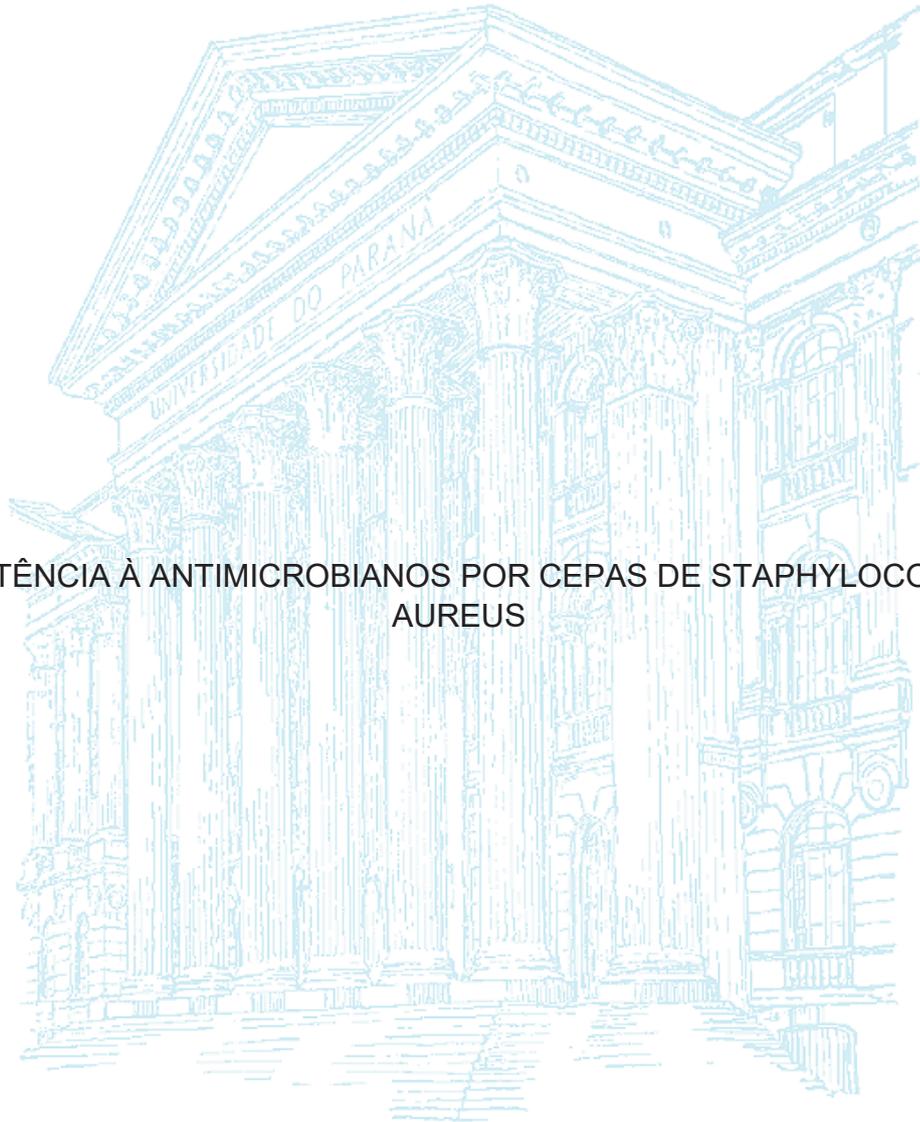


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FERNANDA PISTORI MACHADO

RESISTÊNCIA À ANTIMICROBIANOS POR CEPAS DE STAPHYLOCOCCUS
AUREUS



CURITIBA

2023

FERNANDA PISTORI MACHADO

RESISTÊNCIA À ANTIMICROBIANOS POR CEPAS DE STAPHYLOCOCCUS
AUREUS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Saúde Única, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências Veterinárias.
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Julia Arantes Galvão

CURITIBA

2023

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

Machado, Fernanda Pistori

Resistência à antimicrobianos por cepas de *Staphylococcus aureus*/ Fernanda Pistori Machado. – Curitiba, 2023.

1 recurso online: PDF.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Orientadora: Profª Drª Julia Arantes Galvão

1. Mastite. 2. Bactérias. 3. Metilina. 4. Bovinos - Doenças. I. Galvão, Julia Arantes. II. Universidade Federal do Paraná. Programa Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

Bibliotecária: Telma Terezinha Stresser de Assis CRB-9/944



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS - 40001016023P3

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS VETERINÁRIAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **FERNANDA PISTORI MACHADO** intitulada: **Resistência à antimicrobianos por cepas de *Staphylococcus aureus***, sob orientação da Profa. Dra. JULIA ARANTES GALVÃO, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutora está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 07 de Julho de 2023.

Assinatura Eletrônica

10/07/2023 09:51:15.0

JULIA ARANTES GALVÃO

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

12/07/2023 12:01:48.0

KATE APARECIDA BUZI

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE)

Assinatura Eletrônica

04/08/2023 13:34:25.0

CARLOS HENRIQUE CAMARGO

Avaliador Externo (INSTITUTO ADOLFO LUTZ)

Assinatura Eletrônica

10/07/2023 15:58:41.0

JULIANA SPEROTTO BRUM

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

04/08/2023 10:09:59.0

CIBELI VIANA

Avaliador Externo (CENTRO UNIVERSITÁRIO AVANTIS)

RUA DOS FUNCIONÁRIOS, 1540 - CURITIBA - Paraná -
Brasil

CEP 80035050 - Tel: (41) 3350-5621 - E-mail: cpgcv@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 297975

Para autenticar este documento/assinatura, acesse

<https://siga.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 297975

Se quiser triunfar na vida, faça da perseverança a sua melhor amiga; da experiência, o seu conselheiro; da prudência, o seu irmão mais velho; e da esperança, o seu anjo da guarda.

Joseph Addison.

AGRADECIMENTOS

Foram quatro anos de uma aventura de autodescoberta e crescimento, tanto pessoal quanto profissional. O doutorado, para mim, foi muito mais que uma pesquisa científica, significou uma jornada de amadurecimento e consolidação de minha trajetória como veterinária. Essa jornada foi realizada com muitas inseguranças e angústias, mas também com superação de obstáculos. E, sem o apoio e suporte de muitas pessoas, este percurso não poderia ter sido realizado.

Inicialmente quero agradecer a Deus, meu referencial e orientador espiritual.

Ao meu esposo Ismail, que mesmo com uma doutoranda a beira da loucura a seu lado, não perdeu a doçura, me amparou e ficou sempre ao meu lado.

Aos meus pais, Roseli e Gilmar, devo agradecimentos eternos. Não só essa, mas todas as minhas conquistas só foram possíveis por conta do apoio incondicional que sempre tive. Amo vocês! Também quero agradecer meu irmão William, que mesmo longe me deu o maior apoio.

A minha professora e orientadora Julia Arantes Galvão, que foi um anjo em minha vida, me amparou na fase mais difícil do meu doutorado. Agradeço a orientação inegavelmente eficiente e segura, pelas valiosas sugestões e por não me deixar desistir.

Aos amigos que me acompanharam durante o mestrado e doutorado, Pedrinho e Laís, que me ajudaram a passar por esses momentos importantes e ao mesmo tempo conturbados.

A Universidade Federal do Paraná, pública e de qualidade, por todas as oportunidades de aprendizado, formais e informais.

A banca examinadora, Doutores Carlos Henrique Camargo, Cibeli Viana, Kate Aparecida Buzi e Juliana Sperotto Brum pela disponibilidade e atenção.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de estudos.

Dedico e agradeço também aos animais coletados e as pessoas por aceitarem participar da pesquisa, e todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para que esse estudo pudesse acontecer.

RESUMO

A bovinocultura leiteira possui enorme relevância para a economia do Brasil, uma vez que o país é o terceiro maior produtor de leite do mundo, com uma média de 34,8 bilhões de litros/ano, com produção em 98% dos municípios brasileiros, sendo predominante em pequenas e médias propriedades e empregando cerca de 4 milhões de trabalhadores. A mastite em vacas leiteiras é a doença mais importante na indústria de laticínios em todo mundo, é a maior responsável pelo uso de antimicrobianos em fazendas leiteiras, tanto durante o período de lactação quanto no período seco, para o tratamento e prevenção da mastite. A bactéria *Staphylococcus aureus* é relacionada como a causa mais frequente de mastite contagiosa em todo o mundo, sendo capaz de colonizar a glândula mamária de ruminantes e sobreviver por longos períodos. É um agente patogênico que varia em termos de infecções e hospedeiros, o que o torna uma ameaça à saúde animal e humana, pois produz toxinas relacionadas à resistência aos antimicrobianos, e à gravidade dos sintomas das infecções intramamárias. A presença de mastite nos rebanhos leiteiros propicia riscos à saúde pública, visto que o leite contaminado pode carrear tanto micro-organismos patogênicos ao homem quanto resíduos de antibióticos que comprometem a eficácia destes medicamentos no tratamento de doenças humanas. Outra implicação, está relacionada à existência de cepas resistentes a antimicrobianos e a capacidade da transferência dos genes de resistência a seres humanos, a exemplo da metilina. A resistência a metilina é um dos principais tipos de resistência do gênero *Staphylococcus*. Tal resistência está relacionada à transferência horizontal do gene *mecA*, que implica na resistência destes microrganismos a toda a classe dos betalactâmicos. Na maioria dos isolados de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina (MRSA), a resistência a classe dos beta-lactâmicos é apresentada de forma peculiar e heterogênea, sendo a detecção do gene *mecA* o padrão ouro para a detecção deste tipo de resistência. MRSA não são comumente descritos em animais, no entanto, nos últimos anos, há registros do aumento de casos de infecções em animais domésticos, sugerindo que as infecções mamárias por MRSA, em bovinos leiteiros, podem ser consideradas um sério problema no campo leiteiro. Devido ao aumento nas taxas de ocorrências, mudanças no modelo epidemiológico das cepas MRSA e as adversidades no tratamento das infecções ocasionadas pela bactéria *S. aureus*, esta vem sendo colocada em destaque dentre os micro-organismos de importância médica e de imenso desafio à saúde pública mundial, uma vez que linhagens de MRSA são frequentemente identificadas como causadoras de infecções hospitalares, inclusive nas unidades de terapia intensiva (UTIs). Considerando este cenário, o presente estudo tem como objetivo detectar a presença dos genes *mecA* e *mecC* por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), a partir de DNA genômico extraído de cepas de *S. aureus* provenientes de amostras de leite e mão de ordenhador de diferentes propriedades rurais localizadas na área rural de São José dos Pinhais/ PR.

Palavras-chave: mastite; *Staphylococcus aureus*; resistência bacteriana; MRSA.

ABSTRACT

Dairy farming has enormous relevance for the economy of Brazil, since the country is the third largest producer of milk in the world, with an average of 34.8 billion liters/year, with production in 98% of Brazilian municipalities, with predominant in small and medium properties and employing around 4 million workers. Mastitis in dairy cows is the most important disease in the dairy industry worldwide, it is the main responsible for the use of antimicrobials in dairy farms, both during the lactation period and in the dry period, for the treatment and prevention of mastitis. The bacterium *Staphylococcus aureus* is listed as the most frequent cause of contagious mastitis worldwide, being able to colonize the mammary gland of ruminants and survive for long periods. It is a pathogenic agent that varies in terms of infections and hosts, which makes it a threat to animal and human health, as it produces toxins related to antimicrobial resistance and the severity of symptoms of intramammary infections. The presence of mastitis in dairy herds poses risks to public health since contaminated milk can carry both human pathogenic microorganisms and antibiotic residues that compromise the effectiveness of these drugs in the treatment of human diseases. Another implication is related to the existence of antimicrobial resistant strains and the ability to transfer resistance genes to humans, such as methicillin. Methicillin resistance is one of the main types of resistance in the genus *Staphylococcus*. Such resistance is related to the horizontal transfer of the *mecA* gene, which implies the resistance of these microorganisms to the entire class of beta-lactams. In most isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), resistance to the beta-lactam class is presented in a peculiar and heterogeneous way, with the detection of the *mecA* gene being the gold standard for detecting this type of resistance. MRSA are not commonly described in animals, however, in recent years, there are records of increased cases of infections in domestic animals, suggesting that mammary infections by MRSA in dairy cattle can be considered a serious problem in the dairy field. Due to the increase in occurrence rates, changes in the epidemiological model of MRSA strains and the adversities in the treatment of infections caused by the *S. aureus* bacteria, this has been highlighted among microorganisms of medical importance and an immense challenge to public health worldwide, since MRSA strains are frequently identified as causing nosocomial infections, including in intensive care units (ICUs). Considering this scenario, the present study aims to detect the presence of the *mecA* and *mecC* genes by means of the polymerase chain reaction (PCR), from genomic DNA extracted from strains of *S. aureus* from milk and hand samples. milker from different rural properties located in the rural area of São José dos Pinhais/PR.

Keywords: mastitis; *Staphylococcus aureus*; bacterial resistance; MRSA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Dendrograma – genotipagem REP-PCR	55
----------	---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Achados de positividade de <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à meticilina (MRSA) no leite no período de 2015 a 2020-----	31
Tabela 2	Sequências de primers para PCR e seus respectivos tamanhos de <i>amplicons</i> em pares de bases (pb) e referências-----	50
Tabela 3	Produção de leite/dia e produtividade de vacas em amostras de propriedades de produção leiteira de São José dos Pinhais-PR, Brasil-----	54
Tabela 4	Contagens de <i>Staphylococcus coagulase</i> positiva em amostras de produção leiteira de São José dos Pinhais-PR, Brasil-----	56
Tabela 5	Distribuição da positividade genotípica para identificação de <i>S. aureus</i> e resistência a antibióticos entre as amostras analisadas-----	57

LISTA DE ABREVIATURAS

CCS	Contagem eletrônica de células somáticas
CIM	Concentração inibitória mínima
DNA	Ácido desoxirribonucleico
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LMR	Limites máximos permitidos de resíduos
MAPA	Ministério da Agricultura e Pecuária
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PCRL	Plano nacional de controle de resíduos
PR	Paraná
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
UTIs	Unidade de terapia intensiva

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO -----	12
OBJETIVO GERAL-----	20
OBJETIVO ESPECÍFICO-----	20
1.STAPHYLOCOCCUS AUREUS RESISTENTES À METICILINA (MRSA) NO LEITE-----	21
1.1 INTRODUÇÃO-----	22
1.2 REVISÃO DE LITERATURA-----	23
1.2.1 STAPHYLOCOCCUS SPP.-----	23
1.2.2 STAPHYLOCOCCUS SPP. RESISTENTES À METICILINA (MRSA) -----	25
1.2.3 STAPHYLOCOCCUS SPP. RESISTENTES À METICILINA EM CASOS DE MASTITE BOVINA: ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E CLÍNICOS -----	27
1.2.4 TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO DA MASTITE CAUSADA POR MRSA---	31
1.2.5 CONTROLE E PREVENÇÃO -----	33
1.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS -----	33
1.4 AGRADECIMENTO -----	34
1.5 DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSES -----	34
1.6 REFERÊNCIAS -----	34
2. STAPHYLOCOCCUS AUREUS RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS NO MANEJO FAMILIAR DE PRODUÇÃO LEITEIRA -----	46
2.1 INTRODUÇÃO-----	47
2.2 MATERIAL E MÉTODOS-----	49
2.2.1 APROVAÇÃO ÉTICA-----	49
2.2.2 ÁREA DE ESTUDO-----	49
2.2.3 COLETA DE AMOSTRAS -----	49
2.2.4 ISOLAMENTO BACTERIANO-----	50
2.2.5 EXTRAÇÃO DE DNA E CONFIRMAÇÃO DE S. AUREUS-----	50
2.2.6 TESTE DE SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA -----	52
2.2.7 GENOTIPAGEM REP-PCR-----	52
2.3 RESULTADOS -----	53
2.4 DISCUSSÃO -----	57

2.5 CONCLUSÃO-----	60
2.6 DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSES -----	61
2.7 AGRADECIMENTOS-----	61
2.8 REFERÊNCIAS -----	61
3. LISTA DE REFERÊNCIAS-----	66
APÊNDICE 1-----	84
APÊNDICE 2-----	85

INTRODUÇÃO

A produção de leite é um dos ramos mais importantes do agronegócio brasileiro, representando o terceiro maior produtor mundial de leite, com uma média de 34,8 bilhões de litros/ano, com produção em 98% dos municípios brasileiros, sendo predominante em pequenas e médias propriedades e empregando cerca de 4 milhões de trabalhadores (MAPA, 2023).

O volume de leite produzido em 2020 (34,8 bilhões de litros) foi o segundo maior da história, ficando abaixo apenas ao de 2014 (35,1 bilhões de litros). Comparado ao ano de 2018, a produção nacional de leite cresceu 2,7%, enquanto o efetivo de vacas ordenhadas (16,3 milhões) caiu 0,5%, resultando numa produtividade de 2.141 litros de leite/vaca/ano (IBGE, 2020).

Na pecuária leiteira, a mastite é uma das principais enfermidades que afeta a produtividade de vacas leiteiras, resultando em significantes perdas econômicas (Menezes, Milhomem e Silva, 2023), tanto para os produtores rurais quanto para a indústria de produtos lácteos, devido à redução na quantidade e qualidade do leite (Langoni et al., 2017), altos gastos com tratamento, descarte do leite contendo antibióticos utilizados no tratamento, transtornos ao produtor, mão de obra excedente despendida pelos animais doentes e o descarte prematuro das vacas (Campos, 2017). No entanto, nem todas as propriedades seguem corretamente os procedimentos de higiene desde a ordenha até a entrega do leite, tornando o produto vulnerável a contaminação por agentes deteriorantes e/ou patogênicos, podendo oferecer risco a saúde dos consumidores (Chiew et al., 2018). Além disso, o mercado vem exigindo diariamente padrões de qualidade mais rigorosos, levando os produtores de leite a utilização de diferentes medicamentos antimicrobianos em seu rebanho, e tal comportamento pode acarretar a resistência de patógenos aos mais diversos fármacos, se tornando um grave problema de saúde pública (Silva, Alcântara e Mota, 2018).

A palavra mastite, é derivada do grego “mastos”, que significa glândula mamária, e o sufixo “ite” representa inflamação (Costa, 1998). Trata-se de uma doença multifatorial, definida por um processo inflamatório da glândula mamária, ocasionada por diversos tipos de patógenos, e apresenta a influência do meio

ambiente e os fatores inerentes a cada animal (Oliveira e Medeiros, 2015).

A mastite é a maior responsável pelo uso de antimicrobianos em fazendas leiteiras, sendo as cefalosporinas, penicilinas e seus derivados, aminoglicosídeos, lincosamidas e macrolídeos, os antimicrobianos mais frequentemente utilizados, tanto durante o período de lactação quanto no período seco, para o tratamento e prevenção da mastite (Pereira e Scussel 2017).

No Brasil, a baixa na produção leiteira devido à mastite varia de 12 a 15% em um único quarto infectado, representando uma perda de 2,4 bilhões de litros de leite por ano (Acosta et al., 2016). Leite de animais com mastite apresentam um baixo teor de açúcares, gordura, proteínas e minerais e um maior número de proteínas séricas e células somáticas, reduzindo consideravelmente a qualidade do leite e seus derivados, acarretando o comprometimento do valor nutricional do alimento e seu aceite pelo consumidor (Melo et al., 2022).

A bactéria *S. aureus* é capaz de colonizar a glândula mamária de ruminantes e sobreviver por longos períodos (Fonseca, 2021). Possui mecanismos de colonização, invasão e evasão, que provocam danos ao tecido do animal infectado, bem como indutores/moduladores da resposta inflamatória (Oliveira et al., 2018). Apresenta também a capacidade de invadir o tecido e rapidamente se reproduzir no interior das células epiteliais da glândula mamária bovina ocasionando infecção (Cousin et al., 2018), além de produzir resultados falso negativos nos exames bacteriológicos, e interferir na eficácia dos antibióticos utilizados para tratar as mastites ocasionadas por esse micro-organismo (Beyene et al., 2017).

A presença de mastite nos rebanhos leiteiros propicia riscos à saúde pública, visto que o leite contaminado pode carrear tanto micro-organismos patogênicos ao homem quanto resíduos de antibióticos que comprometem a eficácia destes medicamentos no tratamento de doenças humanas (Campos, 2017). Outra implicação, está relacionada à existência de cepas resistentes a antimicrobianos e a capacidade da transferência dos genes de resistência a seres humanos, a exemplo da metilina (Silva et al., 2018).

A resistência a metilina é um dos principais tipos de resistência do gênero *Staphylococcus*. Tal resistência está relacionada à transferência horizontal do gene *mecA*, que implica na resistência destes microrganismos a

toda a classe dos betalactâmicos (Pexara, Solomakos e Govaris, 2017). Na maioria dos isolados de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA ou *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*), a resistência a classe dos beta-lactâmicos é apresentada de forma peculiar e heterogênea, sendo a detecção do gene *mecA* o padrão ouro para a detecção deste tipo de resistência (Paterson, Harrison, e Holmes, 2014; Becker et al., 2018).

MRSA não são comumente descritos em animais, no entanto, nos últimos anos, há registros do aumento de casos de infecções em animais domésticos (Drougka et al., 2016; Kaspar et al., 2018), sugerindo que as infecções mamárias por MRSA, em bovinos leiteiros, podem ser consideradas um sério problema no campo leiteiro (Silva et al., 2021).

A meticilina é um antimicrobiano da classe dos betalactâmicos, lançada comercialmente no início da década de 60, e, apesar de não ser um antimicrobiano comumente utilizado no tratamento de mastites bovinas, já houve relatos de que o contato entre seres humanos com animais positivos para MRSA e vice-versa, pode propiciar a transmissão do patógeno entre as espécies (Silva et al., 2018).

A resistência do *S. aureus* a meticilina pode ser mediada por um determinante que transporta o gene *mecA* e *mecC* estrutural, que por sua vez, codifica uma proteína de ligação a penicilina (PBP) ligada à afinidade da PBP para beta-lactâmicos (Gelatti et al., 2009). Juhász-Kaszanyitzky et al., realizou um estudo em 2007 com vacas que apresentavam mastite subclínica e trabalhadores (veterinários, ordenhadores e assistentes) de fazendas leiteiras na Hungria, e os resultados sugeriram a transmissão horizontal de isolados de MRSA entre seres humanos e as vacas contaminadas. A chance dessa forma de transmissão do patógeno surge como um fator a ser considerado na epidemiologia das mastites causadas por MRSA que é o caráter ocupacional da infecção. Este fato, foi corroborado pelos resultados obtidos no estudo realizado por Wulf et al., (2008) com a participação de 272 veterinários de todo o mundo em que foi identificado MRSA em 34 (12,5%) profissionais, de acordo com os autores, os profissionais que possuem contato direto com os animais contaminados, apresentam um alto risco de se tornarem portadores do patógeno.

No Brasil, embora não se utilize a meticilina para o tratamento de infecção

causada por *S. aureus*, a expressão “meticilina-resistente” é utilizada para denominar as cepas de *S. aureus* que não respondem ao tratamento com oxacilina, droga utilizada para tal fim no país (Mangueira, 2016).

O isolamento de MRSA em amostras de leite e mão do ordenhador é realizado por meio de provas fenotípicas pelo plaqueamento nos meios de cultura seletivos como ágar base acrescido de sangue ovino, ágar MRSA e pelo ágar sal manitol (Borges et al., 2020). O reconhecimento fenotípico de resistência a meticilina pode ser realizada por meio de testes de suscetibilidade aos antimicrobianos oxacilina e cefoxitina (CLSI, 2018). A nível molecular, a resistência a meticilina pode ser identificada pela técnica de PCR através da amplificação dos genes *mecA* e *mecC* (Borges et al., 2020).

A resistência estafilocócica aos antibióticos beta-lactâmicos é decorrente de dois métodos distintos: produção da enzima extracelular beta-lactamase codificada pelo gene *blaZ* e/ou pela produção de PBP2a ou PBP2, caracterizada por uma proteína ligante da penicilina de baixa afinidade, codificada pelo gene *mecA* e seu homólogo *mecC* ou *mecALGA251*(Lee et al., 2018).

Devido ao aumento nas taxas de ocorrências, mudanças no modelo epidemiológico das cepas MRSA e as adversidades no tratamento das infecções ocasionadas pela bactéria *S. aureus*, esta vem sendo colocada em destaque dentre os micro-organismos de importância médica e de imenso desafio à saúde pública mundial (Borges et al., 2020), uma vez que linhagens de MRSA são frequentemente identificadas como causadoras de infecções hospitalares, inclusive nas unidades de terapia intensiva (UTIs) (Siqueira et al., 2017).

Com isso, é de suma importância a vigilância epidemiológica nas fazendas leiteiras e indispensável a realização de novos estudos para compreender a transmissão entre as espécies e o perigo que cada uma impõe em relação à saúde pública.

REFERÊNCIAS

Acosta, A. C; Silva, L. B. G; Medeiros, E. S; Pinheiro-Júnior, J. W; Mota, R. A. *Mastites em ruminantes no Brasil. Pesquisa Veterinária Brasileira*, 36(7), 565–573. 2016. <<http://doi:10.1590/s0100-736x2016000700001>>.

Becker, K; van Alen, S; Idelevich, E. A; Schleimer, N; Seggewiß, J; Mellmann, A; Kaspar, U; Peters, G. Plasmid-Encoded Transferable *mecB*-Mediated Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Emerging infectious diseases*, 24(2), 242–248, 2018. <<https://doi.org/10.3201/eid2402.171074>>.

Beyene, T; Hayishe, H; Gizaw, F; Beyi, A. F; Abunna, F; Mammo, B; Ayana, D; Waktole, H; Abdi, R. D. Prevalence and antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus* in dairy farms, abattoir and humans in Addis Ababa, Ethiopia. *BMC Res Notes*. Apr 28;10(1):171. 2017. <<https://doi.org/10.1186/s13104-017-2487-y>>. PMID: 28454589; PMCID: PMC5410091.

Borges, L. F. F; Souza, C. N; Xavier, E. D; Cruz, E. A. M; Xavier, A. R. E. O; Sanglard, D. A; Souza, G. A. A. D; Carvalho, C. M. C. Caracterização genotípica de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina isolados de tetos e leite bovino. *Caderno de Ciências Agrárias*, v. 12, p. 1-7, 2020. <<http://dx.doi.org/10.35699/2447-6218.2020.25185>>.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Mapa do leite: Políticas públicas e privadas para o leite. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/producao-animal/mapa-do-leite>. Acesso em: 05/05/2023.

Campos, C. C. Desempenho Reprodutivo de Vacas Leiteiras Lactantes Acometidas pela Mastite Clínica de Ocorrência Espontânea ou Induzida por LPS de *Escherichia coli*. 123 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017.

Chiew, C. J; Ho, H. J; Win, M. K; Tan, A; Lim, J. W; Ang, B; Chow, A. Persistence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage in re-admitted patients. *Journal of Hospital Infection*. 2018. <<http://doi:10.1016/j.jhin.2018.04.001>>.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2018.

Costa, E. O. Importância da Mastite na Produção Leiteira do País. *Revista da Educação Continuada do CRMV-SP*, São Paulo, v.1, p.3-7, 1998. Disponível em: <http://www.cpatc.embrapa.br/publicacoes_2012/doc_170.pdf>.

Cousin, M. E; Hardi-Landerer, M. C; Volk, V; Bodmer, M. Control of *Staphylococcus aureus* in dairy herds in a region with raw milk cheese production: farmers' attitudes, knowledge, behaviour and belief in self-efficacy. BMC Vet Res, 13;14(1):46, 2018. <<http://doi: 10.1186/s12917-018-1352-0>>. PMID: 29433483; PMCID: PMC5810121.

Drougka, E; Foka, A; Koutinas, C. K; Jelastopulu, E; Giormezis, N; Farmaki, O; Sarrou, S; Anastassiou, E. D; Petinaki, E; Spiliopoulou, I. Interspecies spread of *Staphylococcus aureus* clones among companion animals and human close contacts in a veterinary teaching hospital. A cross-sectional study in Greece. Prev Vet Med. 1;126: 190-8, 2016. <<http://doi: 10.1016/j.prevetmed.2016.02.004>>. Epub 2016 Feb 23. PMID: 26948298.

Fonseca, M. E. B; Mourão, A. M; Chagas, J. D. R; Ávila, L. M; Marques, T. L. P; Baêta, B. A; Moraes, R. F. F; Roier, E. C. R. Mastite bovina: revisão. Pubvet, [S.L.], v. 15, n. 2, p. 1-18, 2021. <<http://dx.doi.org/10.31533/pubvet.v15n02a743.1-18>>.

Gelatti, L. C; Bonamigo, R. R; Becker, A. P; D'azevedo, P. A. *Staphylococcus aureus* Resistentes à Meticilina: disseminação emergente na comunidade. An. Bras. Dermatol. [online], v.84, n.5, p.501-506. 2009. ISSN 1806-4841. <<https://doi.org/10.1590/S0365-05962009000500009>>.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. PPM 2019: após dois anos de queda, rebanho bovino cresce 0,4%. 2020. Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/29163-ppm-2019-apos-dois-anos-de-queda-rebanho-bovino-cresce-0-4>. Acesso em: 05 março. 2023.

Juhász-Kaszanyitzky, E; Jánosi, S; Somogyi, P; Dán, A; van der Graaf-van, B. L; van Duijkeren, E; Wagenaar, J. A. MRSA transmission between cows and humans. Emerg. Infect. Dis, 13:630–632, 2007. <<https://doi: 10.3201/eid1304.060833>>.

Kaspar, U; von Lützu, A; Schlattmann, A; Roesler, U; Köck, R; Becker, K. Zoonotic multidrug-resistant microorganisms among small companion animals in

Germany. PloS one, 13(12), 2018. <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208364>>.

Langoni, H; Salina, A; Oliveira, G. C; Junqueira, N. B; Menozzi, B. D; Joaquim, S. F. Considerações sobre o tratamento das mastites. PV B, v. 37, n. 11, p. 1261-1269, 2017. <<https://doi:10.1590/S0100-736X2017001100011>>.

Lee, A. S; de Lencastre, H; Garau, J; Kluytmans, J; Malhotra-Kumar, S; Peschel A; Harbarth, S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Nat Rev Dis Primers, 31;4:18033, 2018. <<https://doi: 10.1038/nrdp.2018.33>. PMID: 29849094>.

Mangueira, E. V. C. Avaliação da presença e expressão de genes de virulência e *mecA* em isolados de *Staphylococcus spp* submetidos à oxacilina e tigeciclina. 2016. 153 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

Melo, B. A; Silva, S. G. M; Santos, M. T; Santos, T. M. C; Fraga, A. B. Perfil da mastite subclínica e frequência de micro-organismos isolados de búfalas mestiças (*Bubalus bubalis*). Research, Society and Development, [s. l], v. 11, n. 4, p. 1-27, 2022. <<http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i4.27327>>.

Menezes, H. M; Milhomem, T. F; Silva, M. A. Mastite em vacas. Brazilian Journal of Health Review, [S.L.], v. 6, n. 2, p. 7029-7038, 6, 2023. <<http://dx.doi.org/10.34119/bjhrv6n2-205>>.

Oliveira, M. R. M; Medeiros, M. Agentes Causadores de Mastite e Resistência Bacteriana. Revista Científica de Medicina Veterinária: FACIPLAC, Brasília/ Df, v. 2, n. 1, p. 45-60. 2015. <<https://doi.org/10.15210/ee.v22i1.7886>>.

Oliveira, D; Borges, A; Simões, M. *Staphylococcus aureus* Toxins and Their Molecular Activity in Infectious Diseases. Toxins (Basel), 19;10(6):252, 2018. <<https://doi: 10.3390/toxins10060252>>. PMID: 29921792; PMCID: PMC6024779.

Paterson, G. K; Harrison, E. M; Holmes, M. A. The emergence of *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Trends in microbiology, 22(1), 42–47, 2014. <<https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.11.003>>.

Pereira, M. N; Scussel, V, M. Resíduos de antimicrobianos em leite bovino: fonte de contaminação, impactos e controle. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, [S.L.], v. 16, n. 2, p. 170-182, 2017. Universidade do Estado de Santa Catarina. <<http://dx.doi.org/10.5965/223811711622017170>>.

Pexara, A.; Solomakos, N.; Govaris, A. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in milk and dairy products. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, [S.I.], v. 64, n. 1, p. 1734, 2017. ISSN 2585-3724. <<http://doi:https://doi.org/10.12681/jhvms.15449>>.

Silva, J. G; Alcântara, A; Mota, R. A. Mastite bovina causada por *Staphylococcus spp.* resistentes à metilina: revisão de literatura. *PVB*, 38(2), 223–228. 2018. <<http://doi:10.1590/1678-5150-pvb-4996>>.

Silva, J. G; Araujo, W. J; Leite, E. L; Dias, L. M; Vasconcelos, P. C; Silva, N. M. V; Oliveira, R. P; Sena, M. J; Oliveira, C. J. B; Mota, R. A. First report of a livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST126 harbouring the *mecC* variant in Brazil. *Transbound Emerg Dis*, 68(3):1019-1025, 2021. <<http://doi:10.1111/tbed.13771>>.

Siqueira, A. K; Salerno, T; Lara, G. H. B; Condas, L. A. Z; Pereira, V. C; Riboli, D. F. M; Listoni, F. J. P; Silva, A. V; Leite, D. S; Cunha, M. L. R. S; Ribeiro, M. G. Enterotoxin genes, multidrug resistance, and molecular typing of *Staphylococcus spp.* isolated from organic bovine milk. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 54: 81-87, 2017. <<http://doi:10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2017.109171>>.

Wulf, M. W; Sorum, M; van Nes, A; Skov, R; Melchers, W. J; Klaassen, C. H; Voss, A. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among veterinarians: an international study. *Clin Microbiol Infect*, 14(1):29-34,2008. <<http://doi:10.1111/j.1469-0691.2007.01873.x>>.

OBJETIVO GERAL

Isolar e avaliar o perfil de resistência a meticilina em *S. aureus* obtidos de amostras de leite e mão de ordenhador.

OBJETIVO ESPECÍFICO

Detectar o gene de *S. aureus* e de resistência à meticilina com extração de DNA diretamente de amostras de leite e mão dos ordenhadores.

Detectar os genes específicos de MRSA, genes *mecA* e *mecC* por meio de testes moleculares - PCR, a partir de DNA genômico extraído de cepas de *S. aureus* provenientes de amostras de leite e mão de ordenhador.

1. STAPHYLOCOCCUS AUREUS RESISTENTES À METICILINA (MRSA) NO LEITE

RESUMO: *Staphylococcus* spp. são micro-organismos mais associados aos casos de mastite bovina. Algumas espécies, como *Staphylococcus aureus*, têm apresentado fatores de virulência como genes de resistência a antimicrobianos com destaque para a resistência à meticilina que é um problema de saúde única. *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) é uma das causas mais graves de infecção em humanos. Esta revisão de literatura tem o objetivo de compilar dados sobre a mastite bovina ocasionada por MRSA. Apesar da meticilina não ser utilizada no tratamento das mastites bovinas, já existem relatos de casos de infecções das glândulas mamárias provocadas por MRSA, e o contato direto de seres humanos com animais portadores, bem como o leite contaminado podem favorecer a disseminação do patógeno entre as espécies, colaborando para o aumento das taxas de infecção. A ocorrência de mastite bovina ocasionada pelo MRSA constitui um problema crescente em todo o mundo e está associado a vários fatores; portanto, requer uma ação ampla e coordenada para conter ou diminuir o problema. Em uma perspectiva de saúde única, há um consenso de que vários órgãos devem trabalhar juntos para controlar o aumento da resistência antimicrobiana em todo o mundo, visto que em casos de ingestão de leite e seus derivados contaminados podem provocar a transferência de MRSA para seres humanos e vice-versa. Devido a isto, novas alternativas no tratamento de infecções por MRSA tanto em animais, quanto em seres humanos devem ser desenvolvidas, bem como, é necessário um cuidado frequente quanto à vigilância epidemiológica nas fazendas leiteiras.

Palavras-chaves: *Staphylococcus aureus*, meticilina, mastite bovina, saúde única, resistência bacteriana.

1.1 INTRODUÇÃO

A mastite bovina é uma doença inflamatória predominante na pecuária leiteira, é caracterizada por ocasionar inflamação das glândulas mamárias, conseqüentemente, redução da produtividade e qualidade do leite, além de grandes perdas econômicas devido a gastos extras com antibióticos (Ruegg, 2015). O controle e prevenção da enfermidade podem ser feitos por meio das boas práticas de ordenha, além disso, quando a conduta terapêutica é necessária, a identificação do patógeno e o monitoramento da resistência aos antimicrobianos devem ser realizados (Zigo et al., 2021; Ikhimiukor et al., 2022).

O uso indiscriminado e inadequado de antimicrobianos tem gerado a ocorrência de cepas resistentes, relacionadas a mutações, ao uso prévio de antibióticos e a transferência do material genético (Manyi-Loh, 2018) prejudicando a eficácia do tratamento e tornando-se um problema de saúde única (Torres-Caycedo, 2018).

Diversos micro-organismos patogênicos podem provocar a inflamação no teto do animal, no entanto, a bactéria *S. aureus* é considerada o principal agente etiológico causador da mastite bovina, ocasionando também intoxicação alimentar em humanos, infecções de pele, pulmões e corrente sanguínea (Shoaib et al., 2021).

Uma das formas mais preocupantes de resistência aos antimicrobianos é a resistência aos beta-lactâmicos: meticilina, oxacilina e/ou cefoxitina (Lord et al., 2022). A meticilina é um antimicrobiano de uso exclusivo para seres humanos que normalmente não deve ser utilizado no tratamento da mastite clínica e subclínica, no entanto, as cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) vem sendo identificadas e descritas em fazendas leiteiras (Keyvan et al., 2020; Rodrigues et al., 2017; Silva et al., 2022), causando preocupação em termos de saúde pública, já que são constantemente identificadas como causadoras de infecções hospitalares, inclusive nas unidades de terapia intensiva. Além disso, o consumo do leite contaminado bem como de seus derivados pode provocar a transferência de MRSA para os seres humanos (Khairullah et al., 2020).

No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e a Secretaria de Defesa Agropecuária são responsáveis pela regulamentação do uso de antibióticos em animais. O Plano Nacional de Controle de Resíduos no

Leite (PCRL), criado em 1999 por este Ministério, possui o objetivo de regulamentar o controle e a vigilância dos resíduos em alimentos de origem animal, visando evitar a violação dos limites máximos permitidos de resíduos (LMR) e de controlar o uso de substâncias proibidas (Brasil, 1999).

Nos último cinco anos (2017-2021) de avaliações divulgadas na página da internet do Ministério da Agricultura, é possível observar que o número médio de amostras de leite avaliadas foi de 865 com a média de 0,80% de amostras excedendo algum dos limites avaliados (Brasil, 2023).

A ocorrência de mastite causada por *S. aureus* apresenta grande relevância neste contexto, uma vez que a ingestão de leite e seus derivados crus contaminados são capazes de desencadear a transferência de MRSA para os seres humanos, e devido ao aumento no número de casos, as mudanças no padrão epidemiológico das cepas de MRSA e as dificuldades no tratamento das infecções causadas por essa bactéria, vem colocando o *S. aureus* em destaque entre os patógenos de notoriedade médica e de grande desafio à saúde pública mundial.

Assim, é necessária vigilância epidemiológica nas fazendas leiteiras e indispensável a realização de novos estudos para compreender a transmissão entre as espécies e o perigo que cada uma impõe em relação à saúde pública. Considerando este cenário, essa revisão de literatura tem o objetivo de compilar os dados sobre a mastite bovina ocasionada por *S. aureus* resistente à metilicina (MRSA) no leite, no período de 2015 a 2022.

1.2 REVISÃO DE LITERATURA

1.2.1 *Staphylococcus* spp.

Pertencente à família *Micrococcaceae*, o gênero *Staphylococcus* é reconhecido em testes morfotintoriais como cocos que se coram no teste de Gram como positivos, apresentam diâmetro aproximado de 0,5 a 1,5 μ m, são imóveis, oxidase negativos e não formadores de esporos. Se apresentam de diversas formas, que vão desde isolados, aos pares, em cadeias curtas ou agrupados irregularmente com aspecto semelhante a cacho de uva (Ferrasso, Gonzales e Timm, 2015).

Muitas espécies são anaeróbias facultativas e produtoras de catalase e mais de 30 espécies de *Staphylococcus* spp. já foram descritas, sendo a maioria delas comensal da pele e mucosas dos seres humanos e animais. São encontradas também na boca, glândulas mamárias, tratos gastrointestinais, urinário e respiratório alto, no solo, na água e em produtos de origem animal como queijo, ovos, carne e leite (Silva et al., 2018).

Staphylococcus spp., são micro-organismos mesófilos, apresentam crescimento entre 7 e 47,8 °C e podem produzir enterotoxinas termo resistentes a temperaturas entre 10 e 46° C (Yilmaz Eker, 2019). O pH ideal para seu desenvolvimento varia de 7 a 7,5, mas é possível a multiplicação em alimentos com pH variando entre 4,2 e 9,3. Se multiplicam em concentrações de até 15 % de NaCl, sendo considerados como micro-organismos halofílicos (Silva et al., 2018).

O gênero *Staphylococcus* é dividido em dois grupos: *Staphylococcus* coagulase negativos, que normalmente compõem a microbiota natural dos seres humanos e animais, e em 2020 foram reclassificadas 5 espécies de *Staphylococcus* coagulase negativo sendo elas: *S. sciuri*, *S. fleurettii*, *S. lentus*, *S. stepanovicii*, e *S. vitulinus* (Madhaiyan et al., 2020), e coagulase positivo que possuem maior potencial patogênico, tendo como principal representante *S. aureus* (Benkerroum, 2018). Essa classificação é baseada na capacidade do micro-organismo em coagular o plasma, tornando-o um importante marcador do fator de patogenicidade dos estafilococos (Avellar-Costa et al., 2019).

Embora encontrado com relativa frequência como membro da microbiota comensal do corpo humano, o *S. aureus* é uma das bactérias patogênicas mais importantes (Parlet, Brown e Horswill, 2019), uma vez que atua como agente de uma ampla gama de infecções, variando desde aquelas localizadas, geralmente superficiais, até algumas disseminadas, com elevada gravidade para grupos de risco (Silva et al., 2018). Sua importância clínica tem variado ao longo dos anos, tendo crescido particularmente devido ao aumento na ocorrência de infecções hospitalares graves causadas por amostras multirresistentes, assim como MRSA na comunidade, algo até então, pouco comum (Garoy et al., 2019). Além disso, *S. aureus* é relacionado como a causa mais frequente de mastite contagiosa em todo o mundo, sendo capaz de colonizar a glândula mamária de ruminantes e sobreviver por longos períodos (Campos et al., 2022). É um agente patogênico

que varia em termos de infecção e hospedeiro, o que o torna uma ameaça à saúde animal e humana (Zanella, 2016), pois produz toxinas e é capaz de resistir ao uso de diversos antimicrobianos, levando à gravidade dos sintomas das infecções intramamárias (Santos e Fonseca, 2019).

A presença de mastite nos rebanhos leiteiros propicia riscos à saúde pública (Santos, Mendonça e Muniz, 2020), visto que o leite contaminado pode carrear tanto micro-organismos patogênicos ao homem quanto resíduos de antibióticos que comprometem a eficácia dos medicamentos no tratamento de doenças humanas (Campos, 2017).

1.2.2 *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina (MRSA)

S. aureus resistente à meticilina (MRSA) é uma das principais causas de infecção em seres humanos (Ferreira e Velloso, 2021). Historicamente, a resistência ao *S. aureus* surgiu dois anos após a introdução da penicilina (Lakhundi e Zhang, 2018). Em 1942, foi detectada a primeira cepa de *S. aureus* resistente à penicilina e o antibiótico semissintético meticilina foi então desenvolvido no final da década de 1950, e o *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) foi clinicamente identificado em 1960 (Lakhundi e Zhang, 2018).

As cepas de *S. aureus* epidêmicas resistentes à penicilina foram seguidas pelas chamadas cepas de MRSA “arcaicas” encontradas pela primeira vez no Reino Unido. Esta epidemia foi inicialmente amplamente restrita à Europa. No entanto, a partir da década de 1980, surgiram novas linhagens (Chambers e Deleo, 2009). No ano de 1980, os relatos de MRSA consistiam apenas casos isolados, no entanto, a partir de 1982 cepas epidêmicas foram relatadas como multirresistentes, com a capacidade de colonizar e ocasionar surtos de infecções no mundo todo, tornando-se uma causa de alta morbimortalidade (Macedo et al., 2016).

A meticilina é um antimicrobiano pertencente ao grupo betalactâmico, comercializada no início da década de 60 (Larsen, Raisen e Ba, 2022). Por volta de um ano após o início de sua comercialização, ocorreu a identificação do primeiro isolado clínico de MRSA em seres humanos (Silva et al., 2018). A partir de então, a identificação de amostras de MRSA passou a ser frequentemente relatada (Larsen, Raisen e Ba, 2022).

O termo MRSA é utilizado para designar as linhagens de *S. aureus* que

não respondem ao tratamento com antibióticos betalactâmicos (Silva et al., 2018). A resistência gerada pelo *Staphylococcus* spp. em relação aos betalactâmicos é provocada por dois mecanismos distintos. Um deles é mediado pela enzima β -lactamase, uma enzima extracelular codificada pelo gene *blaZ*, que age causando a hidrólise do anel β -lactâmico e, por consequência, sua inativação (Bush, 2018; Cuevas et al., 2022).

A enzima betalactamase é codificada pelo gene *blaZ*, por meio de plasmídeos ou cromossomos, que produzem uma penicilinase após exposição do *Staphylococcus* spp. aos antimicrobianos betalactâmicos (Silva et al., 2018). Depois de sua expressão, a enzima betalactamase inativa o antimicrobiano por meio da separação do anel betalactâmico. A capacidade hidrolítica da enzima betalactamase depende de fatores como a sua localização, cinética, quantidade e condições físico-químicas (Dias, Pinheiro e Alves, 2015).

A outra forma de resistência é pela diminuição da afinidade para proteínas ligadoras de penicilina (PBPs) por meio do produto do gene *mecA* (Leclercq et al., 2001), cujo mecanismo de resistência se dá pela alteração do sítio de ação dos β -lactâmicos. Dentre os antimicrobianos em questão, a meticilina é a forma de resistência mais preocupante, visto que *S. aureus* resistente a meticilina - MRSA se tornou uma das cepas multirresistentes nas infecções hospitalares, sendo de grande preocupação na saúde pública (Rocha e Santos, 2020). A resistência provocada pelo *Staphylococcus* spp. se caracteriza como cepas que possuem o gene *mecA* ou que demonstram uma concentração inibitória mínima (CIM) à oxacilina maior do que 4 mg/L (XU et al., 2018). No entanto, alguns isolados clínicos são *mecA*-positivos e susceptíveis à oxacilina. A alteração que ocorre no sítio de ação dos betalactâmicos é um mecanismo de resistência mediado pelos *Staphylococcus* Cassete Cromossomo (SCCmec), que são elementos genéticos móveis. Esse é o mecanismo de resistência observado nas amostras de MRSA (Santos, 2018).

Os betalactâmicos agem por meio da ligação com as proteínas de ligação à penicilina (PBP), o que resulta na destruição das células bacterianas. O SCCmec contém o gene *mecA* que codifica uma PBP semelhante a PBP2a/PBP2' que possui uma redução na sua afinidade aos betalactâmicos, o que permite que os *Staphylococcus* spp. conservem sua biossíntese até em concentrações consideradas inibitórias desses antimicrobianos (Silva et al.,

2018).

Devido ao aumento nas taxas de ocorrências de resistência aos antimicrobianos, as mudanças no padrão epidemiológico das cepas MRSA e as dificuldades no tratamento das infecções causadas por essa bactéria, têm colocado a mesma em destaque dentre os micro-organismos de notoriedade médica e de desafio à saúde pública mundial (Borges et al., 2020), uma vez que linhagens de MRSA produzem inúmeras toxinas relacionadas à intoxicação alimentar em humanos e infecções hospitalares graves (Siqueira et al., 2017).

No ano de 2009, Garcia-Alvarez realizou um estudo a respeito da epidemiologia da mastite bovina na Inglaterra e identificou, em amostras de leite de tanques, uma cepa de *S. aureus* que possuía características fenotípicas de MRSA. Essa cepa foi identificada como *S. aureus* LGA251 e embora apresentasse o perfil fenotípico, foi negativa para o gene *mecA* pela técnica de PCR (Borges et al., 2020). Em seguida, essa cepa foi sequenciada e os resultados do sequenciamento de genoma mostraram que ela possuía um gene homólogo (aproximadamente 69% de identidade) ao *mecA*, e com isso recebeu a denominação de *mecALGA251* (Silva et al., 2018). No entanto, em 2012 o *mecALGA251* foi renomeado para *mecC*, uma vez que apresentava menos de 90% de homologia com o *mecA* (Borges et al., 2020).

Cepas de MRSA já foram identificadas em amostras de mastite bovina em diversas partes do mundo como na Grã-Bretanha, Coréia do Sul e Alemanha (Silva et al., 2018). No Brasil, são escassos os estudos que identificam casos de mastite causados por MRSA, o que destaca a importância da necessidade de se realizar novos estudos que venham contribuir para a epidemiologia da infecção por esse patógeno no país (Santos, Mendonça e Muniz, 2020), a fim de alertar às autoridades de saúde pública e da agropecuária sobre a necessidade de adoção de medidas de controle (Goudarzi et al., 2020).

1.2.3 *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina em casos de mastite bovina: Aspectos epidemiológicos e clínicos

S. aureus na saúde pública, destaca-se como o patógeno mais importante, de maior ocorrência nos rebanhos mundiais (Tabela 1). É de difícil tratamento, devido a sua elevada resistência à maioria das classes de antimicrobianos, tais como, penicilinas, macrolídeos, aminoglicosídeos,

cloranfenicol e tetraciclina, tornando o tratamento e o controle das infecções estafilocócicas altamente difícil (Kapoor, Saigal e Elongavan, 2017).

O primeiro relato da infecção de MRSA em animais domésticos surgiu no ano de 1972, na Bélgica, e consistia em casos de mastite em vacas leiteiras (Silva et al., 2018). Após este relato, eventualmente, são evidenciados casos de mastite causadas por esse agente (Sá et al., 2018). A dispersão de MRSA na pecuária leiteira, principalmente da espécie *S. aureus* levou a criação do termo LA-MRSA (*livestock-associated*), traduzido como MRSA ligado ao ambiente pecuário (Barberato-Filho et al., 2020).

Apesar da meticilina ser um antimicrobiano de uso humano exclusivo, cepas de MRSA têm sido identificadas em fazendas leiteiras. A transmissão horizontal de MRSA entre bovinos leiteiros e trabalhadores das fazendas já foi relatada, sugerindo que o contato entre seres humanos e animais e vice-versa pode favorecer a transmissão de tais cepas (Sá et al., 2018). A transmissão horizontal do patógeno deve ser considerada na epidemiologia das mastites causadas por MRSA, conforme os resultados obtidos no estudo de Wulf et al. (2008), onde foram coletadas amostras das narinas e garganta de 272 veterinários de todo o mundo, e foram identificadas cepas de MRSA em 34 (12,5%) dos profissionais. De acordo com os autores do estudo, os profissionais que mantêm contato direto com animais possuem um potencial risco de se tornar carreador do patógeno entre seres humanos e animais.

É sabido que o MRSA sobrevive por meses no ambiente, desde que encontrem condições favoráveis à sua manutenção, como umidade e temperatura (Silva et al., 2018). Lim et al. (2013) realizaram um estudo onde cepas de MRSA de teteadas, piso, cercas de proteção e do sistema de ventilação foram isoladas em fazendas leiteiras na Coreia. De acordo com os autores, os resultados salientaram a necessidade da adoção de medidas preventivas quanto à transmissão de MRSA entre humanos, animais e ambiente das fazendas.

A mastite causada por MRSA apresenta curso clínico similar ao provocado por outros *Staphylococcus* spp. que se caracterizam pela forma subclínica da infecção, com elevação na quantidade de células somáticas (>200.000 céls/mL). No entanto, há relatos de que a manifestação clínica da doença causada pelo MRSA nos animais, manifestam um quadro agudo da

infecção, sendo observadas alterações macroscópicas no leite, no tecido mamário e alterações sistêmicas no animal (Silva et al., 2018).

Amostras Positivas	País	Autor
Leite de vacas em lactação	Brasil	Krewer et al. (2015)
Leite de vacas com mastite clínica	Iran	Jamali et al. (2015)
Leite de vacas com mastite clínica	China	Li et al. (2015)
Leite de vacas com mastite clínica	Itália	Luini et al. (2015)
Leite cru de diferentes rebanhos leiteiros	Itália	Riva et al. (2015)
Leite cru de vacas sadias	Polônia	Rola et al. (2015)
Leite de vacas com mastite clínica	Estados Unidos	Ruegg et al. (2015)
Leite de vacas com mastite clínica	Brasil	Oliveira et al. (2016)
Leite de vacas com mastite clínica	Coréia	Song et al. (2016)
Leite de tanque a granel	Itália	Cortimiglia et al. (2016)
Leite de tanque a granel	Itália	Locatelli et al. (2016)
Leite de tanque a granel	Itália	Parisi et al. (2016)
Leite de vacas com mastite clínica	Japão	Hata (2016)
Leite de vacas e cabras com mastite clínica e subclínica	Índia	Bhattacharyya et al. (2016)
Leite de vacas com mastite subclínica	Turquia	Aslantas e Demir (2016)
Leite cru de vacas sadias	China	Bao et al. (2016)
Leite de mastite clínica e subclínica	Irã	Ahangari et al. (2017)
Leite de tanque a granel	Itália	Locatelli et al. (2017)
Leite de vacas com mastite clínica	China	Dan et al. (2018)
Leite de vacas com mastite clínica aguda	Europa	Jong et al. (2018)
Leite de vacas com mastite clínica	Etiópia	Mekonnen et al. (2018)
Leite de vacas com mastite clínica	China	Qu et al. (2018)
Leite de tanques a granel	Dinamarca	Ronco et al. (2018)
Leite cru de vacas sadias	Índia	Shrivastava et al. (2018)
Leite de tanques a granel	Jordânia	Obaidat et al. (2018)
Leite de tanques a granel Produtos lácteos	Grécia	Papadopoulos et al. (2018)

Leite de tanques a granel	Alemanha	Tenhagen et al. (2018)
Leite de vacas em lactação	Itália	Magro et al. (2018)
Leite de vacas com mastite clínica	Brasil	Dorneles et al. (2019)
Leite de vacas com mastite clínica	Argentina	Monistero et al. (2019)
	Brasil	
	Alemanha	
	Itália	
	Estados Unidos	
	África	
Leite de vacas com mastite subclínica	Brasil	Rossi et al. (2019)
Leite de vacas com mastite clínica	Brasil	Borges et al. (2020)
Leite de vacas com mastite subclínica	Brasil	Borges et al. (2020)
Leite cru de vacas sadias	Estados Unidos	Barberato-Filho et al. (2020)
	América do Sul	
	América do Norte	
	América Latina	
Leite de vacas com mastite subclínica	Brasil	Souza et al. (2020)
Leite de vacas sadias	Brasil	Valmorbida (2020)

Tabela 1: Achados de positividade de *S. aureus* resistentes à metilicina (MRSA) no leite no período de 2015 a 2020.

1.2.4 Técnicas de diagnóstico da mastite causada por MRSA

Na mastite provocada pelo MRSA existe o predomínio de casos subclínicos. Devido a isso, é utilizada a contagem eletrônica de células somáticas (CCS) no leite como técnica de triagem com posterior isolamento e/ou

identificação do patógeno. Amostras de leite com CCS superior a 200.000 células/mL podem ser submetidas a pesquisa de MRSA (Sales, 2019).

Para o isolamento de *S.aureus* as amostras de leite podem ser plaqueadas em diversos meios de cultura como o ágar base acrescido de sangue ovino, o ágar MRSA (seletivo para *S. aureus* resistente a meticilina) e ágar Muller Hinton (Silva et al., 2018). As condições de crescimento são praticamente as mesmas nos meios de cultura descritos: incubação na faixa de 35-37°C por 24/48 horas, sob aerobiose. Antes do plaqueamento pode ser realizado um pré-enriquecimento em meios líquidos como caldo Muller Hinton contendo 6,5% de NaCl e/ou caldo triptona de soja contendo cefoxitina (3,5mg/L) (Chandrasekaran et al., 2014b; Vishnupriya et al., 2014). Após o crescimento das colônias são realizadas provas bioquímicas como teste da catalase, coagulase e fermentação da glicose para identificação das espécies de estafilococos (Silva et al., 2018).

As provas fenotípicas de resistência a meticilina podem ser realizadas por meio dos testes de suscetibilidade aos antimicrobianos e concentração inibitória mínima (CIM), sendo a cefoxitina e/ou oxacilina a droga de escolha (CLSI, 2017).

Molecularmente, é possível realizar a identificação do MRSA pela Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) através da amplificação dos genes *mecA* e *mecC*. Atualmente o PCR é a técnica mais utilizada para identificação de MRSA, pois como baseia-se na amplificação de DNA gera resultados confiáveis, diminuindo o risco da identificação de falsos negativos (Ferreira e Veloso, 2021), tendo como problema o fato de o material genético poder não ser expresso.

Outro método de detecção de MRSA é a identificação da proteína PBP2a, codificada pelos genes de resistência a meticilina. A proteína PBP2a é extraída de uma suspensão de colônias e partículas de látex revestidas com anticorpos monoclonais anti-PBP2a e são adicionadas para a extração. A presença de PBP2a provoca a aglutinação parcial das partículas. A adição de penicilina pode induzir a produção de PBP2a, resultando em uma reação mais forte (Ferreira e Veloso, 2021).

Outras técnicas utilizadas para rastrear a origem e analisar a correlação genética das amostras MRSA (Silva et al., 2018) são a *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE) e a *Multi-Locus Sequence Typing* (MLST).

1.2.5 Controle e prevenção

Para que a doença não se instale ou propague pelo rebanho leiteiro, um bom programa de prevenção e controle da mastite deve ser estabelecido com o objetivo de limitar a incidência/prevalência das infecções (Langoni et al., 2017). As medidas de controle da mastite causada pelo MRSA consistem em uma ampla gama de atividades como: tratamento da doença (forma clínica ou subclínica), terapia da vaca seca, a prevenção da transmissão da infecção (de vaca para vaca ou por meio do ambiente) e melhoria do sistema imunológico (Cheng e Han, 2020). O controle deverá ser baseado nos seguintes aspectos fundamentais: quanto à fonte de infecção, ao seu diagnóstico, tratamento ou descarte; em relação ao animal susceptível, nutrição, seleção de animais mais resistentes e higiene de ordenha; quanto às vias de transmissão: higiene de ordenha; a conscientização do problema aos produtores e educação sanitária dos tratadores (Silva et al., 2018).

Por se tratar de uma mastite bacteriana, a antibioticoterapia é o tratamento de escolha e, como o MRSA possui uma resistência a quase todos os betalactâmicos, o teste de suscetibilidade aos antimicrobianos indica quais antimicrobianos podem ou não ser utilizados (Silva et al., 2022). No tratamento das infecções ocasionadas por MRSA no ambiente hospitalar, a droga de escolha é a vancomicina, embora já tenha sido identificado cepas de *S. aureus* resistentes a esse antimicrobiano (Cunha e Baiense, 2023).

Em casos de animais que apresentam infecções crônicas e/ou recorrentes, devem ser descartados, pois eles podem ser uma importante fonte de transmissão do patógeno para o rebanho (Silva et al., 2018). Também deve-se levar em consideração o caráter epidemiológico da mastite bovina, pois o ser humano (ordenhador, veterinário, entre outros), pode ser o carreador da infecção para as vacas, devido ao seu contato direto com os animais (Langoni et al., 2017).

1.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No período estudado foram encontradas cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) no leite em diversas regiões do mundo e em diferentes sistemas produtivos, o que demonstra que o trabalho de prevenção desses agentes necessita de atenção urgente das autoridades de saúde. A

conscientização dos produtores é de extrema importância para reduzir os impactos causados por esta doença, pois, a partir do conhecimento, medidas poderão ser tomadas no intuito de prevenir e controlar a enfermidade nos rebanhos e conseqüentemente produzir um produto de qualidade, evitando que este cause problemas a saúde do consumidor.

1.4 AGRADECIMENTO

Ao departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Paraná.

1.5 DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

1.6 REFERÊNCIAS

Ahangari Z, Ghorbanpoor M, Shapouri MRS, et al. Methicillin resistance and selective genetic determinants of *Staphylococcus aureus* isolates with bovine mastitis milk origin. Iran J Microbiol, v.9, n.3, p. 152–159, 2017. PMID: 29225754; PMCID: PMC5719509.

Aslantas O, Demir C. Investigation of the antibiotic resistance and biofilm-forming ability of *Staphylococcus aureus* from subclinical bovine mastitis cases. J Dairy Sci, n. 99, v. 11, p. 8607– 8613, 2016. <[https://doi: 10.3168/jds.2016-11310](https://doi.org/10.3168/jds.2016-11310)>.

Avellar-Costa P, Santos DC, Lange CC, et al. Accurate identification of atypical *Staphylococcus chromogenes* plasma-clotting strains causing bovine mastitis: Ciência Rural, [S.L.], v. 49, n. 6, p. 1-3, 2019. FapUNIFESP (SciELO). <<http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20190168>>.

Bao H, Zhang H, Zhou Y. Prevalence, enterotoxin gene and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from clinical healthy dairy cows. Pak Vet J. n. 36, v. 3, p. 270–274, 2016. <<https://doi.org/10.3168/jds.2014-9064>>.

Barberato-Filho S, Bergamaschi, CC, Del Fiol F, et al. *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina nas Américas: revisão sistemática e metanálise da prevalência na pecuária. *Revista Panamericana de Salud Pública*, [S.L.], v. 44, p. 1, 2020. Pan American Health Organization. <<http://dx.doi.org/10.26633/rpsp.2020.48>>.

Benkerroum N. *Staphylococcal* enterotoxins and enterotoxin-like toxins with special reference to dairy products: An overview. *Critical reviews in Food science and nutrition*, v. 58, n. 12, p. 1943-1970, 2018. <<https://doi:10.1080/10408398.2017.1289149>>.

Bhattacharyya D, Banerjee J, Bandyopadhyay S, et al. First Report on Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Bovine and Caprine Milk. *Microbial Drug Resistance*, n. 22, v. 8, p. 675–681, 2016. <<https://doi:10.1089/mdr.2015.0330>>.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa SDA/MAA 42/1999 - Plano de Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes. 1999. Diário Oficial da União, 22 de dezembro de 1999.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Resultados do Plano de Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes PNCRC / Animal. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes>. Acesso em 23 de junho de 2023.

Borges LFF, Souza CN, Xavier ED, et al. Caracterização genotípica de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina isolados de tetos e leite bovino. *Caderno De Ciências Agrárias*, n. 12, p. 1–7, 2020. <<https://doi.org/10.35699/2447-6218.2020.25185>>.

Bush K. Past and Present Perspectives on β -Lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 62, n.10, 2018. e01076-18. <<https://doi.org/10.1128/AAC.01076-18>>.

Campos CC. Desempenho Reprodutivo de Vacas Leiteiras Lactantes Acometidas pela Mastite Clínica de Ocorrência Espontânea ou Induzida por LPS de *Escherichia coli*. 123 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017.

Campos B, Pickering AC, Rocha LS, et al. Diversity and pathogenesis of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis: current understanding and future perspectives. *BMC veterinary research*, v. 18, n. 1, p. 115, 2022. <<https://doi.org/10.1186/s12917-022-03197-5>>.

Chambers HF, Deleo FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol*, n. 7, v. 9, p. 629–641, 2009. <[https://doi: 10.1038/nrmicro2200](https://doi.org/10.1038/nrmicro2200)>.

Chandrasekaran D, Venkatesan P, Tirumurugaan KG, et al. A study on methicillin resistant *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy cattle. *J. Appl. Nat. Sci*, n. 6, v. 2, p. 356-361, 2014a. <<https://doi.org/10.31018/jans.v6i2.427>>.

Cheng WN, Han SG. Bovine mastitis: risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments - A review. *Asian-Australas J Anim Sci*, n. 33, v. 11, p. 1699–1713, 2020. <<https://doi.org/10.5713/ajas.20.0156>>.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI. document M100 – 27^a ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 282p, 2017.

Cortimiglia C, Luini M, Marzagalli L, et al. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and of methicillin resistant *S. aureus* clonal complexes in bulk tank milk from dairy cattle herds in Lombardy Region (Northern Italy). *Epidemiol Infect*, n. 144, v. 14, p. 3046–3051, 2016. <[https://doi: 10.1017/S0950268816001576](https://doi.org/10.1017/S0950268816001576)>.

Cuevas MSS, Oliveira KCN, Costa LA, et al. Hipersensibilidade a fármacos: um estudo sobre reações alérgicas a β -lactâmicos. *Revista Eletrônica Acervo Saúde*, v. 15, n.11, 2022. ISSN: 2178-2091. <<https://doi.org/10.25248/reas.e11197.2022>>.

Cunha H P, Baiense ASR. Uso de Vancomicina no Tratamento de Infecções Causadas por *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina (MRSA). *Revista*

Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação, [S.L.], v. 9, n. 4, p. 9242-9258, 2023. <<http://dx.doi.org/10.51891/rease.v9i4.9642>>.

Krewer CC, Amanso ES, Gouveia GV, et al. Resistance to antimicrobials and biofilm formation in *Staphylococcus* spp. isolated from bovine mastitis in the Northeast of Brazil. Trop Anim Health Prod, n. 3, v. 47, p. 511–518, 2015. <[https://doi: 10.1007/s11250-014-0752-9](https://doi:10.1007/s11250-014-0752-9)>.

Dan M, Yehui W, Qingling M, et al. Antimicrobial resistance, virulence gene profiles and molecular typing of *Staphylococcus aureus* isolates from dairy cows in Xinjiang, Northwest of China. J Glob Antimicrob Resist. v. 16, p. 98–104, 2018. <[https://doi: 10.1016/j.jgar.2018.08.024](https://doi:10.1016/j.jgar.2018.08.024)>.

Jong A, Garch FE, Simjee S, et al. Monitoring of antimicrobial susceptibility of udder pathogens recovered from cases of clinical mastitis in dairy cows across Europe: VetPath results. Vet Microbiol, v. 213, p. 73–81, 2018. <[https://doi: 10.1016/j.vetmic.2017.11.021](https://doi:10.1016/j.vetmic.2017.11.021)>.

Dias APM, Pinheiro MG, Alves FA. Características epidemiológicas e fatores de virulência em *Staphylococcus aureus*. Revta Acta Sci. Tech, n. 3, v. 1, p. 9-20, 2015. <[https://doi: https://doi.org/10.17648/uezo-ast-v3i1.77](https://doi:https://doi.org/10.17648/uezo-ast-v3i1.77)>.

Ferrasso MM, Gonzalez HL, Timm CD. *Staphylococcus hyicus*. Arquivos Do Instituto Biológico, n. 82, v. 0, 2015. <<https://doi:10.1590/1808-1657000672013>>.

Ferreira RA, Velloso RV. *Staphylococcus Aureus* resistentes à metilina (MRSA): Uma revisão sobre os mecanismos de resistência e as principais técnicas utilizadas em sua identificação. Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento, v. 6, n. 01, p. 29-38, 2021. ISSN: 2448-0959.

Garoy EY, Gebreab YB, Achila OO, et al. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): Prevalence and Antimicrobial Sensitivity Pattern among Patients-A Multicenter Study in Asmara, Eritrea. Can J Infect Dis Med Microbiol, v. 6, 2019. PMID: 30881532; PMCID: PMC6381584. <[https://doi: 10.1155/2019/8321834](https://doi:10.1155/2019/8321834)>.

Goudarzi M, Navidinia M, Dadashi M, et al. First report of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the *mecC* gene in human samples

from Iran: prevalence and molecular characteristics. *New microbes and new infections*, n. 5, v. 39, 2020. <<https://doi.org/10.1016/j.nmni.2020.100832>>.

Hata E. Bovine mastitis outbreak in Japan caused by methicillin resistant *Staphylococcus aureus* New York/Japan clone. *J Vet Diagn Invest*, n. 28, v. 3 p. 291–298, 2016. <<https://doi.org/10.1177/1040638716643126>>.

Ikhimiukor OO, Odih EE, Godoy PD, et al. A bottom-up view of antimicrobial resistance transmission in developing countries. *Nat Microbiol*, n. 7, p. 757–765, 2022. <<https://doi.org/10.1038/s41564-022-01124-w>>.

Jamali H, Radmehr B, Ismail S. Short communication: Prevalence and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis. *J Dairy Sci*, n. 97, v. 4, p. 2226–2230, 2014. <<https://doi.org/10.3168/jds.2013-7509>>.

Kapoor G, Saigal S, Elongavan A. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *J. Anaesthesiol, Cli. Pharmacol*, n. 33, v. 3, p. 300–305, 2017. <https://doi.org/10.4103/joacp.JOACP_349_15>.

Keyvan E, Yurdakul O, Demirtas A, et al. Identification of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Bulk Tank Milk. *FS&T, [S.L.]*, v. 40, n. 1, p. 150-156, 2020. *FapUNIFESP (SciELO)*. <<http://dx.doi.org/10.1590/fst.35818>>.

Khairullah AR, Sudjarwo SA, Effendi MH, et al. A review of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) on milk and milk products: Public health importance. *Sys Rev Pharm*, v. 11, n.8, p. 59-69, 2020. <<https://doi.org/10.31838/srp.2020.8.9>>.

Lakhundi S., Zhang K. Methicillin-Resistant: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. *Clin Microbiol Rev*. n. 12, v. 4, 2018. <<https://doi.org/10.1128/CMR.00020-18>>. PMID: 30209034; PMCID: PMC6148192.

Langoni H, Salina A, Oliveira GC, et al. Considerações sobre o tratamento das mastites. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 37, n. 11, p. 1261–1269, 2017. <<http://doi.org/10.1590/s0100-736x2017001100011>>.

Larsen J, Raisen CL, Ba X, et al. Emergence of methicillin resistance predates the clinical use of antibiotics. *Nature*, v. 602, p. 135–141, 2022. <<http://doi.org/10.1038/s41586-021-04265-w>>.

Leclercq RMD, Derlot E, Duval J, et al. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *New Engl. J. Med*, n. 319, v. 3, p. 157-61, 2001. <<http://doi: 10.1056/NEJM198807213190307>>.

Li L, Zhou L, Wang L, et al. Characterization of methicillin-resistant and -susceptible staphylococcal isolates from bovine milk in northwestern China. *Plos One*. n. 10, v. 3, p. 1-8, 2015. <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0116699>>.

Lim SK, Nam HM, Jang GC, et al. Transmission and persistence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in milk, environment and workers in dairy cattle farms. *Foodborne Pathog. Dis*, n. 10, v. 8, p. 731-736, 2013. PMID:23746358. <<http://dx.doi.org/10.1089/fpd.2012.1436>>.

Locatelli C, Cremonesi P, Bertocchi L, et al. Short communication: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in bulk tank milk of dairy cows and effect of swine population density. *J Dairy Sci*, n. 99, v. 3, p. 2151–2156, 2016. <<https://doi: 10.3168/jds.2015-9940>>.

Locatelli C, Cremonesi P, Caprioli A, et al. Occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dairy cattle herds, related swine farms, and humans in contact with herds. *J Dairy Sci*, n. 100, v. 1, p. 608–619, 2017. <<https://doi: 10.3168/jds.2016-11797>>.

Lord J, Millis N, Jones RD, et al. Patterns of antimicrobial, multidrug and methicillin resistance among *Staphylococcus* spp. isolated from canine specimens submitted to a diagnostic laboratory in Tennessee, USA: a descriptive study. *BMC Vet Res*, n. 8, v. 18, p. 91, 2022. <<https://doi.org/10.1186/s12917-022-03185-9>>.

Luini M, Cremonesi P, Magro G, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is associated with low within-herd prevalence of intra-mammary infections in dairy cows: Genotyping of isolates. *Vet Microbiol*, n. 178, v. 3-4, p. 270–274, 2015. <<https://doi: 10.1016/j.vetmic.2015.05.010>>.

Macedo VF, Zanardo JG, Lopes RPC, et al. Prevalência de coliformes e *Staphylococcus aureus* em mãos de manipuladores de alimentos de feira livre de Vitória, ES. *Salus J Health Sci*. [periódico na internet]. n. 2, v. 2, p. 27-38, 2016.

Madhaiyan M, Wirth JS, Saravanan VS. Phylogenomic analyses of the Staphylococcaceae family suggest the reclassification of five species within the genus *Staphylococcus* as heterotypic synonyms, the promotion of five subspecies to novel species, the taxonomic reassignment of five *Staphylococcus* species to *Mammaliococcus* gen. nov., and the formal assignment of *Nosocomiicoccus* to the family Staphylococcaceae. *IJSEM*, n. 70, v. 11, p. 5926-5936, 2020. <[https://doi: 10.1099/ijsem.0.004498](https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004498). PMID: 33052802>.

Magro G, Rebolini M, Beretta D, et al. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* CC22-MRSA-IV as an agent of dairy cow intramammary infections. *Vet Microbiol*, n. 227, p. 29–33, 2018. <[https://doi: 10.1016/j.vetmic.2018.10.021](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.10.021)>.

Dorneles EMS, Fonseca MDAM, Abreu JAP, Lage AP, Brito MAVP, Pereira CR, et al. Genetic diversity and antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* isolates from bovine mastitis in Minas Gerais, Brazil. *Microbiology Open*. 2019;8(5):00736. <[https://doi: 10.1002/mbo3.736](https://doi.org/10.1002/mbo3.736)>.

Manyl-Loh, C. Antibiotic Use in Agriculture and Its Consequential Resistance in Environmental Sources: Potential Public Health Implications. *Molecules* (Basel, Switzerland), n. 23, v. 4, p. 795, 2018. <<https://doi.org/10.3390/molecules23040795>>.

Mekonnen SA, Lam TJGM, Hoekstra J, et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from milk samples of dairy cows in small holder farms of Northwestern Ethiopia. *BMC Vet Res*, n. 1, v. 14, p. 246, 2018. <[https://doi: 10.1186/s12917-018-1558-1](https://doi.org/10.1186/s12917-018-1558-1)>.

Monistero V, Barberio A, Biscarini F, et al. Different distribution of antimicrobial resistance genes and virulence profiles of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical mastitis in six countries. *JDS*, n. 4, v. 103, p. 3431-3446, 2020. <[https://doi:10.3168/jds.2019-17141](https://doi.org/10.3168/jds.2019-17141)>.

Rossi BF, Bonsaglia ECR, Castilho IG, Dantas STA, Salina A, Langoni H, et al. Genotyping of long term persistent *Staphylococcus aureus* in bovine subclinical mastitis. *Microb Pathog*. 2019; 132:45-50. <[https://doi: 10.1016/j.micpath.2019.04.031](https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.04.031)>.

Obaidat MM, Salman AEB, Roess AA. High prevalence and antimicrobial resistance of *mecA Staphylococcus aureus* in dairy cattle, sheep, and goat bulk tank milk in Jordan. *Trop Anim Health Prod*, n. 50, v. 2, p. 405–412, 2018. <[https://doi: 10.1007/s11250-017-1449-7](https://doi.org/10.1007/s11250-017-1449-7)>.

Oliveira CJB, Tiao N, Sousa FGC, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from Brazilian dairy farms and identification of novel sequence types. *ZPH*, n. 63, v. 2, p. 97– 105, 2016. <[https://doi: 10.1111/zph.12209](https://doi.org/10.1111/zph.12209)>.

Papadopoulos P, Papadopoulos T, Angelidis AS, et al. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and of methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) along the production chain of dairy products in north-western Greece. *Food Microbiol*, n. 69, v. 50, p. 43–50, 2018. <[https://doi: 10.1016/j.fm.2017.07.016](https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.07.016)>.

Parisi A, Caruso M, Normanno G, et al. Prevalence, antimicrobial susceptibility and molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in bulk tank milk from southern Italy. *Food Microbiol*, n. 58, p. 36–42, 2016. <[https://doi: 10.1016/j.fm.2016.03.004](https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.03.004)>.

Parlet CP, Brown MM, Horswill AR, et al. Commensal *Staphylococci* Influence *Staphylococcus aureus* Skin Colonization and Disease. *TIM*, n. 27, v. 6, p. 497–507, 2019. <<https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.01.008>>.

Qu Y, Zhao H, Nobrega DBQU, et al. Molecular epidemiology and distribution of antimicrobial resistance genes of *Staphylococcus* species isolated from Chinese dairy cows with clinical mastitis. *J Dairy Sci*, n. 102, v. 2, p. 1571–1583, 2018. <[https:// doi: 10.3168/jds.2018-15136](https://doi.org/10.3168/jds.2018-15136)>.

Riva A, Borghi E, Cirasola D, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in raw milk: Prevalence, *SCCmec* typing, enterotoxin characterization, and antimicrobial resistance patterns. *J Food Prot*, n. 78, v.6, p. 1142–1146, 2015. <[https://doi: 10.4315/0362-028X.JFP-14-531](https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-531)>.

Rocha SFM, Santos LVP. *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina (MRSA) em Laboratório Vinculado à Rede Hospitalar em Maceió, Alagoas. SEMPESq - Semana De Pesquisa Da Unit - Alagoas, 2020. Recuperado de https://eventos.set.edu.br/al_sempesq/article/view/13776

Rola JG, Korpysa-Dzirba W, Czubkowska A, et al. Prevalence of enterotoxin genes and antimicrobial resistance of coagulase-positive *staphylococci* recovered from raw cow milk. *J Dairy Sci*, n. 7, v. 98, p. 4273–4278, 2015. <<https://doi.org/10.3168/jds.2014-9064>>.

Ronco T, Klaas IC, Stegger M, et al. Genomic investigation of *Staphylococcus aureus* isolates from bulk tank milk and dairy cows with clinical mastitis. *Vet Microbiol*, v. 215, p. 35–42, 2018. <<https://doi:10.1016/j.vetmic.2018.01.003>>.

Rodrigues MX, Silva NCC, Trevilin JH, et al. Antibiotic resistance and molecular characterization of *Staphylococcus* species from mastitic milk. *Afr. J. Microbiol. Res*, n. 11, v. 3, p. 84-91, 2017. <<https://doi.org/10.5897/AJMR2016.8347>>.

Ruegg PLA. 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. *J Dairy Sci*, n. 100, v. 12, p. 10381–10397, 2015. <<https://doi.org/10.3168/jds.2017-13023>>.

Sá JPN, Figueiredo CHA, Neto OLS, et al. Os principais microorganismos causadores da mastite bovina e suas consequências na cadeia produtiva de leite. *RBGA*, n. 1, v. 12, p. 01-13, 2018. <<https://doi:10.18378/rbga.v12i1.5785>>.

Sales, DC. Estudo da infecção intramamária e dos métodos de triagem para detecção de mastite subclínica em búfalas. Tese (Doutorado em Zootecnia). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Jaboticabal, p. 89, 2019.

Santos AS. Beta-lactâmicos em *Staphylococcus* spp. isolados de mastite em ruminantes. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Pernambuco. Recife, p. 106, 2018.

Santos AS, Mendonça TO, Muniz IM. Prevalência de mastite bovina em rebanhos leiteiros no Município de Rolim de Moura e adjacências, Rondônia. Pubvet, [S.L.], v. 14, n. 6, p. 1-6, 2020. <<http://dx.doi.org/10.31533/pubvet.v14n6a595.1-6>>.

Santos MV, Fonseca LFL. Controle da Mastite e Qualidade do Leite: Desafios e Soluções. Pirassununga: Edição dos Autores, 2019. ISBN: 9788591591312.

Shoib M, Aqib AI, Naseer MA, et al. Etiology of Bovine Mastitis. In: Dego, O. K., editor. Mastitis in Dairy Cattle, Sheep and Goats [Internet]. London: IntechOpen, p. 150, 2021. <<https://doi:10.5772/intechopen.98543>>.

Shrivastava N, Sharma V, Shrivastav A, et al. Prevalence and characterization of Panton-Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus* in bovine milk in Jabalpur district of Madhya Pradesh, India. Vet World, n. 11, v. 3, p. 316–320, 2018. <<https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.316-320>>.

Silva JG, Alcântara AM, Mota RA. Mastite bovina causada por *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina: revisão de literatura. Pesq. Vet. Bras., n. 38, v. 2, p. 223–228, 2018. <<https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-4996>>.

Silva SGM, Melo BA, Santos MT, et al. Resistência de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* à antibióticos. Res. Soc. Dev., [S.L.], v. 11, n. 2, p. 1-7, 29, 2022. <<http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i2.25693>>.

Siqueira AK, Salerno T, Lara GHB, et al. Enterotoxin genes, multidrug resistance, and molecular typing of *Staphylococcus* spp. isolated from organic bovine milk. B.J.V.R.A.S., n. 1, v.54, p. 81-87, 2017. <<http://dx.doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2017.109171>>.

Song JW, Yang SJ, Shin S, et al. Genotypic and phenotypic characterization of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitic milk in Korea. J Food Prot, n.79, v. 10, p. 1725–1732, 2016. <<https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-16-067>>.

Souza GAAD, Carvalho CMC, Xavier ED, et al. *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina e meropenem em leite de vacas com mastite subclínica/methicillin and meropenem resistant *Staphylococcus aureus* in milk of

cows with subclinical mastitis. B.J.D.V., [S.L.], n. 6, v. 12, p. 98067-98081, 2020. <<http://dx.doi.org/10.34117/bjdv6n12-340>>.

Tenhagen BA, Alt K, Pfefferkorn B, et al. Short communication: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in conventional and organic dairy herds in Germany. J Dairy Sci, n. 101, v. 4, p. 3380–3386, 2018. <<https://doi.org/10.3168/jds.2017-12939>>.

Torres-Caycedo MI, Castro-Gutiérrez LT, Prada-Quiroga CF, et al. Antibiotic Resistance: Origins, evolution and healthcare-associated infections. S.U., n. 34, v. 2, p. 494-505, 2018. <<https://doi.org/10.14482/sun.34.2.615.32>>.

Vishnupriya S, Antony PX, Mukhopadhyay HK, et al. Methicillin resistant *staphylococci* associated with bovine mastitis and their zoonotic importance. Vet. World, n. 7, v. 6, p. 422-427, 2014. <<http://dx.doi.org/10.14202/vetworld.2014.422-427>>.

Wulf MW, Sorum M, van Nes A, et al. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among veterinarians: an international study. Clin. Microbiol. Infect, n. 14, v. 1, p. 29-34, 2008. PMID:17986212. <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01873.x>>.

Xu Z, Shah HN, Misra R, et al. The prevalence, antibiotic resistance and *mecA* characterization of coagulase negative staphylococci recovered from non-healthcare settings in London, UK. Antimicrob. Resist. Infect. Control, n. 13, v. 7, p. 73, 2018. <<https://doi.org/10.1186/s13756-018-0367-4>>.

Yilmaz Eker F. Determination of growth and toxin production potential of *Staphylococcus aureus* and *Clostridium perfringens* during doner production process. Turk. J. Vet. Anim. Sci. n. 1, v. 43, p. 10-22, 2019. <<https://doi.org/10.3906/vet-1808-5>>.

Zanella JRC. Zoonoses emergentes e reemergentes e sua importância para saúde e produção animal. Pesq. Agrop. Bras, n. 51, v. 5, p. 510–519, 2016. <<https://doi.org/10.1590/S0100-204X2016000500011>>.

Zigo F, Vasil M, Ondrasovicová S, et al. Maintaining Optimal Mammary Gland Health and Prevention of Mastitis. *Front. Vet. Sci.*, n. 8, p. 607311, 2021 <<https://doi.org/10.3389/fvets.2021.607311>>.

2. STAPHYLOCOCCUS AUREUS RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS NO MANEJO FAMILIAR DE PRODUÇÃO LEITEIRA

RESUMO: As cepas de *Staphylococcus aureus* são heterogêneas: seus diferentes padrões de resistência e virulência, associados a fatores no nível do hospedeiro e a fatores de tratamento, estão relacionados à gravidade da infecção e, além disso, à sua capacidade de produzir amplas variedades de enterotoxinas estáveis ao calor. É um patógeno extraordinariamente versátil, de origem alimentar que sempre evoluiu, responsável por intoxicações alimentares estafilocócicas, infecções hospitalares e comunitárias, bem como pela síndrome do choque tóxico. Por esta razão, o presente estudo teve como objetivo isolar e identificar cepas de *S. aureus* resistentes a antibióticos no leite, nas mãos e na linha de ordenha em pequenos sistemas de produção em uma abordagem de saúde única. Um total de 122 amostras, incluindo água e esgoto (quando disponível), leite cru de tanques a granel, swabs de mãos de ordenhadores, úberes de vacas, equipamentos de ordenha e utensílios, foram coletadas de 12 propriedades familiares leiteiras da região metropolitana de Curitiba, PR, Brasil. Todas as amostras foram cultivadas em Ágar Baird Parker enriquecido com emulsão de gema de ovo. A determinação da resistência genotípica de *S. aureus* foi realizada pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para amplificação dos genes *blaZ*, *mecA*, *mecC*, *vanA* e *tetK*, assim como a resistência fenotípica foi realizada pelo teste de difusão em disco Kirby-Bauer para 10 antibióticos: (ciprofloxacina, clindamicina, cloranfenicol, eritromicina, estreptomicina, gentamicina, oxacilina, penicilina, tetraciclina e vancomicina). Os testes microbiológicos revelaram que de um total de 122 amostras avaliadas, 23 apresentaram contagens de *Staphylococcus* coagulase-positivas, predominantemente em amostras de leite (10/12), seguidas de mãos (5/24), úberes (4/24), águas residuais (2/2), equipamentos (1/24) e peneira (1/24). Todas as amostras de água apresentaram ≤ 100 UFC/ml para o microrganismo. Dentre os isolados selecionados, 53 (95,0%) foram identificados como *S. aureus*. Cepas multirresistentes foram observadas em três fazendas. Cinco isolados foram positivos para *vanA* nas mãos e no leite, assim como um isolado de leite *mecC*-positivo também testou positivo para *vanA*. Fenotípicamente observou-se

resistência à penicilina 9 (22%), oxacilina 5 (12%), clindamicina 3 (7%), eritromicina 2 (5%), estreptomicina 2 (5%), gentamicina 2 (5%) tetraciclina 1 (2%) e vancomicina 5 (12%); nenhum isolado apresentou resistência à ciprofloxacina e ao cloranfenicol. Considerando os resultados, chamamos a atenção para a necessidade de programas de vigilância, considerando sua presença e evolução clonal e o potencial de transmissão zoonótica de *vanA* e *mecC*-positivos. Além disso, é crucial destacar a necessidade de mais estudos sobre epidemiologia e rastreabilidade do patógeno.

Palavras-chave: *blaZ*; *mecC*; *vanA*.

2.1 INTRODUÇÃO

S. aureus é uma bactéria gram-positiva, comumente encontrada no trato respiratório e na pele de humanos e animais. Pode causar uma variedade de infecções, desde infecções de pele até infecções graves, como pneumonia, meningite e sepse (Pollitt et al., 2018). Além disso, é uma das principais causas de intoxicações alimentares transmitidas por alimentos, principalmente em laticínios (Mourenza et al., 2021).

Os produtos lácteos são produtos alimentares altamente nutritivos que podem ser contaminados por uma variedade de microrganismos, incluindo *S. aureus*. O manejo inadequado dos animais, a má higiene dos utensílios e equipamentos de produção e a falta de medidas preventivas podem contribuir para a presença e disseminação do *S. aureus* em produtos lácteos (Fazoli et al., 2023). Além disso, a resistência aos antibióticos é um problema crescente do *S. aureus*, o que pode limitar a eficácia dos tratamentos e aumentar o risco de infecções graves (Guo et al., 2020).

A resistência aos antibióticos em *S. aureus* pode ser causada por uma variedade de mecanismos, incluindo a produção de enzimas que inativam os antibióticos, alterando os seus alvos ou reduzindo a permeabilidade da membrana celular para impedir a entrada dos antibióticos (Zhang e Cheng, 2022). A seleção e o uso inadequado de antibióticos em animais e humanos também podem contribuir para o aumento da resistência de *S. aureus* aos antibióticos (Pokharel, Shrestha e Adhikari, 2020).

O uso clínico de meticilina levou ao aparecimento de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA). As últimas décadas testemunharam a existência de novos clones de MRSA. Ao contrário do MRSA tradicional que reside em hospitais, os novos clones podem invadir ambientes comunitários e infectar pessoas que apresentam fatores de risco (Lakhundi e Zhang, 2018).

A prevalência de MRSA e a sua resistência a uma extensa gama de antimicrobianos estão aumentando e causando preocupações a nível mundial (Obaidat et al., 2018). Nos últimos tempos, os cientistas relataram um aumento na prevalência do gene *mecA* que carrega resistência a múltiplos antibióticos (Al-Ashmawy et al., 2016).

A transmissão de cepas de *S. aureus* relacionadas ao leite entre vacas e humanos foi sugerida por Keyvan et al., 2020, cujo estudo mostrou MRSA em amostras de leite com antibióticos comparáveis aos de humanos, mas a transferência para humanos não foi comprovada.

A mastite pode ser originada por cepas de MRSA humano ou bovino já presentes em pequeno número e selecionadas pelo uso constante de antimicrobianos de longa ação, principalmente β -lactâmicos. *S. aureus* normalmente apresenta especificidade de hospedeiro limitada e pode ocorrer transferência entre diferentes espécies hospedeiras (Crespo-Piazuelo e Lawlor, 2021).

Além disso, a falta de assistência técnica para a produção nas pequenas propriedades leiteiras gera um desafio que pode levar a falhas nas medidas de gestão e controle dos animais. Frequentemente, os agricultores tratam os animais sem conhecimento da susceptibilidade à resistência antimicrobiana, estas práticas influenciam a transmissão e resistência dos patógenos, transmitindo um cenário epidemiológico diferente das propriedades leiteiras com produção em grande escala (Argudín et al., 2017).

Devido à relação animal-humano-animal, considerando o risco de transferência genética em uma abordagem de saúde única, o objetivo deste estudo foi avaliar o perfil de resistência de cepas de *S. aureus* no leite, ambiente de ordenha e ordenhadores da região metropolitana de Curitiba, PR, Brasil e o perfil das cepas circulantes na vizinhança, pessoa e animais.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Aprovação ética

Todo o procedimento experimental seguiu os princípios éticos adotados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais e Humanos da Universidade Federal do Paraná, licença número 034/2017 e 2327763 respectivamente.

2.2.2 Área de estudo

O estudo foi realizado em propriedades familiares leiteiras de São José dos Pinhais, região metropolitana de Curitiba, PR, Brasil. Esta não é uma região tradicional de produção de leite no Estado e foi escolhida, considerando os hábitos de autoconsumo de produtos lácteos. Após conversa com o proprietário da fazenda e a explicação dos objetivos e a natureza voluntária do estudo, foi realizada a visita nas propriedades. Foi garantido aos proprietários que o estudo se destinava apenas a fins de investigação e que quaisquer dados sobre a sua propriedade estariam disponíveis mediante pedido, gratuitamente. O consentimento para a coleta das amostras foi obtido do proprietário de cada fazenda antes do início do estudo.

2.2.3. Coleta de amostras

Foram estudadas 12 propriedades leiteiras no período de maio de 2017 a setembro de 2018. O volume de leite produzido por essas propriedades variou de 20 a 800 litros/dia. Todas as fazendas possuíam estrutura familiar com autogestão e todas as amostras de leite foram coletadas antes da ordenha.

Foram realizados testes microbiológicos de um total de 122 amostras testadas. As amostras coletadas foram água (n = 12), leite cru de tanque a granel (n = 12) onde foram acondicionados em sacos plásticos estéreis (Labplas Inc., Sainte-Julie, QC, Canadá). Swabs das mãos dos ordenhadores (n = 24 de 12 pessoas), tetos (n = 24 de 12 vacas), equipamentos de ordenha (telas de ordenha e tanque de armazenamento, n = 24) e utensílios (baldes, latas e/ou peneiras, n = 24) utilizando swabs estéreis contendo NaCl 0,85%, M/v. Água residual de

balde e latas (n = 2) quando encontrado no entorno da propriedade. Após a coleta, os materiais biológicos foram mantidos sob refrigeração por período não superior a 24 horas e encaminhados ao Laboratório de Controle de Qualidade e Segurança Alimentar (LACQSA) da Universidade Federal do Paraná para processamento e realização de técnicas de diagnóstico.

2.2.4. Isolamento bacteriano

O isolamento bacteriano de *Staphylococcus* spp. coagulase-positiva. (SCP), foi realizado em ágar Baird Parker (Difco Laboratories Inc., Detroit, EUA) enriquecido com emulsão de gema de ovo (HiMedia, Mumbai, Índia) e incubado aerobiamente a 37°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) com leituras após 24 e 48 horas para identificar a morfologia da colônia. Três a cinco colônias típicas e atípicas foram amostradas aleatoriamente para o teste de coagulase (Lancette e Bennett, 2001).

As cepas isoladas de SCP (n = 85) foram testadas para testes de catalase, deformação de Gram, DNase e fermentação de maltose. Cocos Gram-positivos com resultados positivos nos testes de catalase e coagulase que apresentaram produção de acetoina (teste de Voges-Proskauer) foram caracterizados como *S. aureus*.

2.2.5 Extração de DNA e confirmação de *S. aureus*

Alíquotas das culturas dos isolados selecionados foram submetidas à extração de DNA (Ahmed et al., 2014). As cepas características foram confirmadas como *S. aureus* pelo teste do gene *femA* obtido por desnaturação inicial a 95°C por 5 min, seguida por 35 ciclos de 95°C por 30 s, 53°C por 30 s e 72°C por 30 s. Extensão final a 72°C por 5 min (Dias et al., 2011).

Além disso, os isolados confirmados como *S. aureus* foram submetidos à PCR para detecção de *femB* (desnaturação inicial a 95°C por 5 min, seguida de 35 ciclos de 95°C por 30 s, 53°C por 30 s e 72°C por 150 s. Extensão final a 72°C por 5 min (Kobayashi et al., 2010) mod.

Posteriormente, a pesquisa investigou o perfil genético associado à resistência a antibióticos considerando *mecA*, aplicando desnaturação inicial a 95°C por 5 min, conforme descrito por Lee (2003) mod., seguida de 40 ciclos de

95°C por 30 s, 52° C por 30 segundos e 72°C por 60 segundos, com extensão final a 72°C por 10 min. Além disso, foram investigados *mecC*, *vanA*, *blaZ* e *tetK*. As etapas do PCR foram as mesmas que as realizadas para *femA*. A Tabela 2 descreve as sequências de primers, condições de reação e tamanhos de produtos de PCR relevantes para interpretação de dados. *S. aureus* ATCC 11229 serviu como controle positivo para *femA* e *mecA*.

Controles positivos para todos os genes foram fornecidos pelo LDIC, DMV, UFRPE e utilizados para confirmar a precisão do método de PCR.

Gene	Sequência de primers (5'-3')	Pares de base (PB)	Referências
<i>femA</i>	F: AAAAAAGCACATAACAAGCG R: GATAAAGAAGAAACCAGCAG	132	Dias <i>et al.</i> , 2011 (mod.)
<i>femB</i>	F: TTACAGAGTTAACTGTTACC R: ATACAAATCCAGCACGCTCT	651	Kobayashi <i>et al.</i> , 2010 (mod.)
<i>mecA</i>	F:AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC R:AAAATCGATGGTAAAGGTTTGC	533	Lee, 2003 (mod.)
<i>meC</i>	F:GAAAAAAAGGCTTAGAACGCCCTC R:GAAGATCTTTTCCGTTTTTCAGC	138	Vesterholm-Nielsen <i>et al.</i> , 1999
<i>blaZ</i>	F: AGAGATTTGCCTATGCTTC R: CTTGACCACCTTTTATCAGC	516	Vesterholm-Nielsen <i>et al.</i> , 1999
<i>vanA</i>	F:ATGGCAAGTCAGGTGAAATGG R:TCCACCTCGCCAACAACACTAACG	399	Woodford <i>et al.</i> , 1986 (mod.)

Tabela 2: Sequências de primers para PCR e seus respectivos tamanhos de amplicons em pares de bases (pb) e referências.

2.2.6 Teste de suscetibilidade antimicrobiana

Dentre os isolados de *S. aureus* que apresentaram diferentes genes de resistência por PCR, foram submetidos ao antibiograma, seguindo o método de difusão em disco Kirby-Bauer (CLSI, 2017).

As alíquotas selecionadas foram estriadas em ágar BHI (Oxoid Ltd., Basingstoke, Inglaterra) de acordo com as diretrizes do Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (2017), incubadas a 37°C por 24 horas, e as colônias isoladas suspenderam NaCl 0,85% (m/v) até obter uma suspensão com turbidez semelhante à escala de McFarland 0,5, o que corresponde a aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. As suspensões dos isolados foram então distribuídas uniformemente na superfície do ágar Mueller Hinton (Kasvi, São José dos Pinhais, Brasil) e, após secagem, foram avaliadas quanto à resistência a 10 antibióticos: ciprofloxacina, clindamicina, cloranfenicol, eritromicina, estreptomicina, gentamicina, oxacilina, penicilina, tetraciclina e vancomicina.

Após incubação a 37°C por 24 horas, os halos de inibição (quando presentes) foram medidos com paquímetro, e os isolados classificados como resistentes ou sensíveis aos antibióticos avaliados (CLSI, 2017).

2.2.7 Genotipagem REP-PCR

A reação de amplificação para REP-PCR foi realizada conforme protocolo, com modificações. O DNA genômico foi extraído pelo método Fenol: Clorofórmio: Álcool isoamílico (Sambrook et al., 1989) com modificações. A reação de amplificação para REP-PCR foi realizada conforme protocolo descrito por Van Der Zee et al. (1999), com modificações. As reações continham um volume total de 25 µL, contendo tampão (1X), MgCl₂ (3 mM), dNTPs (200 µM de cada), primer RW3A (5'-TCG CTC AAA ACA ACG ACACC-3') (1 pmol), Taq DNA polimerase (1U), água ultrapura e 100ng de DNA genômico alvo. A mistura reacional foi incubada em um termociclador (TPersonalThermocycler, Biometra®, Alemanha) sob as seguintes condições de ciclo: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguida por 30 ciclos de amplificação (desnaturação a 94°C por 1 minuto,

recozimento a 50 °C por 1 minuto e polimerização a 72°C por 2 minutos) e extensão final a 72°C por 5 minutos.

Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TAE 1X a uma voltagem constante de 400 V/cm e corados com brometo de etídio (0,5 µg/ml). O tamanho dos fragmentos foi visualizado utilizando um transiluminador UV (Carestream Molecular Imaging Software - Versão 5.0, ©Carestream Health, Inc, EUA) e esses fragmentos foram comparados com um padrão de peso molecular de 100 pb (Ludwig Biotec, Brasil). Como controle positivo, foi utilizada a cepa padrão *S. aureus* USA 400.

O dendrograma foi construído pelo método de grupos de pares não ponderados com algoritmo de agrupamento de média aritmética (UPGMA) e a similaridade genética entre os isolados foi calculada através do coeficiente de Jaccard (tolerância de 1%), utilizando o software BioNumerics® (versão 7.1, AppliedMaths, Bélgica).

2.3 RESULTADOS

As propriedades estudadas possuíam uma produção de 20 a 260 litros de leite por dia e uma produtividade das vacas de 2 a 30 L/dia, além disso duas delas afirmaram não respeitar o período de carência para enviar o leite para a indústria (Tabela 3).

Fazenda	Produção/leite/dia (L)	Produção vacas (L)	Respeita o período de carência
1	155	16	S
2	200	20	NI
3	70	7	S
4	200	14	S
5	260	17	S
6	160	30	NI
7	150	10	N
8	60	12	S
9	180	10	N

10	800	22	S
11	50	2	S
12	20	5	NI

Tabela 3: Produção de leite/dia e produtividade de vacas em amostras das propriedades de produção leiteira de São José dos Pinhais-PR, Brasil.

*S: Sim; N: Não; NI: Não informou.

De um total de 122 amostras analisadas, 23 apresentaram contagens de *Staphylococcus* coagulase-positivas, predominantemente nas amostras de leite (10/12), seguidas de mãos (5/24), úberes (4/24), água residual (2/2), equipamentos (1 /24) e peneira (1/24). Todas as amostras de água apresentaram ≤ 100 UFC/ml para o microrganismo (Tabela 4).

Um total de 85 colônias obtidas foram analisadas por meio de testes fenotípicos e genotípicos para identificação preliminar de *S. aureus*, sendo que 56 isolados foram compatíveis com a espécie. 53 isolados apresentaram o gene *femA*, confirmando a presença de *S. aureus*, bem como 45 (85%) deles apresentaram *femB* (Tabela 5).

Os isolados apresentaram sensibilidade fenotípica de 78 a 100% aos antibióticos testados (Tabela 5). Cepas multirresistentes ocorreram em 3 fazendas (2, 3 e 7). 5 isolados foram positivos para *vanA* nas mãos e no leite, e 1 isolado de leite foi positivo para *mecC* e para *vanA*.

Fenotipicamente houve isolados resistentes à penicilina 9 (22%), oxacilina 5 (12%), clindamicina 3 (7%), eritromicina 2 (5%), estreptomicina 2 (5%), gentamicina 2 (5%) tetraciclina 1 (2%) e vancomicina 5 (12%); nenhum isolado apresentou resistência à ciprofloxacina e ao cloranfenicol (Tabela 5).

Não houve correlação entre as cepas encontradas no leite e nas mãos (Figura 1), mas houve correlação entre cepas de diferentes fazendas (1, 2 e 3).

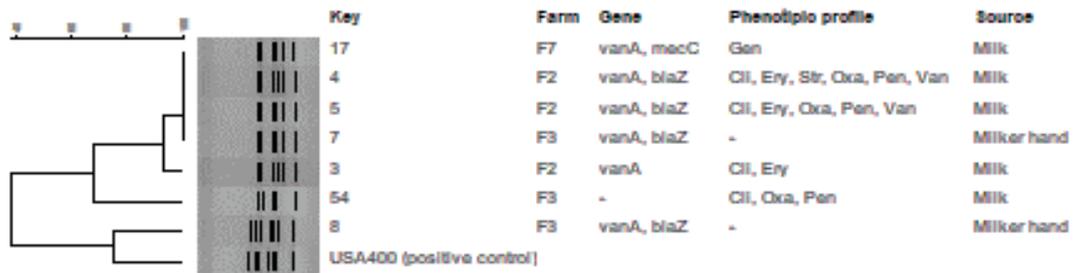


Figura 1: Dendrograma – Genotipagem REP-PCR.

No dendrograma, as amostras 3, 4 e 5 são de leite da fazenda 2. As amostras 7 e 8 são de mãos, e 54 é de leite da fazenda 3. A amostra 17 é de leite da fazenda 7.

Contagem SCP (Log CFU/cm ² or Log CFU/mL) das propriedades												
Amostras	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Leite	4.17	3.23	4.92	3.08	3.36	≤1	2.85	≤1	3.97	4.46	3.01	4.24
Mão direita	1.45	≤1	1.98	1.61	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1
Mão esquerda	≤1	≤1	2.53	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1
Teto A	1.52	≤1	≤1	≤1	3.00	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1
Teto B	1.95	≤1	≤1	≤1	2.09	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1
Equipamento A	≤1	1.11	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1
Equipamento B	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1
Utensílio A	2.49	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1
Utensílio B	*	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1
Água residual	*	AI	AI	2.72	AI	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1

Tabela 4: Contagens de *Staphylococcus coagulase positiva* em amostras de produção leiteira de São José dos Pinhais-PR, Brasil.

AI: Amostra indisponível.

Fazenda	femA	femB	mecA	mecC	vanA	blaZ	tetK	Resistência fenotípica
1	teteira, leite, teto	teteira, leite, teto	-	-	-	teteira	-	*
2	leite	-	-	-	leite	leite	-	CLI, ERI, STR, OXA, PEN, VAN
3	leite, mão direita e esquerda	leite, mão direita e esquerda	-	-	mão esquerda	mão esquerda	-	leite e mão esquerda: PEN, leite: CLI and OXA, mão direita OXA
4	leite, mãos, água residual	leite, mãos, água residual	-	-	-	-	mão	mão direita: PEN, TET
5	leite, teto	leite, teto	-	-	-	-	-	*
6	-	-	-	-	-	-	-	-
7	leite	leite	-	leite	leite	-	-	STR, GEN
8	-	-	-	-	-	-	-	-
9	leite	leite	-	-	-	leite	-	PEN
10	leite	leite	-	-	-	leite	-	-
11	leite	leite	-	-	-	-	-	-
12	leite, mãos	leite, mãos	-	-	-	-	-	mão direita: OXA

Tabela 5: Distribuição da positividade genotípica para identificação de *S. aureus* e resistência a antibióticos entre as amostras analisadas.

CLI: clindamicina (2 mcg), CL: cloranfenicol (30mcg), ERI: eritromicina (15 mcg), STR: estreptomicina (10 mcg), GEN: gentamicina (10 mcg), OXA: oxacilina (1 mcg), PEN: penicilina (10UI), TET: tetraciclina (30 mcg), VAN: vancomicina (30mcg).

* As cepas foram perdidas por um acidente de laboratório

2.4 DISCUSSÃO

S. aureus foi confirmado neste estudo pela detecção de *femA* em 53 cepas. Esses isolados originaram-se de amostras de leite (33, 62%), mãos (11, 21%), tetos (4,8%), teteiras (2,4%), águas residuais (2,4%) e filtro (1,2%). Os resultados apontaram altas frequências de *S. aureus* em amostras de leite cru, principalmente em comparação com estudos semelhantes desenvolvidos em outros países e regiões do Brasil, que relataram baixa prevalência de *S. aureus femA*-positivo (Obaidat et al., 2018).

A presença de *S. aureus* no leite cru está associada a más práticas de ordenha e manejo inadequado de animais, utensílios e equipamentos de ordenha, destacando a importância dessas práticas para a obtenção de leite de alta qualidade (Arenas et al., 2017).

Dos 53 isolados de *S. aureus*, 10 (19%) foram positivos para *blaZ*. A expressão do gene *blaZ* determina a resistência aos betalactâmicos e caracteriza a produção de penicilinas/beta-lactamases, enzimas responsáveis pela inativação dos betalactâmicos, que são um grupo de antibióticos, composto por penicilinas, incluindo metilicilina, cefalosporinas, cefamicinas, monobactâmicos e carbapenêmicos (Bush, 2018).

A fazenda 1 apresentou maior contagem de SCP no leite, mão direita, teto A, teto B e utensílios, esse resultado pode ser atribuído à ineficácia do processo de higiene e condições sanitárias na ordenha ou contaminação pós-ordenha. *S. aureus* foi detectado na teteira, leite e teto. O agricultor informou que respeita o período de carência dos medicamentos administrados às vacas. A cepa láctea não apresentou resistência fenotípica aos antibióticos. As linhagens do teto apresentaram gene *blaZ*. Infelizmente, as cepas foram perdidas por acidente de laboratório, portanto o perfil fenotípico de resistência não foi alcançado.

Na fazenda 2 foi detectado *S. aureus* no leite. O agricultor não informou sobre o período de carência. A cepa láctea apresentou resistência fenotípica à clindamicina, eritromicina, estreptomicina, oxacilina, penicilina e vancomicina. Além disso, as cepas apresentaram genes *vanA* e *blaZ*. O dendrograma apresentou a amostra 3 (leite) próxima da amostra 54 (leite da fazenda 3) em semelhança com USA400 (clone MRSA). Podemos sugerir que as cepas estavam circulando pela vizinhança e pode ser transmitido de pessoa para

pessoa ou por equipamento de transporte de leite para uma fábrica de laticínios.

Na fazenda 3 foi detectado *S. aureus* nas mãos do ordenhador e no leite. O agricultor informou que respeita o período de carência dos medicamentos administrados às vacas. O leite e a mão esquerda apresentaram resistência fenotípica à penicilina, o leite à clindamicina e à oxacilina e a mão direita à oxacilina. As cepas da mão esquerda mostraram genes *vanA* e *blaZ*. O dendrograma mostrou semelhança da amostra 8 (mão do ordenador) e do USA400 (clone de MRSA). A amostra também se aproxima da amostra 54 (leite da mesma fazenda), provavelmente diminuindo a transferência de material genético entre espécies (humana e bovina).

O risco de contágio de MRSA de origem bovina para a população humana é baixo. Em geral, as pessoas não correm risco se não consumirem leite cru. Embora, pessoas em contato próximo com bovinos infectados por MRSA, incluindo veterinários, agricultores, ordenhadores e pessoas que trabalham em matadouros, possam ser infectadas (Caruso, 2016).

Na fazenda 4 foi detectado *S. aureus* nas mãos, leite e água residual. O agricultor informou que respeita o período de carência dos medicamentos administrados às vacas. A amostra da mão apresentou resistência fenotípica à penicilina e tetraciclina e positivas para o gene *tetK*.

Na fazenda 5 foi detectado *S. aureus* no leite e no teto. O agricultor informou que respeita o período de carência dos medicamentos administrados às vacas. As cepas não apresentaram genes de resistência a antibióticos. Infelizmente, as cepas foram perdidas por acidente de laboratório, portanto o perfil fenotípico de resistência não foi alcançado.

A fazenda 6 apresentou a melhor produtividade por vaca entre as fazendas estudadas. Nesta fazenda não foi detectado *S. aureus*.

Na fazenda 7 o *S. aureus* foi detectado apenas no leite. O produtor informou que respeita o período de carência dos medicamentos administrados às vacas. Este leite apresentou genes *mecC* e *vanA*, além de resistência fenotípica à estreptomicina e gentamicina. Apesar disso, a amostra de leite não estava próxima ao USA400 (clone MRSA) no dendrograma (Figura 1). Até agora, poucos estudos relataram cepas de MRSA resistentes à vancomicina em animais, e o primeiro relato de MRSA em alimentos de origem animal ocorreu na

Índia (Bhattacharyya et al., 2016). Da mesma forma, a presença de isolados *vanA* positivos no leite e nas mãos dos ordenhadores é motivo de preocupação e, embora seja muito difícil determinar a origem destes isolados, a sua presença em múltiplos locais indica a sua circulação no ambiente de produção leiteira (Keyvan et al., 2020).

A fazenda 8 é uma propriedade de baixa produtividade, considerada um risco pelo possível autoconsumo de leite e produtos lácteos crus, mas nesta fazenda não foi detectado *S. aureus*.

Na fazenda 9 foram detectados *S. aureus* no leite. O agricultor informou que respeita o período de carência dos medicamentos administrados às vacas, no entanto a cepa láctea apresentou resistência à penicilina e apresentou gene *blaZ*.

Na fazenda 10 foram detectados *S. aureus* no leite. O agricultor informou que respeita o período de carência dos medicamentos administrados às vacas. A cepa láctea não apresentou resistência fenotípica a antibióticos, mas apresentou gene *blaZ*.

Na fazenda 11 foram detectados *S. aureus* no leite. O agricultor informou que respeita o período de carência dos medicamentos administrados às vacas. A cepa láctea não apresentou resistência a antibióticos, nem apresentou resistência fenotípica aos compostos testados.

Na fazenda 12 foram detectados *S. aureus* no leite e nas mãos. O produtor não informou se respeita o período de carência dos medicamentos administrados às vacas. A cepa do leite não apresentou resistência a antibióticos. A cepa da mão mostrou gene de oxacilina, mas o exame foi feito pelo teste de Kirby Bauer. Além disso, 60% dos *S. aureus* isolados de vacas leiteiras eram resistentes a pelo menos um antimicrobiano.

Neste cenário, 20% (n = 2) apresentaram resistência a apenas um antimicrobiano, em comparação com 20% de resistência a dois antimicrobianos e 20% de resistência a mais de três antimicrobianos. Os isolados resistentes apresentaram oito padrões de resistência diferentes. Embora não tenha sido possível obter informações precisas sobre os padrões de uso de antibióticos nas propriedades leiteiras incluídas neste estudo, a ocorrência de altos níveis de resistência aos antibióticos pode indicar variações na seleção de antibióticos e

nas práticas de uso.

O gene *mecA* não foi encontrado em nenhum isolado deste estudo, corroborando com o estudo realizado por Pekana e Green em 2018, que mostrou ausência de *mecA* nas 200 amostras de leite avaliadas.

Dez isolados (19%) destacaram a presença do gene *blaZ*. Dentre eles, 7 (70%) eram fenotipicamente resistentes à penicilina e dois à oxacilina (tabela 4). Esses resultados foram semelhantes aos observados por Pekana e Green (2018), que encontraram prevalência de 14,9% do gene *blaZ* em isolados obtidos de leite e carcaças bovinas.

Em comparação com estudos anteriores, o MRSA ainda é um problema de saúde pública para o leite e produtos lácteos. Programas de vigilância e adoção de sistemas de garantia de qualidade são necessários para controlar o *S. aureus*, MRSA e outros patógenos na indústria de laticínios. O surgimento e a ampla disseminação de MRSA devido ao uso indevido de agentes antimicrobianos em vacas leiteiras destacam a relevância epidemiológica desta espécie animal para a transmissão desses microrganismos e a ocorrência de infecções em humanos e animais em todo o mundo (Dweba, 2019).

Com a crescente expansão da abordagem saúde única, a melhor forma de gerir o problema da resistência antimicrobiana inclui tomar medidas para preservar a eficácia do uso contínuo de antimicrobianos existentes, bem como, tentar eliminar o uso inadequado, especialmente quando são usados em grandes volumes (Collignon e McEwen, 2019).

2.5 CONCLUSÃO

A alta capacidade de disseminação e a plasticidade genômica para o desenvolvimento de resistência aos antibióticos destacadas pelo presente estudo, corroboram com as atuais preocupações de saúde única (saúde animal, humana e ambiental). Esses estudos deverão abordar diferentes espécies animais, como animais de estimação, animais silvestres, de criação e toda a cadeia produtiva de alimentos de origem animal para consumo humano, e

chamar a atenção para a necessidade de programas de vigilância e educação para os produtores de leite.

Além disso, recomenda-se que os ordenhadores sejam conscientizados sobre a importância da higiene pessoal e do ambiente de ordenha, do uso racional de antimicrobianos e da escolha dos antimicrobianos somente após a realização de testes de sensibilidade *in vitro*, reduzindo a possibilidade da seleção de *S. aureus* resistente.

2.6 DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSES

Não foi relatado nenhum conflito de interesse relevante para este artigo.

2.7 AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado em parte pelo Código Financeiro 001 da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES). Faz parte do mestrado de Luany Yone Miyoshi na Universidade Federal do Paraná. Miyoshi foi patrocinado pela bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e PROCAD-Cadeias Leiteiras UFV, UFPR e UNIVASF. Além disso, faz parte do doutorado de Fernanda Pistori Machado, na Universidade Federal do Paraná. Machado foi patrocinado por uma bolsa da CAPES. Os autores gostariam de agradecer aos técnicos da Secretaria de Agricultura e Abastecimento de São José dos Pinhais, Paraná, por toda ajuda durante o estudo.

2.8 REFERÊNCIAS

Ahmed, O. B., Asghar, A. H., Elhassan, M. M, 2014. Comparison of three DNA extraction methods for polymerase chain reaction (PCR) analysis of bacterial genomic DNA. Afr. J. Microbiol. Res. 8, 598-602. <<https://doi.org/10.5897/ajmr2013.6459>>.

- Al-Ashmawy, M. A., Sallam, K. I., Abd-Elghany, S. M., Elhadidy, M., Tamura, T., 2016. Prevalence, Molecular Characterization, and Antimicrobial Susceptibility of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated from Milk and Dairy Products. *Foodborne Pathogens and Disease*, 13(3), 156–162. <<https://doi:10.1089/fpd.2015.2038>>.
- Arenas, N. E., Abril, D. A., Valencia, P., Khandige, S., Soto, C. Y., Moreno-Melo, V. 2017. Screening food-borne and zoonotic pathogens associated with livestock practices in the Sumapaz region, Cundinamarca, Colombia. *Trop Anim Health Prod*, 49(4):739-745. <<http://doi:10.1007/s11250-017-1251-6>>.
- Argudín, M. A., Deplano, A., Meghraoui, A., Dodémont, M., Heinrichs, A., Denis, O., Nonhoff, C., Roisin, S. 2017. Bacteria from Animals as a Pool of Antimicrobial Resistance Genes. *Antibiotics*, 6(2), 12. <<https://doi.org/10.3390/antibiotics6020012>>.
- Bhattacharyya, D., Banerjee, J., Bandyopadhyay, S., Mondal, B., Nanda, P. K., Samanta, I., Mahanti, A., Das, A. K., Das, G., Dandapat, P., Bandyopadhyay, S., 2016. First Report on Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Bovine and Caprine Milk. *Microb. Drug. Resist.*22, 675-681. <<https://doi.org/10.1089/mdr.2015.0330>>.
- Bush, K., 2018. Past and Present Perspectives on β -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, AAC.01076–18. <https://doi:10.1128/aac.01076-18>.
- Caruso, M., Latorre, L., Santagada, G., Fracalvieri, R., Miccolupo, A., Sottili, R., Palazzo, L., Parisi, A., 2016. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in sheep and goat bulk tank milk from Southern Italy. *Small Ruminant Research*, 135, 26–31. <<https://doi:10.1016/j.smallrumres.2015.12>>.
- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI., 2017. document M100 – 27^a ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 282p.
- Collignon, P. J., McEwen, S. A. 2019. One Health-Its Importance in Helping to Better Control Antimicrobial Resistance. *Tropical medicine and infectious disease*, 4(1), 22. <<https://doi.org/10.3390/tropicalmed4010022>>.

Crespo-Piazuelo, D., Lawlor, P. G., 2021. Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (LA-MRSA) prevalence in humans in closecontact with animals and measures to reduce on-farm colonization. *Ir Vet J*, 74, 21. <<https://doi.org/10.1186/s13620-021-00200-7>>.

Dias, N. L., Silva, D. C. B., Oliveira, D. C. B. S., Fonseca, J. A., Sales, M. L., Silva, N., 2011. Detecção dos genes de *Staphylococcus aureus*, enterotoxinas e de resistência à metilina em leite. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 63, 1547-1552. <<https://doi.org/10.1590/S0102-09352011000600036>>.

Dweba, C. C., Zishiri, O. T., El Zowalaty, M. E., 2019. Isolation and Molecular Identification of Virulence, Antimicrobial and Heavy Metal Resistance Genes in Livestock-Associated /Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Pathogens* 8, 79-100. <<https://doi.org/10.3390/pathogens8020079>>.

Fazoli, K. G. Z., Rey, L. M. R., Rúbio, K. A. J., Garcia Souza, M. A., Oliveira, H. M. D. S., Ribeiro, D. C., Pereira, K. R. J. D., Kawamo, D. M., Gomes, T. K. A., Silva, I. B. Santos, I. C., Ferreira, L. R. P., Rahal, I. L., Valle, J. S., Ruiz, S. P., Faria, M. G. I., Gazim, Z. C., Piau Junior, R., Gonçalves, D. D. 2023. Resistance profile of bovine mastitis isolates, presence of the *mecA* gene and identification of *ESBL* producing strains from small rural dairy properties. *Animals*, 13, 1147. <<https://doi.org/10.3390/ani13071147>>.

Guo, Y., Song, G., Sun, M., Wang, J., Wang, Y. 2020. Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 10, 107. <<https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00107>>.

Keyvan, E., Yurdakul, O., Demirtas, A., Yalcin, H., Bilgen, N. 2020. Identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in bulk tank milk. *Food Science and Technology*, [S.L.], v. 40, n. 1, p. 150-156. <<http://dx.doi.org/10.1590/fst.35818>>.

Kobayashi, M., Seki, M., Tabata, H., Watanabe, Y., Yamashita, I. 2010. Fabrication of aligned magnetic nanoparticles using tobamoviruses. *Nano Lett.* 10;10(3):773-6. <<https://doi.org/10.1021/nl902405s>>. PMID: 20158260.

Lakhundi, S. & Zhang, K. 2018. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. Clin Microbiol Rev. Sep 12;31(4): <<https://doi.org/10.1128/cmr.00020-18>>.

Lancette, G. A., Bennett, R.W. 2001. *Staphylococcus Aureus* and *Staphylococcal Enterotoxins*. In: Downes, F. P. & Ito, K., Eds., Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4 Edition, APHA, Washington DC, 387-403.

Lee, J. H. 2003. Methicillin (oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. Appl. Environ. Microbiol. 69, 6489–6494. <<https://doi.org/10.1128/AEM.69.11.6489>>.

Mourenza, Á., Gil, J. A., Mateos, L. M., Letek, M. 2021. Novel treatments and preventative strategies against food-poisoning caused by Staphylococcal species. Pathogens: 10(2), 91. <<https://doi.org/10.3390/pathogens10020091>>.

Obaidat, M. M., Bani Salman, A. E., Roess, A. A., 2017. High prevalence and antimicrobial resistance of *mecA Staphylococcus aureus* in dairy cattle, sheep, and goat bulk tank milk in Jordan. Tropical Animal Health and Production: 50(2), 405–412. <<https://doi:10.1007/s11250-017-1449-7>>.

Pekana, A., & Green, E., 2018. Antimicrobial Resistance Profiles of *Staphylococcus aureus* Isolated from Meat Carcasses and Bovine Milk in Abattoirs and Dairy Farms of the Eastern Cape, South Africa. International Journal of Environmental Research and Public Health, v. 15, n. 10, p. 2223. <<https://doi.org/10.3390/ijerph15102223>>.

Pokharel, S., Shrestha, P., Adhikari, B. 2020. Antimicrobial use in food animals and human health: time to implement ‘One Health’ approach. Antimicrob Resist Infect Control: 9, 181. <<https://doi.org/10.1186/s13756-020-00847-x>>.

Pollitt, E. J. G., Szkuta, P. T., Burns, N., Foster, S. J. 2018. *Staphylococcus aureus* infection dynamics. PLoS Pathog: 14(6): <<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007112>>.

Sambrook, J., Fritsch, E. R., & Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed.). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Van Der Zee, A., Verbakel, H., Van Zon, J. C., Frenay, I., Van Belkum, A., Buiting, A., Bergmans, A. 1999. Molecular genotyping of *Staphylococcus aureus* strains: comparison of repetitive element sequence-based PCR with various typing methods and isolation of a novel epidemicity marker. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 37, n. 2, p. 342-349, 1999. <<https://doi:10.1128/JCM.37.2.342-349.1999>>.

Vesterholm-Nielsen, M., Larsen, M. O., Olsen, J. E., Aarestrup F. M. 1999. Occurrence of the *blaZ* gene in penicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Denmark. *Acta Vet. Scand.* 40, 279-86. <<https://doi:10.1186/BF03547026>>.

Woodford, J. A., Jorgensen, N. A., Barrington, G. P. 1986. Impact of dietary fiber and physical form on performance of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 69(4):1035-47. <[https://doi:10.3168/jds.S0022-0302\(86\)80499-4](https://doi:10.3168/jds.S0022-0302(86)80499-4)>.

Zhang, F., Cheng, W. 2022. The Mechanism of Bacterial Resistance and Potential Bacteriostatic Strategies. *Antibiotics.* 11(9):1215. <<https://doi.org/10.3390/antibiotics11091215>>.

3. LISTA DE REFERÊNCIAS

Acosta, AC; Silva, LBG; Medeiros, ES; Pinheiro-Júnior, JW; Mota, RA. *Mastites em ruminantes no Brasil. Pesquisa Veterinária Brasileira*, 36(7), 565–573. 2016. <<http://doi:10.1590/s0100-736x2016000700001>>.

Ahangari Z, Ghorbanpoor M, Shapouri MRS, et al. Methicillin resistance and selective genetic determinants of *Staphylococcus aureus* isolates with bovine mastitis milk origin. *Iran J Microbiol*, v.9, n.3, p. 152–159, 2017. PMID: 29225754; PMCID: PMC5719509.

Ahmed, OB; Asghar, AH; Elhassan, MM. 2014. Comparison of three DNA extraction methods for polymerase chain reaction (PCR) analysis of bacterial genomic DNA. *Afr. J. Microbiol. Res.* 8, 598-602. <<https://doi.org/10.5897/ajmr2013.6459>>.

Al-Ashmawy, MA.; Sallam, KI; Abd-Elghany, SM; Elhadidy, M; Tamura, T; 2016. Prevalence, Molecular Characterization, and Antimicrobial Susceptibility of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated from Milk and Dairy

Arenas, NE; Abril, DA; Valencia, P; Khandige, S; Soto, CY; Moreno-Melo, V. 2017. Screening food-borne and zoonotic pathogens associated with livestock practices in the Sumapaz region, Cundinamarca, Colombia. *Trop Anim Health Prod*, 49(4):739-745. <doi: 10.1007/s11250-017-1251-6>.

Argudín, MA; Deplano, A; Meghraoui, A; Dodémont, M; Heinrichs, A; Denis, O; Nonhoff, C; Roisin, S. 2017. Bacteria from Animals as a Pool of Antimicrobial Resistance *Genes. Antibiotics*, 6(2), 12. <<https://doi.org/10.3390/antibiotics6020012>>.

Aslantas O, Demir C. Investigation of the antibiotic resistance and biofilm-forming ability of *Staphylococcus aureus* from subclinical bovine mastitis cases. *J Dairy Sci*, n. 99, v. 11, p. 8607– 8613, 2016. <<https://doi: 10.3168/jds.2016-11310>>.

Avellar-Costa P, Santos DC, Lange CC, et al. Accurate identification of atypical *Staphylococcus chromogenes* plasma-clotting strains causing bovine mastitis:

Ciência Rural, [S.L.], v. 49, n. 6, p. 1-3, 2019. FapUNIFESP (SciELO). <<http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20190168>>.

Bao H, Zhang H, Zhou Y. Prevalence, enterotoxin gene and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from clinical healthy dairy cows. Pak Vet J. n. 36, v. 3, p. 270–274, 2016. <<https://doi.org/10.3168/jds.2014-9064>>.

Barberato-Filho S, Bergamaschi, CC, Del Fiol F, et al. *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina nas Américas: revisão sistemática e metanálise da prevalência na pecuária. Revista Panamericana de Salud Pública, [S.L.], v. 44, p. 1, 2020. Pan American Health Organization. <<http://dx.doi.org/10.26633/rpsp.2020.48>>.

Becker, K; van Alen, S; Idelevich, E. A; Schleimer, N; Seggewiß, J; Mellmann, A; Kaspar, U; Peters, G. Plasmid-Encoded Transferable mecB-Mediated Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Emerging infectious diseases*, 24(2), 242–248, 2018. <<https://doi.org/10.3201/eid2402.171074>>.

Benkerroum N. *Staphylococcal* enterotoxins and enterotoxin-like toxins with special reference to dairy products: An overview. *Critical reviews in Food science and nutrition*, v. 58, n. 12, p. 1943-1970, 2018. <<https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1289149>>.

Beyene, T; Hayishe, H; Gizaw, F; Beyi, A. F; Abunna, F; Mammo, B; Ayana, D; Waktole, H; Abdi, R. D. Prevalence and antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus* in dairy farms, abattoir and humans in Addis Ababa, Ethiopia. *BMC Res Notes*. Apr 28;10(1):171. 2017. <<https://doi.org/10.1186/s13104-017-2487-y>>. PMID: 28454589; PMCID: PMC5410091.

Bhattacharyya D, Banerjee J, Bandyopadhyay S, et al. First Report on Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Bovine and Caprine Milk. *Microbial Drug Resistance*, n. 22, v. 8, p. 675–681, 2016. <<https://doi.org/10.1089/mdr.2015.0330>>.

Borges LFF, Souza CN, Xavier ED, et al. Caracterização genotípica de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina isolados de tetos e leite

bovino. Caderno De Ciências Agrárias, n. 12, p. 1–7, 2020. <<https://doi.org/10.35699/2447-6218.2020.25185>>.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Mapa do leite: Políticas públicas e privadas para o leite. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/producao-animal/mapa-do-leite>. Acesso em: 05/05/2023.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Resultados do Plano de Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes PNCRC / Animal. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes>. Acesso em 23 de junho de 2023.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa SDA/MAA 42/1999 - Plano de Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes. 1999. Diário Oficial da União, 22 de dezembro de 1999.

Bush K. Past and Present Perspectives on β -Lactamases. Antimicrobial agents and chemotherapy, v. 62, n.10, 2018. e01076-18. <<https://doi.org/10.1128/AAC.01076-18>>.

Campos B, Pickering AC, Rocha LS, et al. Diversity and pathogenesis of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis: current understanding and future perspectives. BMC veterinary research, v. 18, n. 1, p. 115, 2022. <<https://doi.org/10.1186/s12917-022-03197-5>>.

Campos CC. Desempenho Reprodutivo de Vacas Leiteiras Lactantes Acometidas pela Mastite Clínica de Ocorrência Espontânea ou Induzida por LPS de *Escherichia coli*. 123 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017.

Caruso, M., Latorre, L., Santagada, G., Fracalvieri, R., Miccolupo, A., Sottili, R., Palazzo, L., Parisi, A., 2016. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)

in sheep and goat bulk tank milk from Southern Italy. *Small Ruminant Research*, 135, 26–31. <https://doi:10.1016/j.smallrumres.2015.12>

Chambers HF, Deleo FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol*, n. 7, v. 9, p. 629–641, 2009. <<https://doi:10.1038/nrmicro2200>>.

Chandrasekaran D, Venkatesan P, Tirumurugaan KG, et al. A study on methicillin resistant *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy cattle. *J. Appl. Nat. Sci*, n. 6, v. 2, p. 356-361, 2014a. <<https://doi.org/10.31018/jans.v6i2.427>>.

Cheng WN, Han SG. Bovine mastitis: risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments - A review. *Asian-Australas J Anim Sci*, n. 33, v. 11, p. 1699–1713, 2020. <<https://doi.org/10.5713/ajas.20.0156>>.

Chiew, C. J; Ho, H. J; Win, M. K; Tan, A; Lim, J. W; Ang, B; Chow, A. Persistence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage in re-admitted patients. *Journal of Hospital Infection*. 2018. <<http://doi:10.1016/j.jhin.2018.04.001>>.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2018.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI., 2017. document M100 – 27^a ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 282p.

Collignon, P. J., McEwen, S. A. 2019. One Health-Its Importance in Helping to Better Control Antimicrobial Resistance. *Tropical medicine and infectious disease*, 4(1), 22. <<https://doi.org/10.3390/tropicalmed4010022>>.

Cortimiglia C, Luini M, Marzagalli L, et al. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and of methicillin resistant *S. aureus* clonal complexes in bulk tank milk from dairy cattle herds in Lombardy Region (Northern Italy). *Epidemiol Infect*, n. 144, v. 14, p. 3046–3051, 2016. <<https://doi:10.1017/S0950268816001576>>.

Costa, E. O. Importância da Mastite na Produção Leiteira do País. Revista da Educação Continuada do CRMV-SP, São Paulo, v.1, p.3-7, 1998. Disponível em: http://www.cpatc.embrapa.br/publicacoes_2012/doc_170.pdf.

Cousin, M. E; Hardi-Landerer, M. C; Volk, V; Bodmer, M. Control of *Staphylococcus aureus* in dairy herds in a region with raw milk cheese production: farmers' attitudes, knowledge, behaviour and belief in self-efficacy. BMC Vet Res, 13;14(1):46, 2018. <<http://doi: 10.1186/s12917-018-1352-0>>. PMID: 29433483; PMCID: PMC5810121.

Crespo-Piazuelo, D., Lawlor, P. G., 2021. Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (LA-MRSA) prevalence in humans in close contact with animals and measures to reduce on-farm colonization. Ir Vet J, 74, 21. <<https://doi.org/10.1186/s13620-021-00200-7>>.

Cuevas MSS, Oliveira KCN, Costa LA, et al. Hipersensibilidade a fármacos: um estudo sobre reações alérgicas a β -lactâmicos. Revista Eletrônica Acervo Saúde, v. 15, n.11, 2022. ISSN: 2178-2091. <<https://doi.org/10.25248/reas.e11197.2022>>.

Cunha H P, Baiense ASR. Uso de Vancomicina no Tratamento de Infecções Causadas por *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina (MRSA). Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação, [S.L.], v. 9, n. 4, p. 9242-9258, 2023. <<http://dx.doi.org/10.51891/rease.v9i4.9642>>.

Dan M, Yehui W, Qingling M, et al. Antimicrobial resistance, virulence gene profiles and molecular typing of *Staphylococcus aureus* isolates from dairy cows in Xinjiang, Northwest of China. J Glob Antimicrob Resist. v. 16, p. 98–104, 2018. <<https://doi: 10.1016/j.jgar.2018.08.024>>.

Dias APM, Pinheiro MG, Alves FA. Características epidemiológicas e fatores de virulência em *Staphylococcus aureus*. Revta Acta Sci. Tech, n. 3, v. 1, p. 9-20, 2015. < <https://doi: https://doi.org/10.17648/uezo-ast-v3i1.77>>.

Dias, N. L., Silva, D. C. B., Oliveira, D. C. B. S., Fonseca, J. A., Sales, M. L., Silva, N., 2011. Detecção dos genes de *Staphylococcus aureus*, enterotoxinas e

de resistência à metilina em leite. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 63, 1547-1552. <<https://doi.org/10.1590/S0102-09352011000600036>>.

Dorneles EMS, Fonseca MDAM, Abreu JAP, Lage AP, Brito MAVP, Pereira CR, et al. Genetic diversity and antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* isolates from bovine mastitis in Minas Gerais, Brazil. Microbiology Open. 2019;8(5):00736. <<https://doi:10.1002/mbo3.736>>.

Drougka, E; Foka, A; Koutinas, C. K; Jelastopulu, E; Giormezis, N; Farmaki, O; Sarrou, S; Anastassiou, E. D; Petinaki, E; Spiliopoulou, I. Interspecies spread of *Staphylococcus aureus* clones among companion animals and human close contacts in a veterinary teaching hospital. A cross-sectional study in Greece. Prev Vet Med. 1;126: 190-8, 2016. <<http://doi:10.1016/j.prevetmed.2016.02.004>>. Epub 2016 Feb 23. PMID: 26948298.

Dweba, C. C., Zishiri, O. T., El Zowalaty, M. E., 2019. Isolation and Molecular Identification of Virulence, Antimicrobial and Heavy Metal Resistance Genes in Livestock-Associated /Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Pathogens 8, 79-100. <<https://doi.org/10.3390/pathogens8020079>>.

Fazoli, K. G. Z., Rey, L. M. R., Rúbio, K. A. J., Garcia Souza, M. A., Oliveira, H. M. D. S., Ribeiro, D. C., Pereira, K. R. J. D., Kawamo, D. M., Gomes, T. K. A., Silva, I. B. Santos, I. C., Ferreira, L. R. P., Rahal, I. L., Valle, J. S., Ruiz, S. P., Faria, M. G. I., Gazim, Z. C., Piau Junior, R., Gonçalves, D. D. 2023. Resistance profile of bovine mastitis isolates, presence of the *mecA* gene and identification of *ESBL* producing strains from small rural dairy properties. *Animals*, 13, 1147. <<https://doi.org/10.3390/ani13071147>>.

Ferrasso MM, Gonzalez HL, Timm CD. *Staphylococcus hyicus*. Arquivos Do Instituto Biológico, n. 82, v. 0, 2015. <<https://doi:10.1590/1808-1657000672013>>.

Ferreira RA, Velloso RV. *Staphylococcus Aureus* resistentes à metilina (MRSA): Uma revisão sobre os mecanismos de resistência e as principais técnicas utilizadas em sua identificação. Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento, v. 6, n. 01, p. 29-38, 2021. ISSN: 2448-0959.

Fonseca, M. E. B; Mourão, A. M; Chagas, J. D. R; Ávila, L. M; Marques, T. L. P; Baêta, B. A; Moraes, R. F. F; Roier, E. C. R. Mastite bovina: revisão. Pubvet, [S.L.], v. 15, n. 2, p. 1-18, 2021. <<http://dx.doi.org/10.31533/pubvet.v15n02a743.1-18>>.

Garoy EY, Gebreab YB, Achila OO, et al. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): Prevalence and Antimicrobial Sensitivity Pattern among Patients-A Multicenter Study in Asmara, Eritrea. Can J Infect Dis Med Microbiol, v. 6, 2019. PMID: 30881532; PMCID: PMC6381584. <[https://doi: 10.1155/2019/8321834](https://doi.org/10.1155/2019/8321834)>.

Gelatti, L. C; Bonamigo, R. R; Becker, A. P; D'azevedo, P. A. *Staphylococcus aureus* Resistentes à Meticilina: disseminação emergente na comunidade. An. Bras. Dermatol. [online], v.84, n.5, p.501-506. 2009. ISSN 1806-4841. <<https://doi.org/10.1590/S0365-05962009000500009>>.

Goudarzi M, Navidinia M, Dadashi M, et al. First report of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the *mecC* gene in human samples from Iran: prevalence and molecular characteristics. New microbes and new infections, n. 5, v. 39, 2020. <<https://doi.org/10.1016/j.nmni.2020.100832>>.

Guo, Y., Song, G., Sun, M., Wang, J., Wang, Y. 2020. Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in *Staphylococcus aureus*. Frontiers in cellular and infection microbiology, 10, 107. <<https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00107>>.

Hata E. Bovine mastitis outbreak in Japan caused by methicillin resistant *Staphylococcus aureus* New York/Japan clone. J Vet Diagn Invest, n. 28, v. 3 p. 291–298, 2016. <[https://doi: 10.1177/1040638716643126](https://doi.org/10.1177/1040638716643126)>.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. PPM 2019: após dois anos de queda, rebanho bovino cresce 0,4%. 2020. Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/29163-ppm-2019-apos-dois-anos-de-queda-rebanho-bovino-cresce-0-4>. Acesso em: 05 março. 2023.

Ikhimiukor OO, Odih EE, Godoy PD, et al. A bottom-up view of antimicrobial resistance transmission in developing countries. *Nat Microbiol*, n. 7, p. 757–765, 2022. <<https://doi.org/10.1038/s41564-022-01124-w>>.

Jamali H, Radmehr B, Ismail S. Short communication: Prevalence and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis. *J Dairy Sci*, n. 97, v. 4, p. 2226–2230, 2014. <<https://doi.org/10.3168/jds.2013-7509>>.

Jong A, Garch FE, Simjee S, et al. Monitoring of antimicrobial susceptibility of udder pathogens recovered from cases of clinical mastitis in dairy cows across Europe: VetPath results. *Vet Microbiol*, v. 213, p. 73–81, 2018. <<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.11.021>>.

Juhász-Kaszanyitzky, E; Jánosi, S; Somogyi, P; Dán, A; van der Graaf-van, B. L; van Duijkeren, E; Wagenaar, J. A. MRSA transmission between cows and humans. *Emerg. Infect. Dis*, 13:630–632, 2007. <<https://doi.org/10.3201/eid1304.060833>>.

Kapoor G, Saigal S, Elongavan A. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *J. Anaesthesiol, Cli. Pharmacol*, n. 33, v. 3, p. 300–305, 2017. <https://doi.org/10.4103/joacp.JOACP_349_15>.

Kaspar, U; von Lützu, A; Schlattmann, A; Roesler, U; Köck, R; Becker, K. Zoonotic multidrug-resistant microorganisms among small companion animals in Germany. *PloS one*, 13(12), 2018. <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208364>>.

Keyvan, E., Yurdakul, O., Demirtas, A., Yalcin, H., Bilgen, N. 2020. Identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in bulk tank milk. *Food Science and Technology*, [S.L.], v. 40, n. 1, p. 150-156. <<http://dx.doi.org/10.1590/fst.35818>>.

Khairullah AR, Sudjarwo SA, Effendi MH, et al. A review of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) on milk and milk products: Public health importance. *Sys Rev Pharm*, v. 11, n.8, p. 59-69, 2020. <<https://doi.org/10.31838/srp.2020.8.9>>.

Kobayashi, M., Seki, M., Tabata, H., Watanabe, Y., Yamashita, I. 2010. Fabrication of aligned magnetic nanoparticles using tobamoviruses. *Nano Lett.* 10;10(3):773-6. <<https://doi.org/10.1021/nl902405s>>. PMID: 20158260.

Krewer CC, Amanso ES, Gouveia GV, et al. Resistance to antimicrobials and biofilm formation in *Staphylococcus* spp. isolated from bovine mastitis in the Northeast of Brazil. *Trop Anim Health Prod*, n. 3, v. 47, p. 511–518, 2015. <<https://doi: 10.1007/s11250-014-0752-9>>.

Lakhundi, S. & Zhang, K. 2018. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. *Clin Microbiol Rev.* Sep 12;31(4): <<https://doi.org/10.1128/cmr.00020-18>>.

Lancette, G. A., Bennett, R.W. 2001. *Staphylococcus Aureus* and *Staphylococcal Enterotoxins*. In: Downes, F. P. & Ito, K., Eds., *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, 4 Edition, APHA, Washington DC, 387-403.

Langoni, H; Salina, A; Oliveira, G. C; Junqueira, N. B; Menozzi, B. D; Joaquim, S. F. Considerações sobre o tratamento das mastites. *PV B*, v. 37, n. 11, p. 1261-1269, 2017. <<https://doi:10.1590/S0100-736X2017001100011>>.

Larsen J, Raisen CL, Ba X, et al. Emergence of methicillin resistance predates the clinical use of antibiotics. *Nature*, v. 602, p. 135–141, 2022. <<http://doi.org/10.1038/s41586-021-04265-w>>.

Leclercq RMD, Derlot E, Duval J, et al. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *New Engl. J. Med*, n. 319, v. 3, p. 157-61, 2001. <<http://doi: 10.1056/NEJM198807213190307>>.

Lee, A. S; de Lencastre, H; Garau, J; Kluytmans, J; Malhotra-Kumar, S; Peschel A; Harbarth, S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Dis Primers*, 31;4:18033, 2018. <<https://doi: 10.1038/nrdp.2018.33>>. PMID: 29849094>.

Lee, J. H. 2003. Methicillin (oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 6489–6494. <<https://doi.org/10.1128/AEM.69.11.6489>>.

Li L, Zhou L, Wang L, et al. Characterization of methicillin-resistant and -susceptible staphylococcal isolates from bovine milk in northwestern China. *Plos One.* n. 10, v. 3, p. 1-8, 2015. <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0116699>>.

Lim SK, Nam HM, Jang GC, et al. Transmission and persistence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in milk, environment and workers in dairy cattle farms. *Foodborne Pathog. Dis.* n. 10, v. 8, p. 731-736, 2013. PMID:23746358. <<http://dx.doi.org/10.1089/fpd.2012.1436>>.

Locatelli C, Cremonesi P, Bertocchi L, et al. Short communication: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in bulk tank milk of dairy cows and effect of swine population density. *J Dairy Sci.* n. 99, v. 3, p. 2151–2156, 2016. <<https://doi:10.3168/jds.2015-9940>>.

Locatelli C, Cremonesi P, Caprioli A, et al. Occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dairy cattle herds, related swine farms, and humans in contact with herds. *J Dairy Sci.* n. 100, v. 1, p. 608–619, 2017. <<https://doi:10.3168/jds.2016-11797>>.

Lord J, Millis N, Jones RD, et al. Patterns of antimicrobial, multidrug and methicillin resistance among *Staphylococcus* spp. isolated from canine specimens submitted to a diagnostic laboratory in Tennessee, USA: a descriptive study. *BMC Vet Res.* n. 8, v. 18, p. 91, 2022. <<https://doi.org/10.1186/s12917-022-03185-9>>.

Luini M, Cremonesi P, Magro G, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is associated with low within-herd prevalence of intra-mammary infections in dairy cows: Genotyping of isolates. *Vet Microbiol.* n. 178, v. 3-4, p. 270–274, 2015. <<https://doi:10.1016/j.vetmic.2015.05.010>>.

Macedo VF, Zanardo JG, Lopes RPC, et al. Prevalência de coliformes e *Staphylococcus aureus* em mãos de manipuladores de alimentos de feira livre

de Vitória, ES. *Salus J Health Sci.* [periódico na internet]. n. 2, v. 2, p. 27-38, 2016.

Madhaiyan M, Wirth JS, Saravanan VS. Phylogenomic analyses of the Staphylococcaceae family suggest the reclassification of five species within the genus *Staphylococcus* as heterotypic synonyms, the promotion of five subspecies to novel species, the taxonomic reassignment of five *Staphylococcus* species to *Mammaliococcus* gen. nov., and the formal assignment of *Nosocomiicoccus* to the family Staphylococcaceae. *IJSEM*, n. 70, v. 11, p. 5926-5936, 2020. <[https://doi: 10.1099/ijsem.0.004498](https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004498). PMID: 33052802>.

Magro G, Rebolini M, Beretta D, et al. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* CC22-MRSA-IV as an agent of dairy cow intramammary infections. *Vet Microbiol*, n. 227, p. 29–33, 2018. <[https://doi: 10.1016/j.vetmic.2018.10.021](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.10.021)>.

Mangueira, E. V. C. Avaliação da presença e expressão de genes de virulência e *mecA* em isolados de *Staphylococcus spp* submetidos à oxacilina e tigeciclina. 2016. 153 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

Manyl-Loh, C. Antibiotic Use in Agriculture and Its Consequential Resistance in Environmental Sources: Potential Public Health Implications. *Molecules* (Basel, Switzerland), n. 23, v. 4, p. 795, 2018. <<https://doi.org/10.3390/molecules23040795>>.

Mekonnen SA, Lam TJGM, Hoekstra J, et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from milk samples of dairy cows in small holder farms of Northwestern Ethiopia. *BMC Vet Res*, n. 1, v. 14, p. 246, 2018. <[https://doi: 10.1186/s12917-018-1558-1](https://doi.org/10.1186/s12917-018-1558-1)>.

Melo, B. A; Silva, S. G. M; Santos, M. T; Santos, T. M. C; Fraga, A. B. Perfil da mastite subclínica e frequência de micro-organismos isolados de búfalas mestiças (*Bubalus bubalis*). *Research, Society and Development*, [s. l], v. 11, n. 4, p. 1-27, 2022. <<http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i4.27327>>.

Menezes, H. M; Milhomem, T. F; Silva, M. A. Mastite em vacas. Brazilian Journal of Health Review, [S.L.], v. 6, n. 2, p. 7029-7038, 6, 2023. <<http://dx.doi.org/10.34119/bjhrv6n2-205>>.

Monistero V, Barberio A, Biscarini F, et al. Different distribution of antimicrobial resistance genes and virulence profiles of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical mastitis in six countries. JDS, n. 4, v. 103, p. 3431-3446, 2020. <<https://doi:10.3168/jds.2019-17141>>.

Mourenza, Á., Gil, J. A., Mateos, L. M., Letek, M. 2021. Novel treatments and preventative strategies against food-poisoning caused by Staphylococcal species. Pathogens: 10(2), 91. <<https://doi.org/10.3390/pathogens10020091>>.

Obaidat MM, Salman AEB, Roess AA. High prevalence and antimicrobial resistance of *mecA Staphylococcus aureus* in dairy cattle, sheep, and goat bulk tank milk in Jordan. Trop Anim Health Prod, n. 50, v. 2, p. 405–412, 2018. <<https://doi: 10.1007/s11250-017-1449-7>>.

Oliveira CJB, Tiao N, Sousa FGC, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from Brazilian dairy farms and identification of novel sequence types. ZPH, n. 63, v. 2, p. 97– 105, 2016. <<https://doi: 10.1111/zph.12209>>.

Oliveira, D; Borges, A; Simões, M. *Staphylococcus aureus* Toxins and Their Molecular Activity in Infectious Diseases. Toxins (Basel), 19;10(6):252, 2018. <<https://doi: 10.3390/toxins10060252>>. PMID: 29921792; PMCID: PMC6024779.

Oliveira, M. R. M; Medeiros, M. Agentes Causadores de Mastite e Resistência Bacteriana. Revista Científica de Medicina Veterinária: FACIPLAC, Brasília/ Df, v. 2, n. 1, p. 45-60. 2015. <<https://doi.org/10.15210/ee.v22i1.7886>>.

Papadopoulos P, Papadopoulos T, Angelidis AS, et al. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and of methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) along the production chain of dairy products in north-western Greece. Food Microbiol, n. 69, v. 50, p. 43–50, 2018. <<https://doi: 10.1016/j.fm.2017.07.016>>.

Parisi A, Caruso M, Normanno G, et al. Prevalence, antimicrobial susceptibility and molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in bulk tank milk from southern Italy. Food Microbiol, n. 58, p. 36–42, 2016. <<https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.03.004>>.

Parlet CP, Brown MM, Horswill AR, et al. Commensal Staphylococci Influence *Staphylococcus aureus* Skin Colonization and Disease. TIM, n. 27, v. 6, p. 497–507, 2019. <<https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.01.008>>.

Paterson, G. K; Harrison, E. M; Holmes, M. A. The emergence of *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Trends in microbiology, 22(1), 42–47, 2014. <<https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.11.003>>.

Pekana, A., & Green, E., 2018. Antimicrobial Resistance Profiles of *Staphylococcus aureus* Isolated from Meat Carcasses and Bovine Milk in Abattoirs and Dairy Farms of the Eastern Cape, South Africa. International Journal of Environmental Research and Public Health, v. 15, n. 10, p. 2223. <<https://doi.org/10.3390/ijerph15102223>>.

Pereira, M. N; Scussel, V, M. Resíduos de antimicrobianos em leite bovino: fonte de contaminação, impactos e controle. Revista de Ciências Agroveterinárias, [S.L.], v. 16, n. 2, p. 170-182, 2017. Universidade do Estado de Santa Catarina. <<http://dx.doi.org/10.5965/223811711622017170>>.

Pexara, A.; Solomakos, N.; Govaris, A. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in milk and dairy products. Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society, [S.I.], v. 64, n. 1, p. 1734, 2017. ISSN 2585-3724. <<http://doi.org/10.12681/jhvms.15449>>.

Pokharel, S., Shrestha, P., Adhikari, B. 2020. Antimicrobial use in food animals and human health: time to implement ‘One Health’ approach. Antimicrob Resist Infect Control: 9, 181. <<https://doi.org/10.1186/s13756-020-00847-x>>.

Pollitt, E. J. G., Szkuta, P. T., Burns, N., Foster, S. J. 2018. *Staphylococcus aureus* infection dynamics. PLoS Pathog: 14(6): <<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007112>>.

Products. *Foodborne Pathogens and Disease*, 13(3), 156–162. <https://doi:10.1089/fpd.2015.2038>.

Qu Y, Zhao H, Nobrega DBQU, et al. Molecular epidemiology and distribution of antimicrobial resistance genes of *Staphylococcus* species isolated from Chinese dairy cows with clinical mastitis. *J Dairy Sci*, n. 102, v. 2, p. 1571–1583, 2018. <<https://doi:10.3168/jds.2018-15136>>.

Riva A, Borghi E, Cirasola D, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in raw milk: Prevalence, SCCmec typing, enterotoxin characterization, and antimicrobial resistance patterns. *J Food Prot*, n. 78, v.6, p. 1142–1146, 2015. <<https://doi:10.4315/0362-028X.JFP-14-531>>.

Rocha SFM, Santos LVP. *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina (MRSA) em Laboratório Vinculado à Rede Hospitalar em Maceió, Alagoas. SEMPESq - Semana De Pesquisa Da Unit - Alagoas, 2020. Recuperado de https://eventos.set.edu.br/al_sempesq/article/view/13776.

Rodrigues MX, Silva NCC, Trevilin JH, et al. Antibiotic resistance and molecular characterization of *Staphylococcus* species from mastitic milk. *Afr. J. Microbiol. Res*, n. 11, v. 3, p. 84-91, 2017. <<https://doi.org/10.5897/AJMR2016.8347>>.

Rola JG, Korpysa-Dzirba W, Czubkowska A, et al. Prevalence of enterotoxin genes and antimicrobial resistance of coagulase-positive *staphylococci* recovered from raw cow milk. *J Dairy Sci*, n. 7, v. 98, p. 4273–4278, 2015. <<https://doi.org/10.3168/jds.2014-9064>>.

Ronco T, Klaas IC, Stegger M, et al. Genomic investigation of *Staphylococcus aureus* isolates from bulk tank milk and dairy cows with clinical mastitis. *Vet Microbiol*, v. 215, p. 35–42, 2018. <<https://doi:10.1016/j.vetmic.2018.01.003>>.

Rossi BF, Bonsaglia ECR, Castilho IG, Dantas STA, Salina A, Langoni H, et al. Genotyping of long term persistent *Staphylococcus aureus* in bovine subclinical

mastitis. *Microb Pathog.* 2019; 132:45-50. <[https://doi:10.1016/j.micpath.2019.04.031](https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.04.031)>.

Ruegg PLA. 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. *J Dairy Sci*, n. 100, v. 12, p. 10381–10397, 2015. <<https://doi.org/10.3168/jds.2017-13023>>.

Sá JPN, Figueiredo CHA, Neto OLS, et al. Os principais microorganismos causadores da mastite bovina e suas consequências na cadeia produtiva de leite. *RBGA*, n. 1, v. 12, p. 01-13, 2018. <[https://doi:10.18378/rbga.v12i1.5785](https://doi.org/10.18378/rbga.v12i1.5785)>.

Sales, DC. Estudo da infecção intramamária e dos métodos de triagem para detecção de mastite subclínica em búfalas. Tese (Doutorado em Zootecnia). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Jaboticabal, p. 89, 2019.

Sambrook, J., Fritsch, E. R., & Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed.). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Santos AS, Mendonça TO, Muniz IM. Prevalência de mastite bovina em rebanhos leiteiros no Município de Rolim de Moura e adjacências, Rondônia. *Pubvet*, [S.L.], v. 14, n. 6, p. 1-6, 2020. <<http://dx.doi.org/10.31533/pubvet.v14n6a595.1-6>>.

Santos AS. Beta-lactâmicos em *Staphylococcus* spp. isolados de mastite em ruminantes. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Pernambuco. Recife, p. 106, 2018.

Santos MV, Fonseca LFL. *Controle da Mastite e Qualidade do Leite: Desafios e Soluções*. Pirassununga: Edição dos Autores, 2019. ISBN: 9788591591312.

Shoaib M, Aqib AI, Naseer MA, et al. Etiology of Bovine Mastitis. In: Dego, O. K., editor. *Mastitis in Dairy Cattle, Sheep and Goats* [Internet]. London: IntechOpen, p. 150, 2021. <[https://doi: 10.5772/intechopen.98543](https://doi.org/10.5772/intechopen.98543)>.

Shrivastava N, Sharma V, Shrivastav A, et al. Prevalence and characterization of Panton-Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus* in bovine milk in

Jabalpur district of Madhya Pradesh, India. *Vet World*, n. 11, v. 3, p. 316–320, 2018. <<https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.316-320>>.

Silva JG, Alcântara AM, Mota RA. Mastite bovina causada por *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina: revisão de literatura. *Pesq. Vet. Bras.*, n. 38, v. 2, p. 223–228, 2018. <<https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-4996>>.

Silva SGM, Melo BA, Santos MT, et al. Resistência de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* à antibióticos. *Res. Soc. Dev.*, [S.L.], v. 11, n. 2, p. 1-7, 29, 2022. <<http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i2.25693>>.

Silva, J. G; Alcântara, A; Mota, R. A. Mastite bovina causada por *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina: revisão de literatura. *PVB*, 38(2), 223–228. 2018. <<http://doi:10.1590/1678-5150-pvb-4996>>.

Silva, J. G; Araujo, W. J; Leite, E. L; Dias, L. M; Vasconcelos, P. C; Silva, N. M. V; Oliveira, R. P; Sena, M. J; Oliveira, C. J. B; Mota, R. A. First report of a livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST126 harbouring the *mecC* variant in Brazil. *Transbound Emerg Dis*, 68(3):1019-1025, 2021. <<http://doi: 10.1111/tbed.13771>>.

Siqueira AK, Salerno T, Lara GHB, et al. Enterotoxin genes, multidrug resistance, and molecular typing of *Staphylococcus* spp. isolated from organic bovine milk. *B.J.V.R.A.S.*, n. 1, v.54, p. 81-87, 2017. <<http://dx.doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2017.109171>>.

Song JW, Yang SJ, Shin S, et al. Genotypic and phenotypic characterization of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitic milk in Korea. *J Food Prot*, n.79, v. 10, p. 1725–1732, 2016. <<https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-16-067>>.

Souza GAAD, Carvalho CMC, Xavier ED, et al. *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina e meropenem em leite de vacas com mastite subclínica/methicillin and meropenem resistant *Staphylococcus aureus* in milk of cows with subclinical mastitis. *B.J.D.V.*, [S.L.], n. 6, v. 12, p. 98067-98081, 2020. <<http://dx.doi.org/10.34117/bjdv6n12-340>>.

Tenhagen BA, Alt K, Pfefferkorn B, et al. Short communication: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in conventional and organic dairy herds in Germany. J Dairy Sci, n. 101, v. 4, p. 3380–3386, 2018. <<https://doi.org/10.3168/jds.2017-12939>>.

Torres-Caycedo MI, Castro-Gutiérrez LT, Prada-Quiroga CF, et al. Antibiotic Resistance: Origins, evolution and healthcare-associated infections. S.U., n. 34, v. 2, p. 494-505, 2018. <<https://doi.org/10.14482/sun.34.2.615.32>>.

Van Der Zee, A., Verbakel, H., Van Zon, J. C., Frenay, I., Van Belkum, A., Buiting, A., Bergmans, A. 1999. Molecular genotyping of *Staphylococcus aureus* strains: comparison of repetitive element sequence-based PCR with various typing methods and isolation of a novel epidemicity marker. Journal of Clinical Microbiology, v. 37, n. 2, p. 342-349, 1999. <<https://doi:10.1128/JCM.37.2.342-349.1999>>.

Vesterholm-Nielsen, M., Larsen, M. O., Olsen, J. E., Aarestrup F. M. 1999. Occurrence of the *blaZ* gene in penicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Denmark. Acta Vet. Scand. 40, 279-86. <<https://doi:10.1186/BF03547026>>.

Vishnupriya S, Antony PX, Mukhopadhyay HK, et al. Methicillin resistant *staphylococci* associated with bovine mastitis and their zoonotic importance. Vet. World, n. 7, v. 6, p. 422-427, 2014. <<http://dx.doi.org/10.14202/vetworld.2014.422-427>>.

Woodford, J. A., Jorgensen, N. A., Barrington, G. P. 1986. Impact of dietary fiber and physical form on performance of lactating dairy cows. J. Dairy Sci: 69(4):1035-47. <[https://doi:10.3168/jds.S0022-0302\(86\)80499-4](https://doi:10.3168/jds.S0022-0302(86)80499-4)>.

Wulf MW, Sorum M, van Nes A, et al. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among veterinarians: an international study. Clin. Microbiol. Infect, n. 14, v. 1, p. 29-34, 2008. PMID:17986212. <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01873.x>>.

Xu Z, Shah HN, Misra R, et al. The prevalence, antibiotic resistance and *mecA* characterization of coagulase negative staphylococci recovered from non-healthcare settings in London, UK. *Antimicrob. Resist. Infect. Control*, n. 13, v. 7, p. 73, 2018. <<https://doi.org/10.1186/s13756-018-0367-4>>.

Yilmaz Eker F. Determination of growth and toxin production potential of *Staphylococcus aureus* and *Clostridium perfringens* during doner production process. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* n. 1, v. 43, p. 10-22, 2019. <<https://doi.org/10.3906/vet-1808-5>>.

Zanella JRC. Zoonoses emergentes e reemergentes e sua importância para saúde e produção animal. *Pesq. Agrop. Bras*, n. 51, v. 5, p. 510–519, 2016. <<https://doi.org/10.1590/S0100-204X2016000500011>>.

Zhang, F., Cheng, W. 2022. The Mechanism of Bacterial Resistance and Potential Bacteriostatic Strategies. *Antibiotics*. 11(9):1215. <<https://doi.org/10.3390/antibiotics11091215>>.

Zigo F, Vasil M, Ondrasovicová S, et al. Maintaining Optimal Mammary Gland Health and Prevention of Mastitis. *Front. Vet. Sci.*, n. 8, p. 607311, 2021 <<https://doi.org/10.3389/fvets.2021.607311>>.

APÊNDICE 1: CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo número 034/2017, referente ao projeto "PERFIL DA PRODUÇÃO FAMILIAR E CONTAMINAÇÃO BACTERIANA DO LEITE NO MUNICÍPIO DE SÃO JOSÉ DOS PINHAIS, PARANÁ", sob a responsabilidade de Julia Arantes Galvão – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro, de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DO SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - BRASIL, com grau I de invasividade, em reunião de 05/05/2017.

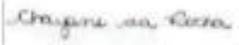
Vigência do projeto	Agosto 2017 até Março 2019
Especie/Linhagem	Bov sp. (bovina) / Raças leiteiras mestiças
Número de animais	760
Peso/Idade	650 kg / Variada
Sexo	Fêmeas
Origem	Propriedades rurais em São José dos Pinhais, Paraná

CERTIFICATE

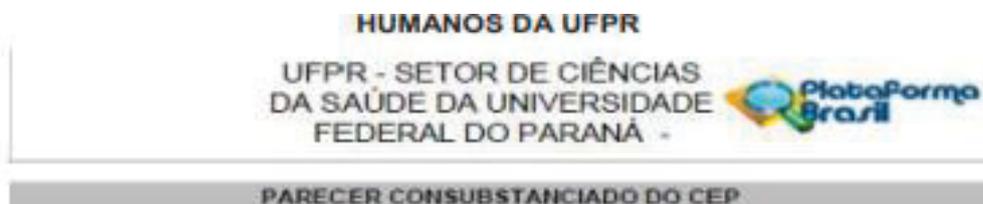
We certify that the protocol number 034/2017, regarding the project "FAMILIAR MILK FARMING PROFILE AND BACTERIAL CONTAMINANTS IN MILK FROM SÃO JOSÉ DOS PINHAIS, PARANÁ, BRAZIL," under Julia Arantes Galvão supervision – which includes the production, maintenance and/or utilization of animals from Chordata phylum, Vertebrata subphylum (except Humans), for scientific or teaching purposes – is in accordance with the precepts of Law nº 11.794, of 8 October, 2008, of Decree nº 6.899, of 15 July, 2009, and with the edited rules from Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), and it was approved by the ANIMAL USE ETHICS COMMITTEE OF THE AGRICULTURAL SCIENCES CAMPUS OF THE UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ (Federal University of the State of Paraná, Brazil), with degree I of invasiveness, in session of 05/05/2017.

Duration of the project	August 2017 until March 2019
Specie Line	Bov sp. (bovine) / Crossbred dairy cattle
Number of animals	760
Weight/Age	650 kg / Variable
Sex	Female
Origin	Rural properties in São José dos Pinhais, Paraná

Curitiba, 5 de maio de 2017.


Chayane da Rocha
Coordenadora CEUA-SCA

APÊNDICE 2: CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ



DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Perfil da Produção de leite em busca da melhoria da qualidade
Pesquisador: JULIA ARANTES GALVAO
Área Temática:
Versão: 4
CAAE: 65247417.2.0000.0102
Instituição Proponente: Departamento de Medicina Veterinária
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.327.636

Apresentação do Projeto:

Projeto de pesquisa proveniente do Departamento de Medicina Veterinária sob a responsabilidade da Profa. Dra. Julia Arantes Galvão que será executado com a colaboração das pós-graduanda Luany Yone Miyoshi e das graduandas Ana Luiza de Souza Reis e Letícia Moreira dos Santos. A pesquisa será desenvolvida em São José dos Pinhais com produtores de leite cadastrados na Secretaria de Agricultura do referido município.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Demonstrar como o perfil da produção familiar baseado nas boas práticas de ordenha influenciam na qualidade microbiológica do leite de propriedades leiteiras no município de São José dos Pinhais, Paraná.

Objetivo Secundário:

- Realizar análises microbiológicas de amostras do leite, equipamentos, utensílios, água, superfície dos tetos

Continuação do Protocolo 2.027.006

dos animais e mãos dos ordenhadores.

- Relacionar os melhores resultados dos ordenhadores que afirmam realizar mais adequadamente as boas práticas de ordenha, bem como oferecer treinamento e avaliação de resultados."

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

De acordo com a autora principal, "o produtor será beneficiado por ter um leite de melhor qualidade. Esse leite será melhor aproveitado na indústria e o consumidor se sentirá mais seguro em consumir esse alimento.

A pesquisa apresenta o risco da quebra de confidencialidade referente às práticas executadas no processo de ordenha, no sentido de ter as práticas divulgadas, bem como o desconforto que pode ser resultado da aplicação dos questionários, e também da aplicação de swabs para verificação da contaminação das mãos, no entanto busca-se minimizar esses problemas com o oferecimento do Termo de consentimento livre e esclarecido, bem como a possibilidade de os participantes desistirem de participar da pesquisa caso não se sintam confortáveis.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

"Serão estudadas 42 propriedades leiteiras do município de São José dos Pinhais, PR, cadastradas na Secretaria da Agricultura do município e que fornecem leite para uma indústria sob sistema de inspeção estadual (Serviço de Inspeção do Paraná – SIP)." "Os produtores serão entrevistados e aplicadas listas de verificação, considerando itens referentes ao seu perfil socioeconômico, estrutura disponível para ordenha e armazenamento do leite, práticas de manejo animal, cuidados sanitários e a forma de obtenção do leite."

"Para o levantamento do perfil da produção de leite nas propriedades estudadas serão avaliadas as entrevistas aplicadas por meio de listas de verificação compostas por informações qualitativas e quantitativas. As respostas das entrevistas serão anotadas e não gravadas, portanto não necessitam de destruição da gravação. Após a avaliação e interpretação dos dados serão realizadas coletas de amostras

UFPR - SETOR DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO PARANÁ -



Continuação do Parecer: 2.827.696

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:
o uso em pesquisas futuras deve ser mediante novo TCLE. Informar

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências foram atendidas entretanto é importante que fique caracterizado no TCLE que o uso futuro do material armazenado (pegas) será possível mediante submissão de novo projeto de pesquisa ao comitê de ética e autorização do produtor por meio de TCLE.

- É obrigatório retirar na secretaria do CEP/SD uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido com carimbo onde constará data de aprovação por este CEP/SD, sendo este modelo reproduzido para aplicar junto ao participante da pesquisa.

O TCLE deverá conter duas vias, uma ficará com o pesquisador e uma cópia ficará com o participante da pesquisa (Carta Circular nº. 003/2011-CONEP/CNS).

Favor agendar a retirada do TCLE pelo telefone 41-3360-7259 ou por e-mail cometica.saude@ufpr.br, necessário informar o CAAE.

Considerações Finais a critério do CEP:

Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais e final, sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos, através da Plataforma Brasil - no modo: NOTIFICAÇÃO. Demais alterações e prorrogação de prazo devem ser enviadas no modo EMENDA. Lembrando que o cronograma de execução da pesquisa deve ser atualizado no sistema Plataforma Brasil antes de enviar solicitação de prorrogação de prazo.

Emenda - ver modelo de carta em nossa página: www.cometica.ufpr.br (obrigatório envio)

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	FB_INFORMACOES_BASICAS_DO_P# PROJETO_918937.pdf	20/09/2017 11:41:59		Aceito
Outros	respostas_pendencia_3.docx	20/09/2017 11:40:46	JULIA ARANTES GALVAO	Aceito
Declaração de	Declaracao_de_uso_especifico_do_m	20/09/2017	JULIA ARANTES	Aceito

Endereço: Rua Padre Canário, 225 - Terra
Bairro: Alto da Glória
UF: PR Município: CURITIBA

CEP: 80.060-240

Telefone: (41)3360-7259

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

UFPR - SETOR DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO PARANÁ -



Continuação do Parecer: 2.027.000

Manuseio Material Biológico / Biorrepositório / Biorrepositório	aterral_eou_dados_coletados_corrigido_2.pdf	11:40:25	GALVAO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_consentimento_livre_e_esola_recebo_TCLE_corrigido_3.docx	20/09/2017 11:40:12	JULIA ARANTES GALVAO	Aceito
Brochura Pesquisa	projeto_detalhado_corrigido_3.docx	20/09/2017 11:39:52	JULIA ARANTES GALVAO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_consentimento_livre_e_esola_recebo_TCLE_corrigido_2.docx	18/08/2017 10:28:42	JULIA ARANTES GALVAO	Aceito
Outros	respostas_pendencia_2.docx	18/08/2017 10:28:27	JULIA ARANTES GALVAO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_detalhado_corrigido_2.docx	18/08/2017 10:27:54	JULIA ARANTES GALVAO	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorrepositório / Biorrepositório	Declaraçao_de_uso_especifico_do_mat_erial_eou_dados_coletados_corrigido.pdf	18/08/2017 10:27:37	JULIA ARANTES GALVAO	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto.pdf	11/05/2017 15:25:09	JULIA ARANTES GALVAO	Aceito
Outros	checklist.pdf	10/05/2017 15:03:33	JULIA ARANTES GALVAO	Aceito
Outros	Termo_de_responsabilidades_no_projeto.pdf	10/05/2017 15:03:16	JULIA ARANTES GALVAO	Aceito
Outros	Termo_de_compromisso_para_o_inicio_da_pesquisa.pdf	10/05/2017 15:02:56	JULIA ARANTES GALVAO	Aceito
Outros	Declaração_de_tornar_publicos_os_resultados.pdf	10/05/2017 15:02:20	JULIA ARANTES GALVAO	Aceito
Outros	Termo_de_confidencialidade.pdf	10/05/2017 14:58:12	JULIA ARANTES GALVAO	Aceito
Outros	Análise_de_merito_comprovante_de_qualificação_da_agencia_de_fomento.pdf	10/05/2017 14:57:58	JULIA ARANTES GALVAO	Aceito
Outros	Ata_de_aprovação_do_projeto.pdf	10/05/2017 14:57:37	JULIA ARANTES GALVAO	Aceito
Outros	Ofício_do_pesquisador_encaminhando_o_projeto_ao_CEPISD.pdf	10/05/2017 14:57:20	JULIA ARANTES GALVAO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Endereço: Rua Padre Camargo, 280 - Forno
Bairro: Alto da Glória
UF: PR Município: CURITIBA

CEP: 80.060-040

E-mail: comite.saude@ufpr.br

UFPR - SETOR DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO PARANÁ -



Continuação do Parecer: 2.027.000

Não

CURITIBA, 11 de Outubro de 2017

Assinado por:
IDA CRISTINA GUBERT
(Coordenador)

