDADES DO OESTE DO PARANÁ. P= AMOSTRAS POSITIVAS E N= AMOSTRAS NEGATIVAS.

PROPR.	ESBL	CTX	SHV	TEM	OXA	PROPR.	ESBL	CTX	SHV	TEM	OXA
1	n	n	n	n	n	36	n	p	n	n	n
2	n	n	n	n	n	37	P	p	n	n	n
3	n	n	n	n	n	38	P	n	n	n	n
4	n	n	n	n	n	39	P	n	n	n	n
5	n	n	n	n	n	40	n	n	n	n	n
6	n	n	n	n	n	41	n	n	n	n	n
7	n	p	n	n	n	42	n	n	n	n	n
8	n	n	n	n	n	43	P	p	n	n	n
9	n	n	n	n	n	44	P	n	n	n	n
10	n	n	n	n	n	45	n	n	n	n	n
11	n	n	n	n	n	46	n	n	n	n	n
12	n	n	n	n	n	47	n	n	n	n	n
13	n	n	n	n	n	48	n	n	n	n	n
14	n	n	n	n	n	49	n	n	n	n	n
16	n	n	n	n	n	50	n	n	n	n	n
17	P	n	n	n	n	51	n	n	n	n	n
18	n	n	n	n	n	52	n	n	n	n	n
19	P	n	n	n	n	53	n	n	n	n	n
20	n	n	n	n	n	54	n	n	n	n	n
21	P	p	n	n	n	55	P	n	n	n	n
22	P	n	p	n	n	56	n	n	n	n	n
23	P	p	n	p	n	57	n	n	n	n	n
24	P	p	n	n	n	58	P	p	n	n	n
25	n	n	n	n	n	59	n	n	n	n	n
26	n	n	n	n	n	60	n	n	n	n	n
27	n	n	n	n	n	61	n	n	n	n	n
28	n	n	n	n	n	62	n	n	n	n	n
29	P	n	n	n	n	63	P	n	n	n	n

30	n	n	n	n	n	64	n	n	n	n	n
31	P	n	n	n	n	65	n	n	n	n	n
32	P	n	n	n	n	66	P	n	p	n	n
33	P	n	p	n	n	67	n	n	n	n	n
34	P	p	n	n	n	68	n	n	n	n	n
35	P	n	n	n	n	69	n	n	n	n	n
						70	n	n	n	n	n

ANEXO 2

Questionário Epidemiológico**1. Identificação**

Entrevista feita em: / / Realizada por: _____

Identificação do rebanho: _____

Propriedade e Proprietário: _____

Tel: _____

Endereço, Cidade: _____

2. Características Gerais do Rebanho

2.1 Número de vacas em lactação:

1. Até 5 ()
2. 5 -l 10 ()
3. 10 –l 20 ()
4. + 20 () _____

2.2 Produção total de Leite por dia:

1. Até 100 L ()
2. 100L-l 200 L ()
3. 200L –l 400L ()
4. + 400L () _____

2.3 Sistema de produção: 1.() Semiestabulado 2.() Intensivo 3.() Pasto

2.4 Raça predominante no rebanho:

1. Girolanda ()
2. Holandês ()
3. Gir ()
4. Jersey ()
5. Sem raça ()
6. Outros ()

2.5 Tipo de ordenha: 1.() Mecânica 2.() Manual

2.6 Presença do bezerro na hora da ordenha: 1. Sim () 2. Não () _____

3. Estrutura da Propriedade

3.1 Local da ordenha: 1. ☐ Curral 2. ☐ Sala de ordenha 3. ☐ Outros

3.2 Quando mecânica: 1. ☐ Balde ao pé 2. ☐ Sistema canalizado

3.3 Quantas ordenhas por dia: 1. ☐ uma 2. ☐ duas 3. ☐ três

3.4 Armazenamento do leite:

1. ☐ Tanque de expansão 2. ☐ Baldes 3. ☐ Tanque comunitários

4. Controle de Prevenção de mastite

4.1 Há acompanhamento do rebanho por um técnico?

1. ☐ Veterinário 2. ☐ Agrônomo 3. ☐ Técnico agrícola 4. ☐ Zootecnista 5. ☐ Não há

4.2 Faz teste de CMT ou Fundo de caneco escuro ? 1. ☐ CMT 2. ☐ Caneco 3. ☐ Não faz

4.3 Lava/desinfeta os tetos antes da ordenha?

1. ☐ Sim 2. ☐ Não 3. ☐ Quando precisa

4.4 O que usa para secar os tetos?

1. ☐ Pano 2. ☐ Papel toalha 3. ☐ Não seca

4.5 Depois da ordenha, desinfeta os tetos ?

1. ☐ sim 2. ☐ não

4.6 As vacas são alimentadas logo após a ordenha ? 1. ☐ Sim 2. ☐ Não

4.7 Realiza o tratamento imediato de todos os casos clínicos de mastite?

1. ☐ Sim 2. ☐ Não

4.8 Existe descarte das vacas?

1. ☐ Sim 2. ☐ Não

4.9 Qual o critério(quando ocorre)?

1. ☐ animal doente 2. ☐ animal velho 3. ☐ baixa produção

4.10 Existem animais com infecções persistentes ?

1. ☐ sim 2. ☐ não

4.11 Qual tratamento utilizado e dose?

4.12 Faz exames microbiológicos? 1. ☐ Sim 2. ☐ Não

4.13 Qual a finalidade destes exames?

1. ☐ Patógeno 2. ☐ Resistência 3. ☐ ambos

5. Aplicação de antibióticos

5.1 Quais são os casos que utilizam antibióticos?

1. () Diarreia 2. () Metrite 3. () Pneumonia 4. () Doença do casco 5. ()

Outros _____

5.2 Usa protocolos de tratamento para mastite? Qual ?

5.3 Quem recomenda os antimicrobianos ? _____

5.4 Faz controle (registra/anota) os tratamentos já realizados ?

1. () sim 2. () não

5.5 Usa algum antimicrobiano que não seja veterinário ?

1. () sim 2. () não

5.6 Qual é a quantidade de tratamentos feito por mês para mastite?

5.7 _____

5.8 Varia sempre os antibióticos(nome/ princípio ativo)? Quais utiliza?

5.9 _____

5.10 Produção orgânica ? anotar os compostos usados

5.11 _____

6. Verificação da disseminação de bactérias

6.1 Consumo de leite cru ? 1. () Sim 2. () Não

6.2 O leite é usado para produção de derivados na propriedade ?

1. () Sim 2. () Não

6.3 Vende animais frequentemente ? 1. () Sim 2. () Não

6.4 Lava-se a mão para manipulação dos animais ? 1. () Sim 2. () Não

6.5 Qual a frequência durante a ordenha? _____

6.6 O que usa para lavar as mãos? 1. () Sabão 2. () Somente água 3. ()

Outros

6.7 Alguém já teve alguma doença de difícil tratamento com antibióticos ?

6.8 _____

6.9 Houve internamento ou cirurgia no último ano ? 1. () Sim 2. () Não

6.10 Se sim para a pergunta anterior, perguntar: houve dificuldades no processo? (tempo de internamento prolongado , complicações, infecções)

6.11 _____

6.12 Usa/usou antibióticos nos últimos 6 meses ?

1. () sim 2. () não

6.13 E no último ano? qual ?

_____ Observações do avaliador quanto ao rebanho, manipulação e estado da
propriedade:
