

Geziella Aurea Aparecida Damasceno Souza

**Caracterização e Epidemiologia Molecular de *Staphylococcus aureus* Resistentes aos
Beta-lactâmicos Isolados de Leite de Vacas com Mastite Subclínica**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Produção Animal, no Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Produção Animal.

Área de concentração: Qualidade de Alimentos de Origem Animal

Orientadora: Profa. Dra. Anna Christina de Almeida

Co-orientadora: Profa. Dra. Alessandra Rejane Ericsson de Oliveira Xavier

Co-orientador: Prof. Dr. Mauro Aparecido de Sousa Xavier

Montes Claros

2020

Geziella Aurea Aparecida Damasceno Souza

Caracterização e epidemiologia molecular de *Staphylococcus aureus* resistentes aos beta-lactâmicos isolados de leite de vacas com mastite subclínica

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Produção Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Produção Animal.

Área de concentração: Qualidade de Alimentos de Origem Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Anna Christina de Almeida

Instituto de Ciências Agrárias da UFMG

Aprovada pela banca constituída por:

Profa. Dra. Viviane Aguiar Andrade

Unimontes

Profa. Dra. Eliane Macedo Sobrinho Santos

IFNMG

Dra. Carolina Magalhães Caries Carvalho

ICA / UFMG

Profa. Dra. Alessandra Rejane Ericsson de Oliveira Xavier

Unimontes

Profa. Dra. Anna Christina de Almeida (Orientadora)

ICA / UFMG

Montes Claros, 28 de janeiro de 2020.

S719c
2020

Souza, Geziella Aurea Aparecida Damasceno.

Caracterização e epidemiologia molecular de *Staphylococcus aureus* resistentes aos Beta-lactâmicos isolados de leite de vacas com mastite subclínica / Geziella Aurea Aparecida Damasceno Souza. Montes Claros, 2020.

39 f.: il.

Dissertação (Produção Animal) – Área de concentração em Qualidade de Alimentos de Origem Animal, Universidade Federal de Minas Gerais / Instituto de Ciências Agrárias.

Orientador(a): Profa. Dra. Anna Christina de Almeida.

Banca examinadora: Profa. Dra. Viviane Aguiar Andrade, Profa. Dra. Eliane Macedo Sobrinho Santos, Dra. Carolina Magalhães Caries Carvalho, Profa. Dra. Alessandra Rejane Ericsson de Oliveira Xavier, Profa. Dra. Anna Christina de Almeida.

Inclui referências.

1. Produção animal. 2. Alimentos -- Qualidade. 3. Microbiologia sanitária. 4. Mastite. I. Almeida, Anna Christina de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Agrárias. III. Título.

CDU: 637.1



Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Agrárias
Colegiado de Pós-Graduação em Produção Animal

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Aos 28 dias do mês de janeiro de 2020 às 8:00 horas, sob a Presidência da Professora Anna Christina de Almeida, D. Sc. (Orientadora/ICA-UFMG) e com a participação das Professoras Alessandra Rejane Ericsson de Oliveira Xavier, D. Sc. (Co-orientadora/Unimontes), Eliane Macedo Sobrinho Santos, D. Sc. (IFNMG), Viviane Aguiar Andrade, D. Sc. (Unimontes) e a Doutora Carolina Magalhães Caires Carvalho, D. Sc. (ICA-UFMG), reuniu-se a Banca de defesa de dissertação de **GEZIELLA AUREA APARECIDA DAMASCENO SOUZA**, aluna do Curso do Mestrado em Produção Animal. O resultado da defesa de dissertação intitulada "Caracterização e Epidemiologia Molecular de Staphylococcus aureus Resistentes aos Beta-lactâmicos Isolados de Leite de Vacas com Mastite Subclínica",

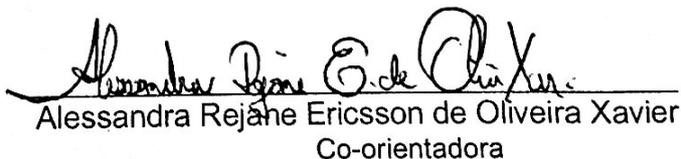
foi expresso pelo conceito "A" (nota 100,0), sendo a aluna considerada (aprovada/reprovada) Aprovada. E, para constar, eu, Professora Anna Christina de Almeida, Presidente da Banca, lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada por mim e pelos demais membros da Banca examinadora.

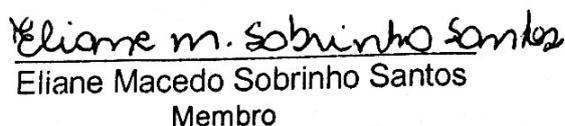
OBS.: A aluna somente receberá o título após cumprir as exigências do ARTIGO 64 do regulamento do Curso do Mestrado em Produção Animal, conforme apresentado a seguir:

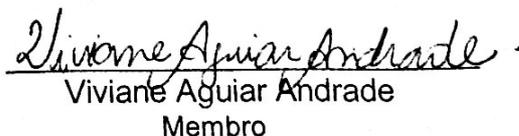
Art. 64 – Para dar andamento ao processo de efetivação do grau obtido, o candidato deverá, após a aprovação de sua Dissertação e da realização das modificações propostas pela banca examinadora, se houver, encaminhar à secretaria do colegiado do Curso, com a anuência do orientador, no mínimo 3 (três) exemplares impressos e 1 (um) exemplar eletrônico da dissertação, no prazo de 60 (sessenta) dias.

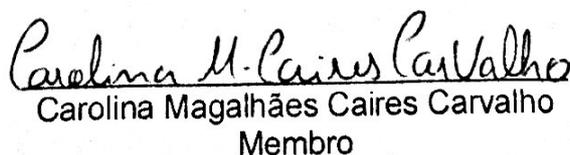
Montes Claros, 28 de janeiro de 2020.


Anna Christina de Almeida
Orientadora


Alessandra Rejane Ericsson de Oliveira Xavier
Co-orientadora


Eliane Macedo Sobrinho Santos
Membro


Viviane Aguiar Andrade
Membro


Carolina Magalhães Caires Carvalho
Membro

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais José Pereira de Souza e Maria das Graças Souza. Aos demais familiares e amigos pela compreensão da minha ausência durante os momentos de estudo.

Ao meu tio Clemente, à minha prima Graça e à dona Rosa por todas as contribuições materiais, espirituais e emocionais, sem as quais eu não conseguiria vencer essa etapa.

À minha orientadora Dra. Anna Christina de Almeida que me acompanhou sempre na hora do aperto, até mesmo nas bancadas de laboratório. Aos meus co-orientadores Dra. Alessandra Rejane Ericsson de Oliveira Xavier e Dr. Mauro Aparecido de Sousa Xavier que tiveram imenso empenho na minha pesquisa e não mediram esforços para tornar possível nossas publicações científicas.

Ao professor Dr. Demerson Arruda Sanglard pela colaboração. A Flávia Echila pela solicitude. À Cíntya Neves de Souza e à Dra. Carolina Magalhães Caires Carvalho que se esforçaram muito em cada etapa das análises. Aos discentes que mais contribuíram para a execução do meu projeto: Ester Dias Xavier, Laura Francielle Ferreira Borges e Samuel Ferreira Gonçalves.

Ao apoio do Centro de Pesquisa em Ciências Agrárias (CPCA), Laboratórios de Biotecnologia e de Sanidade Animal e Pro-Reitoria de Pesquisa e Extensão da Universidade Federal de Minas Gerais (PRPQ-UFMG). Ao suporte da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Nestlé S. A. – Projeto Mais Leite Saudável/Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento.

Aos funcionários da UFMG pela recepção harmoniosa e a todas as pessoas que, presentes ou à distância; direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho.

Muito obrigada!

“O que sabemos é uma gota; o que ignoramos é um oceano”.

(Isaac Newton)

RESUMO

Mastite é um problema tanto econômico quanto sanitário em rebanhos leiteiros. O patógeno mais frequente é a bactéria *Staphylococcus aureus* que também pode contaminar leite e laticínios causando intoxicações alimentares nos consumidores. Dentre os antibióticos mais utilizados, está a classe dos β -lactâmicos, sendo a meticilina um dos mais eficazes. Os carbapenêmicos, por sua vez, não são aconselhados para animais de produção. Nesse sentido, constitui objetivo deste estudo o rastreamento dos genes *bla_Z*, *mecA* e sua variante *mec_{ALGA251}* que estão associados com resistência a penicilinas e também os genes *bla_{KPC}* e *bla_{OXA23}* que codificam resistência a carbapenêmicos. Essa pesquisa foi realizada com amostras de leite bovino, oriundas de tetos com mastite subclínica de 15 fazendas no norte de Minas Gerais. Foi realizado isolamento e cultivo dos micro-organismos provenientes do leite mastítico, identificação por coloração de Gram e espectrometria de massa MALDI-TOF. A seguir, foi procedido nos isolados de *Staphylococcus aureus* o antibiograma por difusão em disco, utilizando os antimicrobianos amoxicilina, oxacilina, ampicilina/sulbactam, cefoxitina, imipenem e meropenem. Foi, então, extraído DNA dos isolados que apresentaram resistência e pesquisado por meio de Single PCR a presença dos genes *bla_Z*, *mecA*, *mec_{ALGA251}*, *bla_{KPC}* e *bla_{OXA23}*, sendo posteriormente realizado o sequenciamento de um dos produtos de cada gene amplificado. Foi também procedido o teste de RAPD-PCR para verificar variabilidade genética entre os isolados e elaborado um dendrograma. Como resultado, foram encontrados 214 micro-organismos, dentre eles 79 *Staphylococcus aureus*. Destes, 30 apresentaram resistência a pelo menos uma das penicilinas testadas e 9 deles apresentaram resistência também ao meropenem. Houve associação significativa ($p < 0.05$ pelo teste qui-quadrado) entre resistência aos antimicrobianos e fazenda de origem. Dos 30 isolados resistentes a penicilina, 6 apresentaram o gene *bla_Z*, 4 apresentaram o gene *mecA* e nenhum apresentou o gene *mec_{ALGA251}*. Nenhum dos isolados testados apresentou gene *bla_{KPC}* ou *bla_{OXA23}*. A análise do RAPD e dendrograma indicou proximidade genética entre os isolados que também correspondeu a proximidade entre fazendas. Também foram detectados dois clones bacterianos entre os patógenos deste estudo, indicando que houve carreamento. Conclui-se que existem os genes de resistência *bla_Z* e *mecA* em *Staphylococcus aureus* isolados em fazendas do norte de Minas Gerais, assim como existe resistência às penicilinas que não se associam a esses genes nem ao seu homólogo *mec_{ALGA-251}*. Conclui-se, também, que há resistência ao carbapenêmico meropenem em isolados de *Staphylococcus aureus* sendo essa resistência não associada aos genes *bla_{KPC}* nem *bla_{OXA23}*.

Palavras-chave: *Bla_Z*. *MecA*. MRSA. Produção Animal.

ABSTRACT

Mastitis is a problem both economically and healthily in dairy herds. The most commonly associated pathogen is *Staphylococcus aureus* bacteria that can also contaminate milk and dairy products causing food poisoning in consumers. Prevention consists of adequate hygiene during milk collection and treatment of sick animals to prevent spread of the disease. This treatment is based on research for the disease-causing agent and the most efficient antibiotic. Among the most effective antibiotics is the β -lactam class, particularly methicillin, which is a penicillin indicated against already resistant penicillin-producing bacteria. Carbapenems, however, are potent β -lactams with broad spectrum of action and are not allowed in dairy animals. Constant and/or abusive use of these drugs may select micro-organisms that have acquired resistance by bacterial mutation, transformation, transduction or conjugation. In this sense, the objective of this study is the screening of *bla_Z*, *mecA* genes and their variant *mec_{ALGA251}* that are associated with penicillin resistance, and also the *bla_{KPC}* and *bla_{OXA23}* genes that encode carbapenemic resistance. This research was carried out with samples of bovine milk from teat affected by subclinical mastitis from 15 farms in northern Minas Gerais. Isolation and cultivation of micro-organisms from breast milk were performed, so identification by differential tests and confirmation by MALDI-TOF mass spectrometry. *Staphylococcus aureus* isolates were then submitted to disc diffusion antibiogram using the antimicrobials amoxicillin, oxacillin, ampicillin/sulbactam, ceftiofur, imipenem and meropenem. Then, DNA was extracted from the resistant bacterial isolates and the *bla_Z*, *mecA*, *mec_{ALGA251}*, *bla_{KPC}* and *bla_{OXA23}* genes were screened by Single PCR, being sequenced the product of one of the bands of each amplified gene. The RAPD-PCR test was also performed to verify genetic variability among isolates. As a result, 214 microorganisms were found, among them 79 *Staphylococcus aureus*. Of these, 30 showed resistance to, at least, one of the penicillins tested and 9 showed resistance to meropenem. There was a significant association ($p < 0.05$ by the chi-square test) between antimicrobial resistance and origin farm of isolates. Of the 30 penicillin-resistant isolates, 6 carried *bla_Z* gene, 4 carried *mecA* gene, and no one carried *mec_{ALGA251}* gene. No one of the isolates tested carried *bla_{KPC}* or *bla_{OXA23}* gene. A dendrogram was elaborated indicating the genetic proximity between the isolates that, notably, corresponds to the proximity between farms.

Keywords: *Bla_Z*. *MecA*. MRSA. Animal Production.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Identificação de <i>Staphylococcus aureus</i> pela coloração de Gram	13
Figura 2 – Estrutura química dos Beta-lactâmicos	15
Figura 3 - Resistência a metilina condicionada pelo gene <i>blaZ</i>	16
Figura 4 - Indução do gene <i>mecA</i>	17

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Genes associados a resistência aos carbapenêmicos	18
--	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	OBJETIVOS.....	12
2.1	Objetivo Geral.....	12
2.2	Objetivos Específicos	12
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	13
3.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	13
3.2	Sensibilidade aos antimicrobianos	14
3.3	Beta-lactâmicos	15
3.4	Clonalidade e variabilidade genética.....	19
3.5	Referências.....	19
4	ARTIGOS.....	23
4.1	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes a metilina e meropenem em leite de vacas com mastite subclínica	23
4.2	Artigo publicado na revista Veterinary World.....	37
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	38
	ANEXO – APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	39

1 INTRODUÇÃO

Mastite bovina constitui uma enfermidade que, apesar de diversos avanços em termos de prevenção e controle, permanece como a doença infecciosa mais prevalente e economicamente relevante entre bovinos leiteiros. Ela acontece com o carreamento de patógenos para o teto da vaca e está associada a falta de higiene durante a ordenha. Como consequência da doença, pode ocorrer redução na produção e descarte de leite, diminuição do valor comercial do animal afetado, necessidade de mão de obra extra e de tratamento.

O patógeno mais associado a mastite é a bactéria *Staphylococcus aureus* que também é associada a intoxicações alimentares em humanos. Um agravante a essas situações são as formas de resistência ao tratamento antimicrobiano que é tão prejudicial ao bovino e ao sistema de produção, quanto a saúde do ser humano consumidor de leite e laticínios.

A resistência microbiana vem sendo um problema crescente no Brasil e no mundo. Além do surgimento de cepas resistentes ocasionadas naturalmente por mutações, também pode ocorrer sua proliferação após seleção microbiana por uso de antimicrobianos ou a transferência de genes de resistência por transformação, transdução ou conjugação.

Uma das formas de resistência mais preocupantes em rebanhos leiteiros é quanto a metilina, por ser uma droga já formulada para cepas resistentes produtoras de penicilinas. Mais preocupante ainda, seria a resistência a drogas de reserva como os carbapenêmicos que nem mesmo são recomendadas para animais de produção, mas sim para humanos quando não há outras alternativas. Não há relatos na literatura de resistência aos carbapenêmicos em *Staphylococcus aureus*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Determinar a epidemiologia molecular de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes aos Beta-lactâmicos isolados de leite de vacas com mastite subclínica.

2.2 Objetivos Específicos

- Identificar *Staphylococcus aureus* em amostras de leite de bovinos com mastite subclínica em quinze fazendas de produção leiteira do norte de Minas Gerais;
- Determinar a sensibilidade dos isolados de *Staphylococcus aureus* detectados aos antimicrobianos Beta-lactâmicos;
- Rastrear os genes *bla_Z*, *mecA*, *mec_{CALGA251}* nos isolados de *Staphylococcus aureus* resistentes a Beta-lactâmicos;
- Rastrear os genes *bla_{KPC}* e *bla_{OXA23}* nos isolados de *Staphylococcus aureus* resistentes a Carbapenêmicos;
- Determinar a variabilidade genética e o perfil de clonalidade entre os isolados resistentes.

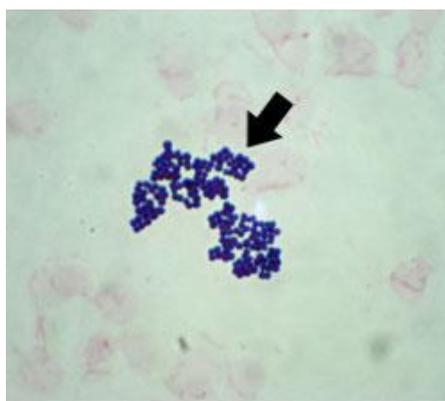
3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus compõe a microbiota normal da pele e vias respiratórias humanas, mas também pode ser patógeno oportunista em vários tipos de infecções como de pulmões, pele e corrente sanguínea (IBARRA ORREGO *et al.*, 2017). Além de ser o patógeno mais frequente em mastite bovina, essa bactéria também se associa a doenças transmitidas por alimentos em humanos. Siqueira *et al.* (2017) pesquisaram em isolados desta bactéria, oriundos de leite bovino orgânico de fazendas de São Paulo, a presença de enterotoxinas A, B, C e D, responsáveis por intoxicações alimentares. Cada uma dessas enterotoxinas pesquisadas esteve presente em pelo menos um dos dezessete isolados, sendo a toxina A presente em 29,4% destes.

Quanto a sua morfologia, *Staphylococcus aureus* são bactérias esféricas, imóveis que se agrupam formando emaranhados semelhantes a cachos de uva (FIGURA 1).

Figura 1 – Identificação de *Staphylococcus aureus* pela coloração de Gram



Fonte: ANVISA, 2007.

Crescem em meios comuns com pH=7 em temperatura de, aproximadamente, 37°C. As colônias são formadas em placas após incubação de 18 a 24 horas, apresentando morfologia arredondada e lisa, com coloração que pode chegar a amarelo, aumentando com o tempo de incubação. Como características bioquímicas, nas placas de ágar sangue, produzem hemólise devido a produção de toxinas capazes de hidrolisar hemácias. Essas bactérias também conseguem fermentar manitol produzindo ácido láctico e tem a capacidade de se desenvolver em presença de NaCl a 7,5%. São, ainda, produtores de coagulase ou fator aglutinante que, em contato com o plasma sanguíneo atua no fibrinogênio formando fibrina. Produzem, também, a enzima catalase que converte o peróxido de hidrogênio em oxigênio e água (FREITAS *et al.*, 2018; AQIB *et al.*, 2017).

Para identificação bioquímica desta espécie bacteriana, é comum a escolha de um conjunto de testes que possam diferenciá-la das demais bactérias presentes na amostra (FREITAS *et al.*, 2018; COSTA *et al.*, 2018). Costa *et al.* (2018) utilizaram coloração de Gram,

testes de catalase, coagulase, produção de acetoina em meio MRVP, degradação de maltose e trealose. Já Locatelli *et al.* (2017) utilizaram apenas ágar MRSA e observação de hemólise em ágar sangue, mas confirmaram essa identificação por PCR. Testes bioquímicos são demorados, trabalhosos, relativamente caros, requerendo maior tempo de mão de obra, diversidade de equipamentos, utensílios e espaço físico. No que se refere ao tempo, melhor seria tratar um animal doente o mais rápido possível antes que a infecção se agrave. Quanto antes identificar o patógeno para promover o tratamento adequado, menor a necessidade de se proceder tratamento empírico e uso indiscriminado de antimicrobianos. Em alguns casos, a escolha incorreta de um antibiótico além de não tratar, deixaria resíduos nas amostras que comprometeria a eficácia de um novo antibiograma. O uso abusivo de antibióticos também pode contribuir para selecionar micro-organismos resistentes (ZHENG *et. al.*, 2018; LIU *et al.*, 2017).

Um teste que vem ganhando espaço na detecção do *Staphylococcus aureus* substituindo testes bioquímicos e com a vantagem de maior rapidez, praticidade e especificidade é a espectrometria de massa por MALDI-TOF ou Matrix Associated Laser Desorption Ionization - Time of Flight (PÉREZ-SANCHO *et al.*, 2018). Trata-se de um teste proteômico que mede o peso molecular da bactéria de modo que se pode saber com precisão a identificação de cada micro-organismo desde que ele se assemelhe significativamente com os padrões em nível de gênero e espécie previamente cadastrados na biblioteca de dados do MALDI-TOF. Também é possível alimentar esta biblioteca identificando novos tipos microbianos e registrando seu padrão específico de picos.

PÉREZ-SANCHO e sua equipe de pesquisa (2018) conseguiram identificar 52 subespécies de *S. aureus* com 100% de sensibilidade e especialidade utilizando MALDI-TOF. Zaatout *et al.* (2019) utilizaram esta técnica para investigação epidemiológica de mastite bovina subclínica na Argélia. Após identificarem os patógenos por métodos bioquímicos, eles utilizaram o MALDI-TOF como teste confirmatório para os *S. aureus* e obtiveram score >2. Nesse estudo, *S. aureus* foi um dos patógenos mais ocorrentes, após *Staphylococcus coagulase negativos* e *Escherichia coli*.

3.2 Sensibilidade aos antimicrobianos

Após a identificação microbiana, é necessário verificar suscetibilidade do patógeno aos antimicrobianos para recomendação de tratamento. O antibiograma ainda é teste convencional recomendado pelo CLSI (2018), podendo ser utilizada a metodologia para determinação da concentração inibitória mínima (MIC), concentração bactericida mínima (MBC) ou testes por difusão em disco.

Apesar de ser muito utilizado, o antibiograma tem suas limitações. Quando feito manualmente, além de ser um procedimento demorado e trabalhoso, suas várias etapas como a medição dos halos com precisão milimétrica ou a adequação da concentração bacteriana, pode variar subjetivamente de um executor para outro, tornando-o com baixa precisão. Um

simples milímetro de diferença pode determinar se uma bactéria é sensível ou resistente a determinados fármacos (CLSI, 2018). Mesmo não havendo falha de execução, o método não apresenta total confiabilidade.

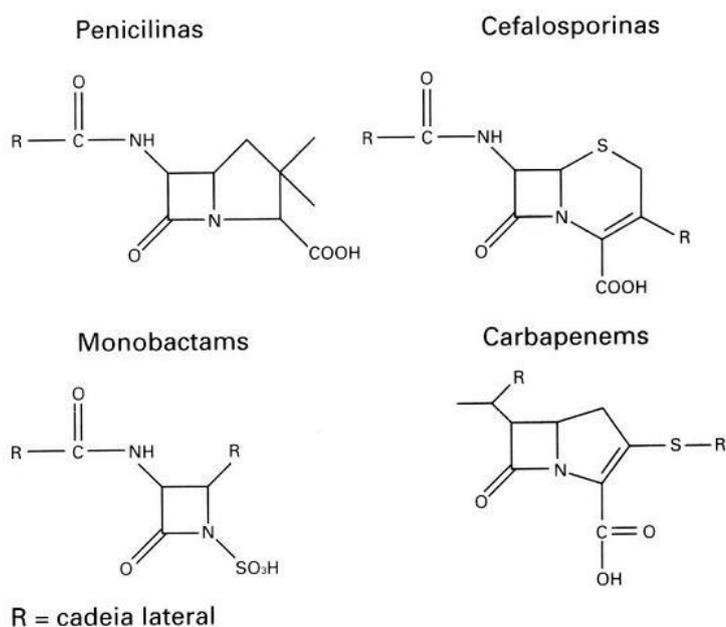
Guimarães *et al.* (2017), pesquisando isolados de mastite, obtiveram, entre 60 *S. aureus*, 15 (25%) *mecA* positivos e suscetíveis a oxacilina pelo método MIC. Percentual maior que os 14 (23,3%) isolados obtidos que foram *mecA* positivos e resistentes a meticilina. Os outros 31 (51,7%) foram *mecA* negativos e suscetíveis a meticilina. Ao resultado discordante fenótipo X genótipo, os autores atribuem que os 15 *S. aureus mecA* positivos e oxacilina sensíveis carregaram o gene de resistência a meticilina/oxacilina, constituindo potencial risco de disseminação via plasmídeo para outras bactérias, mesmo quando a resistência fenotípica não foi observada.

Rocchetti *et al.* (2018) em seus 85 isolados, encontraram 43 *mecA* positivos, sendo um deles sensível a oxacilina e o restante resistente. Nos outros 42 isolados *mecA* negativos, 41 foram suscetíveis e 1 resistente a oxacilina pelo método de difusão em disco.

3.3 Beta-lactâmicos

São compostos antimicrobianos que possuem em comum, no seu núcleo estrutural, o anel beta-lactâmico (FIGURA 2). Pertencem a este grupo as penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactams (DURAND *et al.*, 2019). Estes fármacos penetram na célula bacteriana e agem interferindo na síntese de peptidoglicano da parede celular.

Figura 2 – Estrutura química dos Beta-lactâmicos

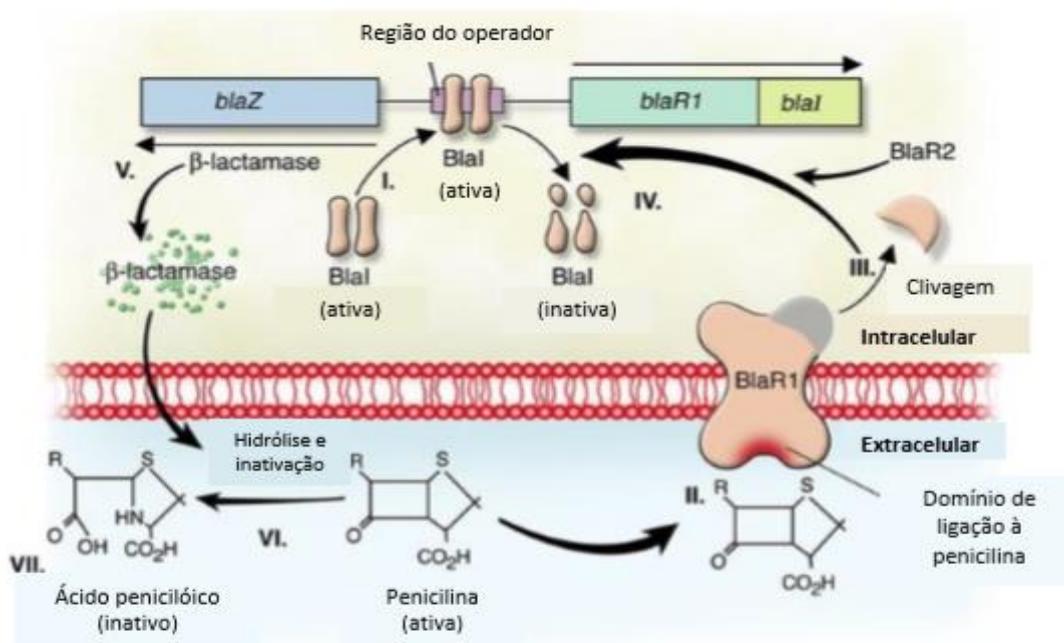


Fonte: WILLIAMS, 1999.

Dentre os mecanismos de resistência relatados, está a produção de enzimas pelas bactérias chamadas de penicilinases ou betalactamases que hidrolisam o anel beta-lactâmico inativando o fármaco (UDDIN; AHN, 2017). Outros mecanismos incluem modificações na proteína PBP que atua como receptor para penicilina, causando assim o impedimento do fármaco de entrar na célula bacteriana (AQIB *et al.*, 2017). Também modificações nas porinas que são proteínas responsáveis pela permeabilidade, afetam a entrada de elementos para o interior da célula, comprometendo a entrada do fármaco.

O gene *blaZ* é o responsável por codificar a produção de betalactamases (UDDIN, AHN, 2017; FELTRIN *et al.*, 2016; ARAGÃO *et al.*, 2019). Este gene pode estar localizado em plasmídios (PIZAURO *et al.*, 2019) e é relatado com frequência em isolados de *Staphylococcus aureus* meticilina resistentes oriundos de mastite bovina (FELTRIN *et al.*, 2016) e de laticínios (ARAGÃO *et al.*, 2019). Na Figura 3, é mostrada a indução de betalactamases na presença de um Beta-lactâmico do tipo penicilina. A proteína Blal pode se ligar a região do operador no DNA, reprimindo a transcrição do RNA de *blaZ* e *BlaR1-blaI*, pois na ausência de penicilina a betalactamase é expressa em níveis baixos. Na presença de penicilina, quando esta entra na célula, se liga ao transdutor sensor transmembrana BlaR1 estimulando a ativação autocatalítica deste sensor. O BlaR1 ativo, direta ou indiretamente (por meio da proteína blaR2) divide *blal* em fragmentos inativos permitindo o início da transcrição de *blaZ* e *blaR1*. A betalactamase codificada pelo *blaZ* hidrolisa o anel beta-lactâmico da penicilina tornando-a um composto inativo (ácido penicilóico).

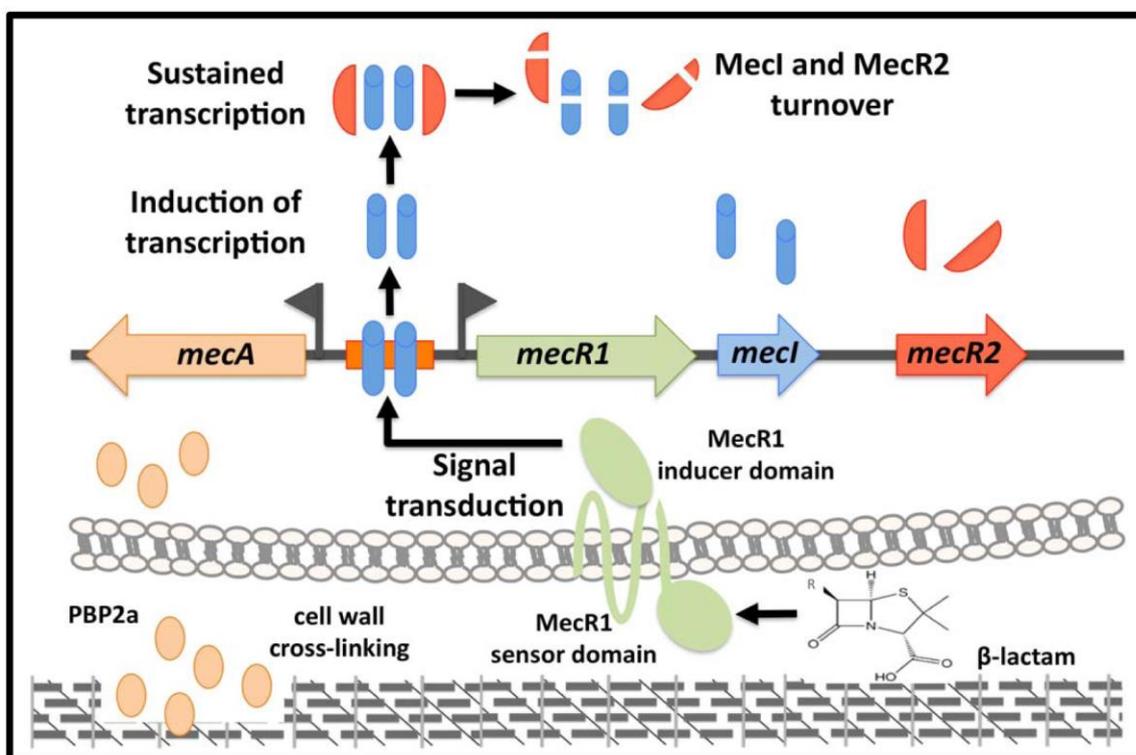
Figura 3 - Resistência a meticilina condicionada pelo gene *blaZ*



Fonte: COELHO, 2016.

A resistência a metilina tem despertado relevante preocupação dentre as demais penicilinas (LOCATELLI *et al.*, 2017; HACHIYA *et al.*, 2017). A ineficácia a estes fármacos geralmente ocorre pela síntese de uma proteína PB2A na bactéria que é plenamente funcional, mas não tem afinidade de ligação com os Beta-lactâmicos. A condição para a síntese desta proteína está associada a aquisição do gene *mecA* (AQIB *et al.*, 2017; UDDIN, AHN, 2017) e/ou seu homólogo *mec*_{CALGA251} (BECKER *et al.*, 2018). A Figura 4 mostra a indução do gene *mecA*. Pode-se observar que, na presença de um Beta-lactâmico, o indutor *mecR1* é ativado e induzindo a transcrição do gene *mecA-mecI-mecR2*. Também ocorre a atividade antirrepressora de *mecR2* promove a inativação de *mecI* por clivagem proteolítica.

Figura 4 - Indução do gene *mecA*



Fonte: ARÊDE *et al.*, 2012.

Locatelli *et al.* (2017) identificaram o gene *mecA* em *S. aureus* isolados de animais de produção e humanos em contato com esses animais. Em outro estudo, Hachiya *et al.* (2017) reportaram esse gene em um isolado de laticínios.

Além dos genes *mecA* e *mec*_{CALGA-251}, Becker *et al.* (2018), associaram também o gene *mecB* a este tipo de resistência. De acordo com CLSI (2018), bactérias resistentes a oxacilina ou cefoxitina também podem ser consideradas resistentes a metilina.

Já a resistência aos carbapenêmicos ainda não foi relatada na literatura em isolados de *Staphylococcus aureus*. Seu uso é eficaz contra essas bactérias, embora não seja recomendado na produção leiteira. Carbapenêmicos são considerados fármacos de reserva, ou

seja, são empregados em último recurso no tratamento das infecções (WHO, 2017). A resistência a estas drogas é motivo de preocupação, tendo relatos em bactérias multirresistentes como *Acinetobacter baumannii* ou nas chamadas “superbactérias” como a *Klebsiella Pneumoniae* carbapenemase. Elshafie *et al.* (2019) detectaram *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenêmicos e portadora dos genes *bla_{OXA23}* e *bla_{KPC}* em fezes de animais de fazenda e humanos no Egito. Vikram e Schmidt (2018) detectaram *bla_{KPC-2}* funcional em fezes de bovinos de corte criados sem uso de antibióticos.

WANG *et al.* (2018), rastrearam 14 genes associados a produção de carbapenemases e um dos genes presentes em maior percentual nos isolados foi o *bla_{OXA23}*. Em outro estudo, Fu *et al.* (2019) relatam uma pandêmica disseminação via plasmídeo do gene *bla_{KPC}* que também é associado a resistência aos carbapenêmicos. Na Tabela 1 são citados alguns trabalhos exemplificando esses genes.

Tabela 1 – Genes associados a resistência aos carbapenêmicos

Gene	Autor
<i>bla_{KPC}</i>	WANG <i>et al.</i> , 2018; NASRI, <i>et al.</i> , 2017
<i>bla_{KPC-2}</i>	VIKRAM; SCHMIDT, 2018
<i>bla_{GES}</i>	WANG <i>et al.</i> , 2018
<i>bla_{GIM}</i>	WANG <i>et al.</i> , 2018
<i>bla_{IPM}</i>	WANG <i>et al.</i> , 2018; JOSHI <i>et al.</i> , 2017
<i>bla_{NDM}</i>	WANG <i>et al.</i> , 2018; JOSHI <i>et al.</i> , 2017; NASRI, <i>et al.</i> , 2017
<i>bla_{SPM}</i>	WANG <i>et al.</i> , 2018
<i>bla_{SIM}</i>	WANG <i>et al.</i> , 2018
<i>bla_{VIM}</i>	WANG <i>et al.</i> , 2018; JOSHI <i>et al.</i> , 2017
<i>bla_{OXA23}</i>	WANG <i>et al.</i> , 2018; LUPO <i>et al.</i> , 2017
<i>bla_{OXA24}</i>	WANG <i>et al.</i> , 2018; JOSHI <i>et al.</i> , 2017
<i>bla_{OXA48}</i>	NASRI <i>et al.</i> , 2017
<i>bla_{OXA51}</i>	WANG <i>et al.</i> , 2018; JOSHI <i>et al.</i> , 2017
<i>bla_{OXA58}</i>	WANG <i>et al.</i> , 2018; JOSHI <i>et al.</i> , 2017
<i>bla_{OXA143}</i>	WANG <i>et al.</i> , 2018
<i>bla_{OXA-235}</i>	WANG <i>et al.</i> , 2018

Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

3.4 Clonalidade e variabilidade genética

Uma vez que se tem confirmada a doença, tendo detectado o patógeno e suas formas de resistência para viabilizar o tratamento nos animais acometidos, resta saber a melhor medida a ser empregada para evitar novos casos. A análise do perfil de variabilidade genética pode esclarecer questões como: se um tipo microbiano que vem acarretando mastite em uma fazenda está sendo transferido pelas mãos de ordenhadores; se um microrganismo causador de um surto alimentar detectado em leite ou laticínios foi oriundo desde o teto de vacas com mastite; ou mesmo se patógenos estão sendo carreados de uma fazenda para outra (SIQUEIRA *et al.*, 2017; LOCATELLI *et al.*, 2017).

Um teste que pode ser utilizado para determinar o perfil de heterogenicidade em *Staphylococcus aureus* é o Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) pelo uso da tecnologia PCR (XAVIER *et al.*, 2017; IDIL, BILKAY, 2014). Para esta reação, pode ser utilizado o oligonucleotídeo S232 que amplificará um padrão de bandas que poderá variar de um isolado para outro de acordo com a diferença genética entre os mesmos.

Quando os micro-organismos, respeitando uma taxa de mutação, são iguais entre si (clones), presume-se que estão sendo carreados (SIQUEIRA *et al.*, 2017). Micro-organismos da mesma espécie com o mesmo padrão de resistência podem também ter determinadas diferenças em seu perfil de variabilidade genética (LOCATELLI *et al.*, 2017), inclusive ocasionadas pela transferência de material genético e/ou mutação.

A biologia molecular, cada vez mais, vem estando presente em laboratórios tanto para fins científicos quanto analíticos. Alguns pesquisadores, após procederem antibiograma, utilizaram PCR para comprovar resistência microbiana, inclusive a meticilina em *S. aureus* isolados de leite bovino (AQIB *et al.*, 2017; HACHIYA, *et al.*, 2017; GUIMARÃES *et al.*, 2017; ROCCHETTI *et al.*, 2018).

3.5 Referências

AQIB, A. I.; IJAZ, M.; ANJUM, A. A.; MALIK, M. A. R.; MEHMOOD, K.; FAROOQI, S. H.; HUSSAIN, K. Antibiotic susceptibilities and prevalence of Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from bovine milk in Pakistan. **Acta Tropica**, v. 176, p. 168-172, 2017. Disponível em: <https://bit.ly/390FaYO>. Acesso em: 28 jan. 2020.

ANVISA. **Gram-negativos**: resistência microbiana: mecanismos de impacto clínico. 2007. pt. 3. Disponível em: <https://bit.ly/3d2LHp8>. Acesso em: 2 ago. 2019.

ARAGÃO, B B.; TRAJANO, S. C.; SILVA, J. G.; SILVA, B. P.; OLIVEIRA, R. P.; OINHEIRO JÚNIOR, J. W.; PEIXOTO, R. M.; MOTA, R. A. Short communication: high frequency of β -lactam-resistant *Staphylococcus aureus* in artisanal coalho cheese made from goat milk produced in northeastern Brazil. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 8, p. 6923-6927, 2019. Disponível em: <https://bit.ly/33rP6Jz>. Acesso em: 2 ago. 2019.

ARÊDE, P.; MILHEIRIÇO, C.; LENCASTRE, H.; OLIVEIRA, D. C. The anti-repressor MecR2 promotes the proteolysis of the mecA repressor and enables optimal expression of β -lactam resistance in MRSA. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 7, e1002816, 2012. Disponível em: <https://bit.ly/3aZHyAz>. Acesso em: 2 ago. 2019.

BECKER, K.; 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**, v. 24, n. 2, p. 242-248, 2018. Disponível em: <https://bit.ly/2ITKnqJ>. Acesso em: 2 ago. 2019.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**. 28th ed. CLSI supplement M100. Wayne: CLSI, 2018.

COELHO, M. C. F. P. **Infecções associadas ao cuidado de saúde: o caso da bactéria *Staphylococcus aureus* resistente a metilina**. 2016. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade do Algarve, [Faro], 2016. Disponível em: <https://bit.ly/2xLAsRU>. Acesso em: 1 ago. 2019.

COSTA, F. M.; BELO, N. O.; COSTA, E. A.; ABDRADE, G. I.; PEREIRA, L. S.; CARVALHO, I. A.; SANTOS, R. L. Frequency of enterotoxins, toxic shock syndrome toxin-1, and biofilm formation genes in *Staphylococcus aureus* isolates from cows with mastitis in the Northeast of Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 50, p.1089-1097, 2018. Disponível em: <https://bit.ly/2IVeZbi>. Acesso em: 3 ago. 2019.

DURAND, A. G.; RAOULT, D.; DUBOURG, G. Antibiotic discovery: history, methods and perspectives. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 53, n. 4, p. 371-382, 2019. Disponível em: <https://bit.ly/2Ugwwjp>. Acesso em: 6 ago. 2019.

ELSHAFIEE, E. A.; NADER, S. M.; DORGHAM, S. M.; HAMZA, D. A. Carbapenem-resistant *Pseudomonas Aeruginosa* originating from farm animals and people in Egypt. **Journal of Veterinary Research**, v. 63, n. 3, p. 333-337, 2019. Disponível em: <https://bit.ly/2x1Ax3p>. Acesso em: 2 ago. 2019.

FELTRIN, F.; ALBA, P.; KRAUSHAAR, B.; IANZANO, A.; ARGUDÍN, M. A.; DI MATTEO, P.; PORRERO, M. C.; AARESTRUP, F. M.; BUTAYE, P.; FRANCO, A.; BATTISTI, A. A livestock-associated, multidrug-resistant, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clonal complex 97 lineage spreading in dairy cattle and pigs in Italy. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 3, p. 816-821, 2016. Disponível em: <https://bit.ly/3d98XSg>. Acesso em: 4 ago. 2019.

FREITAS, C. H.; MENDES, J. F.; VILLAREAL, P. V.; SANTOS, P. R.; GONÇALVES, C. L.; GONZALES, H. L.; NASCENTE, P. S. Identification and antimicrobial susceptibility profile of bacteria causing bovine mastitis from dairy farms in Pelotas, Rio Grande do Sul. **Brazilian Journal of Biology**, v. 78, n. 4, p. 661-666, 2018. Disponível em: <https://bit.ly/2TXipkg>. Acesso em: 2 ago. 2019.

FU, P.; TANG, Y.; YU, L.; WANG, Y.; JIANG, X. Pandemic spread of blaKPC-2 among *Klebsiella pneumoniae* ST11 in China is associated with horizontal transfer mediated by IncFII-like plasmids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 54, n. 2, p.117-124, 2019. Disponível em: <https://bit.ly/2UeGMcc>. Acesso em: 5 ago. 2019.

GUIMARÃES, F. F.; MANZI, M. P.; JOAQUIM, S. F.; RICHINI-PEREIRA, V. B.; LANGONI, H. Short communication: outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)-associated mastitis in a closed dairy herd. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 1, p. 726-730, 2017. Disponível em: <https://bit.ly/2TXrAB7>. Acesso em: 3 ago. 2019.

HACHIYA, J. O.; ROSSI, G. A. M.; RIBEIRO, L. F.; SATO, R. A.; SILVA, H. O.; VIDAL, A. M. C.; AMARAL, L. A. Methicillin-resistant *Staphylococcus* spp. isolated from curd cheese “requeijão” and “especialidade láctea type requeijão” sold in Brazil. **Ciência Rural**, v. 47, n. 7, e20170008, 2017. Disponível em: <https://bit.ly/2TULbIE>. Acesso em: 4 ago. 2019.

IBARRA ORREGO, M. C.; ARRÚA TORREANI, N.; DURAÑONA, C. K.; ACUÑA, A. Infecciones por *Staphylococcus aureus* metilino resistentes adquiridas en la comunidad. **Revista Virtual de la Sociedad Paraguaya de Medicina Interna**, v. 4, n. 1, p. 100-1004, 2017. Disponível em:

http://scielo.iics.una.py/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2312-38932017000100100&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 4 ago. 2019.

IDIL, N.; BILKAY, I. S. Application of RAPD-PCR for determining the clonality of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from different hospitals. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, n. 4, p. 548-553, 2014. Disponível em: <https://bit.ly/2WgC9Rw>. Acesso em: 6 ago. 2019.

JOSHI, P. R.; ACHARYA, M.; KAKSHAPATI, T.; LEUNGTONGKAM, U.; THUMMEEPK, R.; SITTHISAK, S. Co-existence of blaOXA-23 and blaNDM-1 genes of *Acinetobacter baumannii* isolated from Nepal: antimicrobial resistance and clinical significance. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 6, n. 21, 2017. Disponível em: <https://bit.ly/2w34UXf>. Acesso em: 4 ago. 2019.

LIU, H.; LI, S.; MENG, L.; DONG, L.; ZHAO, S.; LAN, X.; WANG, J.; ZHENG, N. Prevalence, antimicrobial susceptibility, and molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from dairy herds in northern China. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 11, p.8796-8803, 2017. Disponível em: <https://bit.ly/2IUwwAs>. Acesso em: 7 ago. 2019.

LOCATELLI, C.; CREMONESI, P.; CAPRIOLI, A.; CARFORA, V.; IANZANO, A.; BARBERIO, A.; MORANDI, S.; CASULA, A.; CASTIGLIONI, B.; BRONZO, V.; MORONI, P. Occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dairy cattle herds, related swine farms, and humans in contact with herds. **Journal of Dairy Science**, v.100, n. 1, p. 608-619, 2017. Disponível em: <https://bit.ly/2WIsY2j>. Acesso em: 4 ago. 2019.

LUPO, A.; CHÂNTRE, P.; PONSIN, C.; SARAS, E.; BOULOUIS, H. J.; HAENNI, M.; MADEC, J. Y. Clonal spread of *Acinetobacter baumannii* sequence type 25 carryin gblaOXA-23 in companion animals in France. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 1, e01881-16, 2017. Disponível em: <https://bit.ly/2wehYcg>. Acesso em: 6 ago. 2019.

NASRI, E.; SUBIRATS, J.; SÀNCHEZ-MELSIÓ, A.; MANSOUR, H. B.; BORREGO, C. M.; BALCÁZAR, J. L. Abundance of carbapenemase genes (blaKPC, blaNDM, and blaOXA-48) in wastewater effluents from Tunisian hospitals. **Environmental Pollution**, v. 229, p.371-374, 2017. Disponível em: <https://bit.ly/2IU8dms>. Acesso em: 2 ago. 2019.

PÉREZ-SANCHO, M.; VELA, A. I.; HORCAJO, P.; UGARTE-RUIZ, M.; DOMÍNGUEZ, L.; FERNÁNDEZ-GARAYZÁBAL, J. F.; DE LA FUENTE, R. Rapid differentiation of *Staphylococcus aureus* subspecies based on MALDI-TOF MS profiles. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 30, n. 6, p. 813-820, 2018. Disponível em: <https://bit.ly/2UchFqp>. Acesso em: 3 ago. 2019.

PIZAURO, L. J. L.; ALMEIDA, C. C.; GOHARI, I. M.; MACINENES, J. I.; ZAFALON, L. F.; KROPINSKI, A. M.; VARANI, A. M. Complete genome sequences of 11 *Staphylococcus* sp. strains isolated from buffalo milk and milkers' hands. **Microbiology Resource Announcements**, v. 8, n. 47, e01264-19, 2019. Disponível em: <https://bit.ly/3a1cgcg>. Acesso em: 1 ago. 2019.

ROCCHETTI, T. T.; MARTINS, K. B.; MARTINS, P. Y. F.; OLIVEIRA, R. A.; MONDELLI, A. L.; FORTALEZA, C. M. C. B.; CUNHA, M. L. R. S. Detection of the mecA gene and identification of *Staphylococcus* directly from blood culture bottles by multiplex polymerase chain reaction. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 22, n. 2, p. 99-105, 2018. Disponível em: <https://bit.ly/2QoXB2T>. Acesso em: 4 ago. 2019.

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**, v. 54, n. 1, p. 81-87, 2017. Disponível em: <https://bit.ly/2TWWhnVB>. Acesso em: 3 ago. 2019.

UDDIN, M. J.; AHN, J. Associations between resistance phenotype and gene expression in response to serial exposure to oxacillin and ciprofloxacin in *Staphylococcus aureus*. **Letters in Applied Microbiology**, n. 65, p. 462-468, 2017. Disponível em: <https://bit.ly/2w53efW>. Acesso em: 8 ago. 2019.

VIKRAM, A.; SCHMIDT, J. W. Functional blaKPC-2 sequences are present in U.S. beef cattle feces regardless of antibiotic use. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.15, n. 7, 2018. Disponível em: <https://bit.ly/2IVE6uN>. Acesso em: 5 ago. 2019.

WANG, T.; LEU, Y-S.; WANG, N-Y.; LIU, C-P.; YAN, T-R. Prevalence of different carbapenemase genes among carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* blood isolates in Taiwan. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 7, p. 1- 8, 2018. Disponível em: <https://bit.ly/2QIAaaG>. Acesso em: 2 ago. 2019.

WILLIAMS, J. D. β -lactamases and β -lactamase inhibitors. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.12, sup. 1, p. S3-S7, 1999. Disponível em: <https://bit.ly/2Qn5So4>. Acesso em: 4 ago. 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO model list of essential medicines**. 20th list. [S. l.]: WHO, 2017. 58 p. Disponível em: <https://bit.ly/3a9NJBO>. Acesso em: 14 jan. 2020.

XAVIER, A. R. E. O.; ALMEIDA, A. C.; SOUZA, C. N.; SILVA, L. M. V.; RUAS, A. X. A.; SANGIARD, D. A.; MELO JÚNIOR, A. F.; OLIVEIRA, A. M. E.; XAVIER, M. A. S. Phenotypic and genotypic characterization of *Staphylococcus aureus* isolates in milk from flocks diagnosed with subclinical mastitis. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 2, p. 1-11, 2017. Disponível em: <https://bit.ly/2Uci0tg>. Acesso em: 6 ago. 2019.

ZAATOUT, N.; AYACHI, A.; KECHA, M. Epidemiological investigation of subclinical bovine mastitis in Algeria and molecular characterization of biofilm-forming *Staphylococcus aureus*. **Tropical Animal Health and Production**, v. 51, p. 283-292, 2020. Disponível em: <https://bit.ly/39WVqeB>. Acesso em: 4 ago. 2019.

ZHENG, X.; BERTI, A. D.; MCCRONE, S.; ROCH, M.; ROSATO, A. E.; ROSE, W. E.; CHEN, B. Combination antibiotic exposure selectively alters the development of vancomycin intermediate resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 2, P. e02100-17, 2018. Disponível em: <https://bit.ly/2IPJPSK>. Acesso em: 4 ago. 2019.

4 ARTIGOS

Este artigo foi escrito conforme as normas da revista Ciência Rural

4.1 *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina e meropenem em leite de vacas com mastite subclínica

Resumo: *Staphylococcus aureus* é o patógeno mais ocorrente em mastite bovina. Uma das formas mais preocupantes de resistência ao tratamento antimicrobiano é quanto a meticilina. A resistência desta bactéria a carbapenêmicos ainda não é descrita na literatura. O objetivo deste estudo foi averiguar a frequência de *Staphylococcus aureus* em mastite bovina subclínica em fazendas de produção leiteira no norte de Minas Gerais e estabelecer o perfil de sensibilidade a antimicrobianos da classe dos Beta-lactâmicos. Para isso, foram coletadas amostras de leite de tetos com mastite subclínica, cujos patógenos foram identificados por espectrometria de massa MALDI-TOF. A suscetibilidade aos antimicrobianos amoxicilina, oxacilina, ampicilina/sulbactam, cefoxitina, imipenem e meropenem foi testada por difusão em disco. Como resultado, 214 microrganismos foram detectados, sendo *Staphylococcus* o gênero mais frequente (N = 146) e, destes, 79 foram da espécie *aureus*. Entre os *Staphylococcus aureus*, 30 (37,9%) isolados foram resistentes a cefoxitina, sendo o restante (62,1%) sensível ao fármaco. Já no teste de sensibilidade a oxacilina, 29 (36,7%) foram resistentes. Quanto a amoxicilina, a resistência foi de 27 (34,2%) e ao meropenem, de 9 (11,4%). Houve associação significativa entre resistência e fazenda de origem dos isolados.

Palavras-chave: MRSA; ORSA; Leite; Produção Animal.

Methicillin and meropenem resistant *Staphylococcus aureus* in milk of cows with subclinical mastitis

Abstract: *Staphylococcus aureus* is the most associated pathogen with bovine mastitis. One of the most worrying forms of resistance to antimicrobial treatment is to methicillin. The resistance of this bacterium to carbapenems is not yet reported in the literature. The aim of this study was

to evaluate the frequency of *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis in the main milk production farms of northern Minas Gerais - Brazil and to establish the beta-lactam antimicrobial susceptibility profile. For this, samples of cow's milk with subclinical mastitis were collected and identified by MALDI-TOF mass spectrometry. Antimicrobial susceptibility to amoxicillin, oxacillin, ampicillin / sulbactam, ceftiofur, imipenem and meropenem was tested by disk diffusion. As a result, 214 microorganisms were detected, being *Staphylococcus* the most frequent genus (N = 146) and, of these, 79 were of *aureus* species. *Acinetobacter* spp. and *Stenotrophomonas* spp., although rarely reported in the literature as causing bovine mastitis, were identified among the pathogens of this study. Among *Staphylococcus aureus*, 30 (37.9%) were resistant to ceftiofur, 29 (36.7%) to oxacillin, 27 (34.2%) to amoxicillin and 9 (11.4%) to meropenem. There was a significant association between resistance and bacteria's farm origin.

Keywords: MRSA; ORSA; Milk; Animal Production.

Introdução

Mastite é uma doença inflamatória que acomete a glândula mamária, geralmente resultante de uma infecção. Em bovinos, ela está relacionada a descarte de leite (DEMEU *et al.*, 2016) e, conseqüentemente redução da produtividade. Requer cuidados para evitar transmissão para outras fêmeas leiteiras (SARTORI *et al.*, 2018; LOCATELLI *et al.*, 2017) e para consumidores de produtos lácteos (JOHLER *et al.*, 2018; HACHIYA, 2017).

O principal patógeno associado a doença é a bactéria *Staphylococcus aureus* (FREITAS *et al.*, 2018; GIARDINI *et al.*, 2018), também causadora de intoxicação alimentar em humanos (SIQUEIRA, 2017) e infecções como em pele, pulmões e corrente sanguínea (ORREGO *et al.*, 2017). Um agravante a esses problemas é a resistência bacteriana a antimicrobianos. A presença de cepas resistentes se relaciona a mutações, uso prévio de antibióticos (ZHENG *et al.*, 2018; LIU *et al.*, 2017) e transferência de material genético (WETERINGS, 2017; HAUBERT *et al.*, 2017). Dentre as formas mais preocupantes, está a resistência aos Beta-lactâmicos meticilina, ceftiofur e/ou oxacilina (LOCATELLI *et al.*, 2017; HACHIYA, 2017; WETERINGS, 2017), porque a meticilina seria uma droga de escolha contra cepas produtoras de penicilinas. A resistência a ceftiofur e/ou oxacilina também pode ser

considerada como resistência a metilina (CLSI, 2018). No Brasil, relatos na literatura de MRSA em isolados de leite com mastite são escassos (GUIMARÃES *et al.*, 2017; MELO *et al.*, 2017).

Já os carbapenêmicos como imipenem e meropenem não são medicamentos usualmente utilizados em produção animal. Eles são considerados fármacos de reserva e, mesmo em humanos, devem ser administrados como última alternativa, quando não há outro recurso a ser empregado (WHO, 2017). Em 2014, a World Health Organization proibiu o uso de carbapenêmicos em animais de produção (WHO, 2014). Relatos de resistência a esses fármacos por bactérias Gram negativas provenientes de animais de companhia, animais selvagens, animais aquáticos, alimentos de origem animal (MICHAEL *et al.*, 2015; KOCK *et al.*, 2018) e no ambiente (MILLIS; LEE, 2019) já foram reportados na literatura. *Pseudomonas aeruginosa* portadoras de resistência foram descritas em fezes de humanos e animais de fazenda (ELSHAFIEE, 2019).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a ocorrência de *Staphylococcus aureus* em leite de vacas com mastite subclínica e estabelecer a suscetibilidade das cepas isoladas a antimicrobianos da classe dos Beta-lactâmicos.

Material e Métodos

Quinze amostras de leite de vacas com mastite subclínica foram coletadas de tetos em quinze fazendas do norte de Minas Gerais, codificadas pelas letras de A a O. Foram seguidas as normas de utilização de animais em experimentos, estando este estudo previamente aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais mediante protocolo número CEUA 90/2018.

No momento da ordenha, foi realizado, a critério de exclusão, o teste da caneca telada para detectar mastite clínica (COSTA *et al.*, 2018). Em seguida, realizou-se como critério de inclusão, o California Mastitis Test (CMT) (SCHALM; NOORLANDER, 1957) para diagnóstico de mastite subclínica, sendo considerados positivos os tetos com resultados de duas e três cruzes. Realizou-se a higienização de cada teto com água corrente, secando em papel toalha e logo após, a antissepsia com álcool a 70% (PU *et al.*, 2014).

Foram colhidos aproximadamente cinco mL de leite de cada teto, em frascos estéreis com tampa rosqueável. Os frascos receberam uma identificação única no momento da coleta.

A seleção dos tetos para este estudo bem como a coleta e transporte do leite foi realizada conforme descrito por Xavier *et al.* (2017) e foram enviados para análises em caixas isotérmicas com gelo para o Laboratório de Sanidade Animal localizado no Centro de Pesquisa em Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais - Brasil (CPCA – ICA/UFMG).

As amostras foram semeadas em ágar sangue ovino (5%V/V) pela técnica de esgotamento e incubando em estufa de crescimento durante 24 horas a 37 °C ±2. Colônias isoladas foram identificadas por espectrometria de massa (MALDI-TOF), conforme Assis *et al.* (2017). Utilizou-se o aparelho Microflex TM MALDI TOF MS da Bruker Daltonics.

Os isolados identificados como *Staphylococcus aureus* foram submetidos ao teste de suscetibilidade a antimicrobianos por difusão em disco (CLSI, 2018). Definiu-se para estes testes os seguintes antimicrobianos da classe dos Beta-lactâmicos: amoxicilina 10µg (FREITAS *et al.*, 2018; COSTA *et al.*, 2018), oxacilina 1µg (COSTA *et al.*, 2018; HAUBERT *et al.*, 2017; PU *et al.*, 2014), ampicilina/sulbactam 15µg (CLSI, 2018), cefoxitina 30µg (AQIB *et al.*, 2017; HAUERT *et al.*, 2017; PU *et al.*, 2014), imipenem 10µg e meropenem 10µg (CLSI, 2018). A classificação de isolados resistentes a meticilina foi definida por meio da resistência a oxacilina e/ou cefoxitina, conforme recomendações de CLSI (2018).

Os resultados foram submetidos à estatística descritiva por meio da distribuição das frequências relativa e absoluta para os achados microbiológicos. Avaliou-se a frequência de resistência aos antimicrobianos isoladamente e em associação e verificou-se a associação entre os isolados multirresistentes com as fazendas de origem, bem como entre os antibióticos utilizados. Adotou-se o teste Qui-Quadrado pelo programa R versão 3.5.0 para as análises estatísticas.

Resultados e Discussão

Foram identificados 214 micro-organismos apresentados no Gráfico 1. A identificação microbiana por MALDI-TOF tem a vantagem de maior precisão se comparado a identificação por provas bioquímicas (ASSIS *et al.*, 2017). Dos micro-organismos detectados, a maior

incidência foi *Staphylococcus aureus* N=79 (36,9% conforme FIGURA 1), o que está em concordância com COSTA *et al.* (2018) no Nordeste do Brasil, que obtiveram 48% de *S. aureus* dentre todos os patógenos diagnosticados. Também em concordância, FREITAS *et al.* (2018) no Rio Grande do Sul obtiveram percentual de 90% da espécie *aureus* entre todos os isolados do gênero *Staphylococcus*. Outras espécies desse gênero como *S. chromogenes* (12,6%) e *S. epidermidis* (6,0%) que foram, respectivamente, o segundo e terceiro patógenos mais frequentes neste estudo com também mostraram relevância no estudo de Melo *et al.* (2017) em mastite bovina atingindo um percentual de 14,9% para *S. chromogenes* e 14,4% para *S. epidermidis* se comportando, também, como segundo e terceiro patógenos mais frequentes.

O perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos em *Staphylococcus aureus*, que, além de alvo deste estudo é o micro-organismo que foi detectado em maior percentual, está apresentado na Tabela 1. Observou-se maior frequência de isolados resistentes à cefoxitina (37,9%), seguido de oxacilina (36,7%), caracterizando isolados metilina resistentes (CLSI, 2018). Sendo assim, pode-se considerar 30 (37,9%) isolados como *S. aureus* metilina resistentes (MRSA), percentual superior aos 27,7% obtidos por HAMID *et al.* (2017).

Nenhum dos isolados apresentou resistência a ampicilina acrescida de sulbactam (Tabela 1). Quanto a ampicilina pura, Freitas *et al.* (2018) obtiveram 43% de resistência, já Hamid *et al.* (2017) obtiveram 83,3%. O sulbactam é um adjuvante inibidor de betalactamase. Já quanto a amoxicilina, 34,2% foram resistentes neste estudo (tabela 1), resultado ligeiramente inferior aos 50% obtidos por Freitas *et al.* (2018) no Rio Grande do Sul. Diferenças podem ocorrer de um rebanho para outro e se relacionam a fatores como aquisição e transferência de determinados genes de resistência; seleção e proliferação de um tipo microbiano; carreamento ou transmissão de microrganismos.

A resistência ao meropenem foi observada em 11,4% (TABELA 1). O fato de essa resistência ser detectada em *S. aureus* em mais de uma fazenda e em isolados resistentes a outros Beta-lactâmicos neste estudo (TABELA 2), é motivo de alerta por ser o primeiro relato nesta espécie de bactéria, indicando necessidade de estudos posteriores. Devido a essa resistência também ser observada em cepas resistentes a metilina (TABELA 2), é sugestivo de proliferação e/ou transmissão desse tipo bacteriano contendo o fenótipo de resistência

MER-CFO-OXA. O p-valor=0,08177 indica que a proliferação e/ou transmissão não se deu ao acaso, ou seja, é possível aprimorar ações de controle microbiano nas fazendas com maior acometimento. Quando analisadas de forma isolada (TABELA 3), as resistências foram estatisticamente significativas na sua distribuição entre as fazendas.

Como carbapenêmicos não são indicados para uso em animais, infere-se a possibilidade de os *Staphylococcus aureus* terem adquirido a resistência ao meropenem de outros micro-organismos que possuíam esse tipo de resistência, uma vez que a literatura relata a transmissão de genes de resistência a carbapenêmicos entre outros tipos bacterianos (FU *et al.*, 2019). Esta hipótese também vai de encontro com os isolamentos de cepas Gram negativas de animais, alimentos de origem animal e ambiente (MICHAEL *et al.*, 2015; KOCK *et al.*, 2018) e no ambiente (MILLS; LEE, 2019), indicando risco pela possibilidade de veiculação e genes entre as diferentes cepas e fontes de infecção, o que ainda é pouco estudado, apesar do risco evidente para a saúde pública (KOCK *et al.*, 2018). Essa resistência pode comprometer a eficácia desses fármacos caso seja necessário utilizá-los em último recurso em humanos, como sugere a WHO (2017).

Outra possibilidade pode estar relacionada com respostas de resistência fenotípica semelhante entre Beta-lactâmicos levando a uma resistência inespecífica, pois os carbapenêmicos assim como as penicilinas, cefalosporinas, e monobactams possuem em comum no seu núcleo estrutural, o anel beta-lactâmico associado à ação na célula bacteriana interferindo na síntese de peptidoglicano da parede celular (DURAND *et al.*, 2019). E dentre os mecanismos de resistência relatados, está a produção de penicilinases ou betalactamases (UDDIN; AHN *et al.*, 2017) e outros mecanismos como modificações na proteína PBP e nas porinas (AQIB *et al.*, 2017) que são proteínas responsáveis pela permeabilidade, afetam a entrada de elementos para o interior da célula, comprometendo a entrada do fármaco (SANDI *et al.*, 2015). A pesquisa de genes de resistência aos carbapenêmicos poderá auxiliar no esclarecimento da resistência fenotípica observada.

O uso de antibióticos em animais exige cautela, pois, desde os anos 80, nenhuma nova classe foi desenvolvida (DURAND *et al.*, 2018) e seu uso abusivo também é responsável por selecionar cepas resistentes (ZHENG *et al.*, 2018; LIU *et al.*, 2017).

Em estudos anteriores, *S. aureus* oriundos de mastite foram detectados em laticínios (JOHLER *et al.*, 2018; HACHIYA, 2017). Nesse sentido, deve haver preocupação tanto quanto a transmissão de micro-organismo quanto de seus fatores de resistência.

Conclusão

Staphylococcus aureus continua sendo o patógeno mais frequente em mastite bovina subclínica. A resistência a meticilina vem surgindo como um problema, se comparada em percentual com os dados reportados na literatura. Cada vez mais bactérias vão adquirindo outros mecanismos de resistência.

Agradecimentos

Este trabalho foi realizado com suporte da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Nestlé S. A. Projeto Mais Leite Saudável/Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento.

Referências

- AQIB, A. I. *et al.* Antibiotic susceptibilities and prevalence of Methicillin resistant ***Staphylococcus aureus*** (MRSA) isolated from bovine milk in Pakistan. **Acta Tropica**, v.176, p. 168–172, Dec. 2017. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28797802>>. Accessed : Jan, 13. 2020. doi: 10.1016/j.actatropica.2017.08.008.
- ASSIS, G. B. N. *et al.* Use of MALDI-TOF Mass Spectrometry for the Fast Identification of Gram-Positive Fish Pathogens. **Frontiers in Microbiology**, vol. 9, n. 8, p. 1492. Aug. 2017. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28848512>>. Accessed: Jan, 13. 2020. doi: 10.3389/fmicb.2017.01492.
- CLSI- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 28th ed, CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2018.
- COSTA, F. M. *et al.* Frequency of enterotoxins, toxic shock syndrome toxin-1, and biofilm formation genes in ***Staphylococcus aureus*** isolates from cows with mastitis in the Northeast of Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, vol. 50, n. 5, p.1089-1097, Jun. 2018.

Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29429115>>. Accessed: Jan, 13, 2020. doi: 10.1007/s11250-018-1534-6.

DEMEU, F. A. *et al.* Efeito da produtividade diária de leite no impacto econômico da mastite em rebanhos bovinos. **Boletim da Indústria Animal**, v. 73, n.1, p. 53-61. Mar. 2016. Available from: <www.iz.sp.gov.br/bia/index.php/bia/article/view/496>. Accessed: Jan, 13, 2020. doi: 10.17523/bia.v73n1p53.

DURAND, A. G., *et al.* Antibiotic discovery: history, methods and perspectives. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 53, n. 4, p. 371–382, Apr. 2019. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30472287>>. Accessed Jan, 13, 2020. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2018.11.010.

ELSHAFIEE, E. A. *et al.* Carbapenem-resistant *Pseudomonas Aeruginosa* Originating from Farm Animals and People in Egypt. **Journal of Veterinary Research**, vol. 63, n. 3, p.333-337. Sep. 2019. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6749737/>>. Accessed Jan, 13, 2020. doi: 10.2478/jvetres-2019-0049.

FREITAS, C. H. *et al.* Identification and antimicrobial susceptibility profile of bacteria causing bovine mastitis from dairy farms in Pelotas, Rio Grande do Sul. **Brazilian Journal of Biology**, v. 78, n. 4, p.661-666. Nov. 2018. Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-69842018000400661>. Accessed Jan, 13, 2020. doi: 10.1590/1519-6984.170727.

FU, P. *et al.* Pandemic spread of *bla*KPC-2 among *Klebsiella pneumoniae* ST11 in China is associated with horizontal transfer mediated by IncFII-like plasmids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 54, n. 2, p.117-124, Ago. 2019. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30885806>>. Accessed Jan, 13, 2020. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2019.03.014.

GIRARDINI, L. K. *et al.* Antimicrobial resistance profiles of *Staphylococcus aureus* clusters on small dairy farms in southern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n.10, p. 951-956. Oct. 2016. Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2016001000951>. Accessed Jan, 13, 2020. doi: 10.1590/s0100-736x2016001000006.

GUIMARÃES, F. F. *et al.* Short communication: Outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)-associated mastitis in a closed dairy herd. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n.1, p. 726-730. Jan. 2017. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27837983>>. Accessed Jan, 13, 2020. doi: 10.3168/jds.2016-11700.

HACHIYA, J. O. *et al.* Methicillinresistant *Staphylococcus* spp. isolated from curd cheese “requeijão” and “especialidade láctea type requeijão” sold in Brazil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 47, n.7, e20170008, Jan. 2017. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27837983>>. Accessed Jan, 13, 2020. doi: 10.3168/jds.2016-11700.

HAMID, S. *et al.* Phenotypic and genotypic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. **Veterinary World**, v. 10, n. 3, p. 363-367. Mar. 2017. Available: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28435202>>. Accessed Jan, 13, 2020. doi: 10.14202/vetworld.2017.363-367.

HAUBERT, L. *et al.* First report of the *Staphylococcus aureus* isolate from subclinical bovine mastitis in the South of Brazil harboring resistance gene *dfrG* and transposon family Tn916-1545. **Microbial Pathogenesis**, vol. 113, p. 242–247. Dec. 2017. Available: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29051059>>. Accessed Jan, 13, 2020. doi: 10.1016/j.micpath.2017.10.022.

JOHLER, S. *et al.* Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated along the raw milk cheese production process in artisan dairies in Italy (Short communication). **Journal of Dairy**

- Science**, v. 1, n.1, p 2915–2920. Apr. 2018. Available from: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002203021830078X>>. Accessed Jan, 14. 2020. doi: 10.3168/jds.2017-13815.
- KÖCK, R. *et al.* Carbapenem-resistant **Enterobacteriaceae** in wildlife, food-producing, and companion animals: a systematic review. **Clinical Microbiology and Infection**, vol. 24, n. 12, p. 1241-1250. Apr. 2018. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29654871>>. Accessed Jan, 14. 2020. doi:10.1016/j.cmi.2018.04.004.
- LIU, H. *et al.* Prevalence, antimicrobial susceptibility, and molecular characterization of **Staphylococcus aureus** isolated from dairy herds in northern China. **Journal of Dairy Science**, vol. 100, n. 11, p. 8796–8803. Nov. 2017. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28865851>>. Accessed Jan, 14. 2020. doi: 10.3168/jds.2017-13370.
- LOCATELLI, C. *et al.* Occurrence of methicillin-resistant **Staphylococcus aureus** in dairy cattle herds, related swine farms, and humans in contact with herds. **Journal of Dairy Science**, vol. 100, n. 1, p. 608–619. Jan, 2017. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27865508>>. Accessed Jan, 14. 2020. doi: 10.3168/jds.2016-11797.
- MELO, P. L. *et al.* Short communication: β -Lactam resistance and vancomycin heteroresistance in **Staphylococcus** spp. isolated from bovine subclinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, vol. 100, n.8, p. 6567- 6571. Aug. 2017. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28624285>>. Accessed Jan, 14. 2020. doi: 10.3168/jds.2016-12329.
- MICHAEL, G. B. *et al.* Emerging issues in antimicrobial resistance of bacteria from food-producing animals. **Future Microbiology**, vol. 10, n. 3, p. 427-443. 2015. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25812464>>. Accessed Jan, 14. 2020. doi: 10.2217/fmb.14.93.
- MILLIS, M. C.; LEE, J. The threat of carbapenem-resistant bacteria in the environment: Evidence of widespread contamination of reservoirs at a global scale. **Environmental Pollution**, v. 255, pt. 1, 113143. Dec. 2019. Available: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31541827>>. Accessed Jan, 14. 2020. doi: 10.1016/j.envpol.2019.113143.
- ORREGO, M. C. I. *et al.* Infecciones por **Staphylococcus aureus** meticilino resistentes adquiridas en la comunidad . **Revista Virtual de la Sociedad Paraguaya de Medicina Interna**. vol. 4, n. 1, p. 100-1004. Mar. 2017. Available from: <scielo.iics.una.py/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2312-38932017000100100>. Accessed Jan, 14. 2020. doi: 10.18004/rvspmi/2312-3893/2017.04(01)100-104.
- PU, W. C *et al.* High Incidence of Oxacillin-Susceptible mecA-Positive **Staphylococcus aureus** (OS-MRSA) Associated with Bovine Mastitis in China. **PLoS One**, v. 9, n. .2, e88134, Feb. 2014. Available from: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0088134>>. Accessed Jan, 14. 2020. doi: 10.1371/journal.pone.0088134.
- SANDI, N. *et al.* **Staphylococcus aureus** Vaccine Candidate from MRSA Isolates: The Prospect of a Multivalent Vaccine. **American Journal of Infectious Diseases**, v. 11, n. 3, p. 54-62, Ago. 2015. Available from: <<https://thescipub.com/abstract/10.3844/ajidsp.2015.54.62>> Accessed Jan, 14. 2020. doi: 10.3844/ajidsp.2015.54.62.
- SARTORI, C. *et al.* Sanitation of **Staphylococcus aureus** genotype B-positive dairy herds: A field study. **Journal of Dairy Science**, vol. 10, n. 8, p. 6897- 6914. Aug. 2018. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29753483>>. Accessed Jan, 14. 2020. doi: 10.3168/jds.2017-13937.

SCHALM, O. W; NOORLANDER, D. O. 1957. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. **Journal of the American Veterinary Medical Associations**, Vol. 130, n. 5, p199-204. Mar. 1957. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13416088>>. Accessed Jan, 14. 2020.

SIQUEIRA, A. K. *et al.* Genes de enterotoxinas, multirresistência a antimicrobianos e caracterização molecular de espécies de **Staphylococcus** spp. isoladas de leite bovino orgânico. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, vol. 54, n. 1, p. 81-87. 2017. Available: <<https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-846777>>. Accessed Jan, 14. 2020.

UDDIN, M. J.; AHN, J. Associations between resistance phenotype and gene expression in response to serial exposure to oxacillin and ciprofloxacin in **Staphylococcus aureus**. **Letters in Applied Microbiology**, n. 65, n. 6, p. 462-468, 2017. Dec. 2017. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28977678>>. Accessed Jan, 14. 2020. doi: 10.1111/lam.12808.

WETERINGS, V. *et al.* Next-Generation Sequence Analysis Reveals Transfer of Methicillin Resistance to a Methicillin-Susceptible **Staphylococcus aureus** Strain That Subsequently Caused a Methicillin-Resistant **Staphylococcus aureus** Outbreak: a Descriptive Study. **Journal of Clinical Microbiology**, vol. 55, n. 9, p. 2808-20816. Sep. 2017. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28679522>>. Accessed Jan, 14. 2020. doi: 10.1128/JCM.00459-17.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Model list of essential medicines. 20th list (March 2017). Geneva: World Health Organisation; 2017. Available from: <https://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/en/>

XAVIER, A.R.E.O. *et al.* Phenotypic and genotypic characterization of **Staphylococcus aureus** isolates in milk from flocks diagnosed with subclinical mastitis. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 2, p. 1-11, Jun. 2017. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28671260>> Accessed Jan, 13. 2020. doi: 10.4238/gmr16029709_

ZHENG, X. *et al.* 2018. Combination Antibiotic Exposure Selectively Alters the Development of Vancomycin Intermediate Resistance in **Staphylococcus aureus**. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, vol. 62, n.2, e02100-17. Jan. 2018. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29158272>>. Accessed Jan, 14. 2020. doi: 10.1128/AAC.02100-17.

Gráfico 1: Microrganismos detectados em mastite bovina subclínica no norte de Minas Gerais

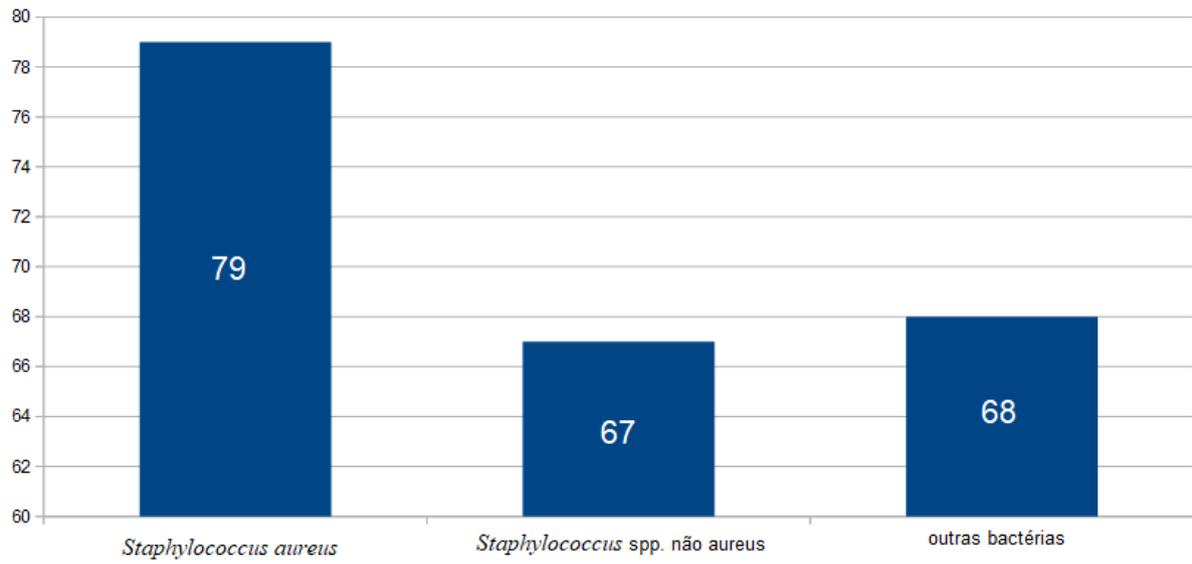


Tabela1: Suscetibilidade de *Staphylococcus aureus* detectados em mastite bovina subclínica no Norte de Minas Gerais aos Beta-lactâmicos

Antimicrobiano	Sensível	Intermediário	Resistente
Amoxicilina	52 (65,8%)	0	27 (34,2%)
Oxacilina	50 (63,3%)	0	29 (36,7%)
Ampicilina + Sulbactam	79 (100%)	0	0
Cefoxitina	49 (62,1%)	0	30 (37,9%)
Imipenem	79 (100%)	0	0
Meropenem	69 (87,3%)	1 (1,3%)	9 (11,4%)

Tabela 2: Perfil de resistência aos Beta-lactâmicos em *Staphylococcus aureus* detectados em mastite subclínica no Norte de Minas Gerais – Brasil

FENÓTIPOS DE RESISTÊNCIA	Fazendas	N (%)	P-valor
CFO, OXA, AMO	A	5 (16,7)	0,07192
	B	3 (10,0)	
	C	3 (10,0)	
	D	2 (6,7)	
	E	1 (3,3)	
	F	1 (3,3)	
MER, CFO,OXA	B	4 (13,3)	0,08177
	G	2 (6,7)	
	D	1 (3,3)	
	F	1 (3,3)	
	H	1 (3,3)	
OXA, AMO	E	1 (3,3)	0,43335
CFO, OXA	F	2 (6,7)	0,47335
	A	1 (3,3)	
	C	1 (3,3)	
	I	1 (3,3)	

Tabela 3: Resistência aos Beta-lactâmicos apresentada em isolados de *Staphylococcus aureus* detectados em mastite subclínica em fazendas do Norte de Minas Gerais – Brasil

FAZENDAS	RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS			
	AMO	OXA	CFO	MER
A	5	6	6	0
B	3	7	7	4
C	3	4	5	0
D	6	3	3	1
E	5	1	3	0
F	1	4	4	1
G	0	2	2	2
H	0	1	0	1
I	0	1	0	0
J	1	0	0	0
K	2	0	0	0
L	1	0	0	0
p valor	0,03776	0,006414	0,002113	0,02709

4.2 Artigo publicado na revista **Veterinary World**

SOUZA, G. A. A. D., ALMEIDA, A. C., XAVIER, M. A. S., SILVA, L. M. V., SOUSA, C. N., SANGIARD, D. A., XAVIER, A. R. E. O. Characterization and molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* strains resistant to beta-lactams isolated from the milk of cows diagnosed with subclinical mastitis. **Veterinary World**, v. 12, n.12, p. 1931-1939, 2019. doi: www.doi.org/10.14202/vetworld.2019.1931-1939.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A resistência bacteriana na produção animal é um desafio crescente. Isolados de quatro fazendas se mostraram resistentes ao meropenem e isto é motivo de preocupação, visto que carbapenêmicos não são usados em animais de produção. Além disso, este tipo de resistência em *Staphylococcus aureus* ainda não é relatado na literatura. Os genes testados para carbapenêmicos neste estudo *bla_{OXA23}* e *bla_{KPC}*, que são os mais frequentes na literatura, não se mostraram presentes em nenhum dos isolados.

Os genes *mecA* e *bla_Z* se mostraram presentes em alguns isolados, coincidindo sua ocorrência algumas vezes e sendo o *bla_Z* com maior frequência que o gene *mecA*. Ainda assim, alguns isolados resistentes a penicilinas não amplificaram nenhum desses genes, nem o gene *mec_{ALGA-251}*, indicando que possa ter outro gene ou variante envolvido nesse mecanismo de resistência.

São necessários maiores investimentos em controle de qualidade microbiológico, de modo que além de controlar a transferência de clones microbianos, possa-se controlar também a disseminação de suas resistências. Pesquisas voltadas para o desenvolvimento de novos antimicrobianos devem ser incentivadas.

ANEXO – APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado "Epidemiologia molecular de Staphylococcus sp isolados de mastite bovina resistentes aos beta-lactâmicos ", protocolo do CEUA: 90/2018 sob a responsabilidade de Anna Christina de Almeida 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) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 21/05/2018.

Vigência da Autorização	21/05/2018 a 20/05/2023
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Bovino / holandesa e ou mestiços
Nº de animais	504
Peso/Idade	500kg / 3(anos)
Sexo	feminino
Origem	Fazendas da região norte de Minas Gerais

Considerações posteriores:

21/05/2018	Aprovado na reunião do dia 21/05/2018. Validade: 21/05/2018 à 20/05/2023
------------	--

Belo Horizonte, 30/07/2018.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceuaf

Universidade Federal de Minas Gerais
 Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
 Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
 Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - ceua@prpq.ufmg.br