

***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

DOI:10.34117/bjdv6n12-340

Recebimento dos originais:09/11/2020

Aceitação para publicação:15/12/2020

Geziella Aurea Aparecida Damasceno Souza

Mestra em Produção Animal

Universidade Federal de Minas Gerais - Instituto de Ciências Agrárias

Endereço: Avenida Universitária, n° 100, Bairro Universitário. CEP: 39404-547. Montes

Claros- MG- Brasil

E-mail: geziella.ufmg@gmail.com

Carolina Magalhães Caires Carvalho

Doutora em Ciências Veterinárias

Universidade Federal de Minas Gerais - Instituto de Ciências Agrárias

Endereço: Avenida Universitária, n° 100, Bairro Universitário. CEP: 39404-547. Montes

Claros- MG- Brasil

E-mail: carollcaires@yahoo.com.br

Ester Dias Xavier

Graduanda em Zootecnia

Universidade Federal de Minas Gerais - Instituto de Ciências Agrárias

Endereço: Avenida Universitária, n° 100, Bairro Universitário. CEP: 39404-547. Montes

Claros- MG- Brasil

E-mail: exavier63@gmail.com

Laura Francielle Ferreira Borges

Graduanda em Engenharia de Alimentos

Universidade Federal de Minas Gerais - Instituto de Ciências Agrárias

Endereço: Avenida Universitária, n° 100, Bairro Universitário. CEP: 39404-547. Montes

Claros- MG- Brasil

E-mail: lauraborges4@outlook.com

Samuel Ferreira Gonçalves

Mestrando em Zootecnia – Qualidade e Produtividade Animal

Universidade de São Paulo

Endereço: Av. Duque de Caxias Norte, 225 - 13635-900 – Pirassununga, SP

E-mail: samuelfgoncalves1@gmail.com

Anna Christina de Almeida

Doutora em Ciência Animal

Universidade Federal de Minas Gerais - Instituto de Ciências Agrárias

Endereço: Avenida Universitária, n° 100, Bairro Universitário. CEP: 39404-547. Montes Claros- MG- Brasil

E-mail: annachristinadealmeida@gmail.com

RESUMO

Staphylococcus aureus é o patógeno mais ocorrente em mastite bovina. A resistência a meticilina é preocupante em produção animal e aos carbapenêmicos é ainda pouco descrita na literatura em relação a esta bactéria. O objetivo deste estudo foi averiguar a frequência de *Staphylococcus aureus* em mastite bovina subclínica em fazendas do norte de Minas e determinar a sensibilidade aos Beta-lactâmicos. Para isso, foi procedido o *California Mastitis Test* e coletadas amostras de leite dos tetos subclínicos. Realizou-se semeadura em ágar sangue e identificação microbiana por MALDI-TOF. Foi testada por difusão em disco a suscetibilidade dos *Staphylococcus aureus* aos antimicrobianos amoxicilina, oxacilina, ampicilina/sulbactam, cefoxitina, imipenem e meropenem. Como resultado, foram detectados 214 microrganismos, 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 e 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: Mastite, Bovino, Pecuária, Antibiograma.**ABSTRACT**

Staphylococcus aureus is the most common pathogen in bovine mastitis. Resistance to methicillin is of concern in animal production and carbapenems are still poorly described in the literature in relation to this bacterium. The aim of this study was to investigate the frequency of *Staphylococcus aureus* in subclinical bovine mastitis in farms in the north of Minas Gerais and to determine the sensitivity to beta-lactams. For this, the California Mastitis Test was performed and milk samples were collected from subclinical teats. It was performed sown on blood agar and then microbial identification by MALDI-TOF. The susceptibility of *Staphylococcus aureus* to the antimicrobials amoxicillin, oxacillin, ampicillin / sulbactam, cefoxitin, imipenem and meropenem was tested by disk diffusion. As a result, 214 microorganisms were detected, with *Staphylococcus* being the most frequent genus (N = 146) and, of these, 79 were of the *aureus* species. Among *Staphylococcus aureus*, 30 (37.9%) isolates were resistant to cefoxitin and the rest (62.1%) sensitive to the drug. In relation to oxacillin sensitivity test, 29 (36.7%) were resistant. There were amoxicillin resistance in 27 isolates (34.2%) and meropenem resistance in 9 (11.4%). There was a significant association between resistance and farm of origin of the isolates.

Keywords: Mastitis, Cattle, Animal Husbandry, Microbial Sensitivity Test.

1 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), redução da produtividade e gastos extras com tratamento. Requer cuidados para evitar transmissão para outras fêmeas leiteiras por meio dos equipamentos de ordenha (SARTORI *et al.*, 2018; LOCATELLI *et al.*, 2017) e também 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, cefoxitina e/ou oxacilina (LOCATELLI *et al.*, 2017; HACHIYA, 2017; WETERINGS, 2017), porque a meticilina seria uma droga de escolha em animais de produção contra cepas produtoras de penicilinas. No Brasil, relatos na literatura de MRSA em isolados de leite com mastite ainda são escassos.

Já os carbapenêmicos como imipenem e meropenem não são medicamentos usualmente utilizados em produção animal. Eles são um dos fármacos mais poderosos para tratamento de infecções bacterianas (WHO, 2019), sendo ainda considerados 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. 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.

2 MÉTODOS

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 (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 de leite foram semeadas por esgotamento em ágar sangue ovino (DAMASCENO; SILVA; SANTOS, 2020) utilizando alça microbiológica calibrada de 10µL. Após semeadura, as placas foram incubadas em estufa de crescimento microbiano durante 24 horas a 37 °C ±2. As colônias foram isoladas em Plate Count Agar, foi realizada coloração de Gram e identificação 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.

3 RESULTADOS

Ao todo, 214 micro-organismos foram identificados, cuja frequência, percentual e variedade estão apresentados na tabela 1. Desses microrganismos, 184 foram Gram positivos referentes aos gêneros *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Corynebacterium* e *Lactococcus*. Houve 29 Gram negativos, referentes aos gêneros *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Escherichia*, *Stenotrophomonas* e *Achromobacter*. Também foi detectado um fungo da espécie *Candida rugosa*. Dentre todos os micro-organismos detectados, gênero mais predominante foi *Staphylococcus* e a espécie *aureus*.

Tabela 1: Microrganismos detectados em mastite bovina subclínica no norte de Minas Gerais - Brasil

Microrganismo		
Gênero	Espécie	Frequência: N (%)
<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	79 (36,9%)
	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	27 (12,6%)
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	13 (6,0%)
	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	6 (2,8%)
	<i>Staphylococcus sciuri</i>	6 (2,8%)
	<i>Staphylococcus auricularis</i>	4 (1,8%)
	<i>Staphylococcus xylosus</i>	4 (1,8%)
	<i>Staphylococcus hyicus</i>	3 (1,4%)
	<i>Staphylococcus captis</i>	2 (0,9%)
	<i>Staphylococcus hominis</i>	1 (0,5%)
	<i>Staphylococcus warneri</i>	1 (0,5%)
<i>Enterococcus</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	15 (7,0%)
	<i>Enterococcus faecalis</i>	10 (4,7%)
<i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter schindleri</i>	6 (2,8%)
	<i>Acinetobacter spp.</i>	2 (0,9%)
	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	1 (0,5%)
<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>	8 (3,7%)
<i>Enterobacter</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	3 (1,4%)
	<i>Enterobacter aesburiae</i>	3 (1,4%)
<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4 (1,8%)
	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	1 (0,5%)

<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus cereus</i>	1 (0,5%)
	<i>Bacillus licheniformis</i>	1 (0,5%)
	<i>Bacillus pumilus</i>	1 (0,5%)
<i>Alcaligenes</i>	<i>Alcaligenes faecalis</i>	3 (1,4%)
<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia coli</i>	3 (1,4%)
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>Stenptrophomonas maltophilia</i>	1 (0,5%)
	<i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i>	1 (0,5%)
<i>Achromobacter</i>	<i>Achromobacter insolitus</i>	1 (0,5%)
<i>Corynebacterium</i>	<i>Corynebacterium bovis</i>	1 (0,5%)
<i>Lactococcus</i>	<i>Lactococcus garvieae</i>	1 (0,5%)
<i>Candida</i>	<i>Candida rugosa</i>	1 (0,5%)

Fonte: Elaborado Pelos autores

O perfil de suscetibilidade dos *Staphylococcus aureus* frente aos antimicrobianos testados está apresentado na Tabela 2. Os isolados resistentes a oxacilina também foram resistentes a cefoxitina, sendo 30 (37,9%) os *S. aureus* considerados meticilina resistentes (MRSA).

Tabela 2: Suscetibilidade de *Staphylococcus aureus* detectados em mastite bovina subclínica frente aos Beta-lactâmicos

Antimicrobiano	Sensível	Intermediário	Resistent e
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%)

Fonte: Elaborado pelos autores

Na tabela 3, os isolados de *S. aureus* estão agrupados conforme as resistências apresentadas por cada um deles e os micro-organismos com os mesmo tipos de resistências estão estratificados pelas fazendas de origem das amostras.

Tabela 3: Perfil de resistência aos Beta-lactamicos em isolados de *Staphylococcus aureus* mastíticos no norte de Minas Gerais- Brasil.

FENÓTIPOS DE RESISTÊNCIA		Fazend as	N (%)	P-valor
AMO	CFO, OXA,	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)	
CFO, OXA, 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	CFO, OXA	F	2 (6,7)	0,47335
		A	1 (3,3)	
		C	1 (3,3)	
		I	1 (3,3)	

Fonte: Elaborado pelos autores

Já a tabela 4 mostra o resultado da frequência de cada resistência que foi detectada nos micro-organismos. Essas resistências são estratificadas pelas fazendas de origem dos isolados.

Tabela 4: Resistência aos Beta-lactâmicos detectada em *Staphylococcus aureus* mastíticos

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

Fonte: Elaborado pelos autores

4 DISCUSSÃO

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 de *Staphylococcus aureus* N=79 (36,9% conforme FIGURA 1) 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 o quarto patógenos mais frequentes neste estudo, também mostraram relevância dentre os isolados 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, como segundo e terceiro patógenos mais frequentes.

Já a terceira espécie mais ocorrente neste estudo, *Enterococcus faecium* (7%), também foi detectado em maior predominância entre os isolados deste gênero nos estudos de Rozanska *et al* (2019). O percentual obtido por Rozanska *et al* (2019) para *Enterococcus* spp. mastíticos alcançou 21,3%. Quanto aos *Staphylococcus* não-aureus, Keikkla *et al.* (2018) obteve uma ocorrência de 46% entre os patógenos mastíticos. Comparados com os 31,1% encontrados neste estudo, em ambos os casos, o somatório das espécies de *Staphylococcus* não-aureus alcançou maior percentual após os *S. aureus* em mastite bovina.

Os gêneros *Streptococcus*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Lactococcus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Alcaligenes* e *Stenotrophomonas* que obtiveram participação pouco frequente entre os isolados deste estudo, também estão citados na literatura como patógenos em

infecções intramamárias bovinas (HEIKKILA et al., 2018; SUMON et al., 2020). Gêneros como *Achromobacter* e *Acinetobacter* são mais raramente encontrados. O fungo *Candida rugosa* já foi reportado na literatura como patógeno em mastite persistente (SCACCABAROZZI et al., 2011). *Stenotrophomonas maltophilia* que além de ser patógeno mastítico é causador de enterite, já foi reportado em queijo (OKUNO, 2018).

Quanto ao antibiograma, o percentual de resistência a meticilina nos *Staphylococcus aureus* foi superior aos 27,7% obtidos por HAMID et al. (2017). Em relação 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.

O fato de a resistência ao meropenem 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 um dos poucos relatos nesta espécie de bactéria, indicando necessidade de estudos posteriores. Devido a essa resistência também ser observada em cepas resistentes a meticilina (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 microrganismos 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 (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).

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.

5 CONCLUSÃO

Staphylococcus aureus se mostra o patógeno mais frequente em mastite bovina subclínica em fazendas do norte de Minas Gerais. A resistência a metilina e ao meropenem vem surgindo como agravante ao problema relacionado a esses patógenos. Cada vez mais, as bactérias vão adquirindo novas formas de resistência. Um novo normal com padrões mais rígidos de controle microbiano deverão ser implantados.

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.
- DAMASCENO, V. S; SILVA, F. M.; SANTOS, H. C. A. S. Análise do perfil microbiológico de agentes causadores de mastite bovina e sua relação com a qualidade do leite em uma fazenda do Sul de Minas Gerais. **Brazilian Journal of Development**, vol. 6, n. 11, p. 91409-91421, Nov. 2020. Available from: <<https://www.brazilianjournals.com/index.php/BRJD/article/view/20386>>. Accessed: Nov, 26.2020. Doi: 10.34117/bjdv6n11-522.
- 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 *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, 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.

HACHIYA, J. O. *et al.* Methicillin-resistant *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.

HEIKKILA, A.; LISKI, E; PYORALA, S. *et al.* Pathogen-specific production losses in bovine mastitis. **Journal of Dairy Science**, v.101, n.10, p.9493-9504, Oct. 2018. Disponível em: <<https://www.journalofdairyscience.org/action/showPdf?pii=S0022-0302%2818%2930752-5>>. Acesso Jul 22, 2020. DOI: 10.3168/jds.2018-14824.

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.
- OKUNO, N.; FREIRE, I. SEGUNDO, R. et al. Polymerase Chain Reaction Assay for Detection of *Stenotrophomonas maltophilia* in Cheese Samples Based on the *smeT* Gene. **Current Microbiology**, v.75, n. 12, p.1555-1559. 2018. Disponível em: <<https://cutt.ly/Va3kZNK>>. Acesso Jul 22, 2020. doi: 10.1007/s00284-018-1559-0.
- 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.
- ROZANSKA, H.; LEWTAK-PILAT, A.; KUVAJKA, M. et al. Occurrence of Enterococci in Mastitic Cow's Milk and their Antimicrobial Resistance. **Journal of veterinary research**, v. 63,

n. 1, p.93-97. March 2019. Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6458559/>>. Acesso Jul, 22 2020.
DOI:10.2478/jvetres-2019-0014.

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**, v. 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.

SCACCABAROZZI, L.; LOCATELLI, C.; PISONI, G. *et al.* Short communication: epidemiology and genotyping of *Candida rugosa* strains responsible for persistent intramammary infections in dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 94, n. 9, p.4574-7. September 2011. Disponível em: <<https://cutt.ly/Na3u2lS>>. Acesso Jul 22, 2020. DOI: 10.3168/jds.2011-4294.

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.

SUMON, S. M. M. R.; PARVIN, M. S.; EHSAN, M. A. *et al.* Dynamics of somatic cell count and intramammary infection in lactating dairy cows. **Journal of Advanced Veterinary and Animal Research**, v. 7, n. 2, p.314-319. Apr 2020. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7320813/>>. Acesso em Jul, 22. 2020. DOI: 10.5455/javar.2020.g423.

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, 2017). Model list of essential medicines. 20th list (March 2017). Geneva: World Health Organisation; 2017. Available from: <https://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/en/>. Accessed Nov, 20. 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO, 2019). Implementation manual to prevent and control the spread of carbapenem-resistant organisms at the national and health care facility level. Geneva: World Health Organization; 2019. Available from: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/312226/WHO-UHC-SDS-2019.6-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y> . Accessed Nov, 20. 2020.

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 Aug 07 2020. doi: 10.1128/AAC.02100-17.