

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

DISSERTAÇÃO

***STAPHYLOCOCCUS*-METICILINA-RESISTENTE EM AMBIENTE DE
PRODUÇÃO LEITEIRA – UMA ABORDAGEM DE SAÚDE ÚNICA**

MARCELA BARLETTE MENDES

2024



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

***STAPHYLOCOCCUS*-METICILINA-RESISTENTE EM AMBIENTE DE
PRODUÇÃO LEITEIRA – UMA ABORDAGEM DE SAÚDE ÚNICA**

MARCELA BARLETTE MENDES

Sob a orientação da professora
Miliane Moreira Soares de Souza

e Co-orientação das professoras
Dayanne Araújo de Melo
Shana de Mattos de Oliveira Coelho

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Seropédica, RJ
Agosto de 2024

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M538s Mendes, Marcela Barlette, 1996-
 Staphylococcus-meticilina-resistente em ambiente
de produção leiteira - uma abordagem de saúde única /
Marcela Barlette Mendes. - Vilhena, 2024.
 58 f.: il.

 Orientadora: Miliane Moreira Soares Souza.
 Coorientador: Dayanne Araújo Melo.
 Coorientador: Shana de Mattos de Oliveira Coelho.
 Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias, 2024.

 1. Microbiologia veterinária. 2. Resistência
antimicrobiana. 3. Bovinocultura leiteira. 4. Saúde
Única. I. Souza, Miliane Moreira Soares, 1970-,
orient. II. Melo, Dayanne Araújo, -, coorient. III.
Coelho, Shana de Mattos de Oliveira, -, coorient. IV
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. V.
Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



ATA N° 3711/2024 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

N° do Protocolo: 23083.045558/2024-22

Seropédica-RJ, 27 de agosto de 2024.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

MARCELA BARLETTE MENDES

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestra** em Ciências,
no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 23/08/2024

(Assinado digitalmente em 29/08/2024 12:09)

MILIANE MOREIRA SOARES DE SOUZA

PRO-REITOR(A)

PROGEP (12.28.01.09)

Matrícula: ###124#8

(Assinado digitalmente em 28/08/2024 08:15)

BRUNO GOMES DE CASTRO

ASSINANTE EXTERNO

CPF: ###.###.817-##

(Assinado digitalmente em 05/09/2024 20:32)

FELIPE CARLOS DUBENCZUK

ASSINANTE EXTERNO

CPF: ###.###.100-##

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: 3711, ano: 2024,
tipo: ATA, data de emissão: 27/08/2024 e o código de verificação: 3fab4d32af

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais por me permitirem vivenciar essa experiência.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me permitir alcançar mais essa conquista.

À minha família, a base que me guiou até aqui e me manteve firme no propósito.

À minha orientadora Dra. Miliane Moreira Soares de Souza, por proporcionar essa oportunidade, pelo cuidado, carinho e por todos os ensinamentos compartilhados ao longo desses anos.

À equipe do LABACVET, em especial ao Caio Simões, Dra. Dayanne Melo, Me. Letícia Pinto, Me. Mario Makita, Paulo Roberto, Dra. Thérèse Holmström e todos os outros membros do grupo, por me auxiliarem em todas as etapas deste trabalho.

Ao meu professor, orientador e amigo Dr. Bruno Gomes de Castro, por fazer parte de mais uma realização pessoal minha.

Às professoras Dra. Dayanne Melo e Dra. Shana de Mattos de Oliveira Coelho, por aceitarem ser minhas co-orientadoras.

Ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRRJ, pela oportunidade e fomento em materiais e estrutura recebida para o desenvolvimento do trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos, possibilitando as condições necessárias para a realização do experimento.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

MENDES, Marcela B. ***Staphylococcus-meticilina-resistente em ambiente de produção leiteira – uma abordagem de saúde única***. 2024. 57 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2024.

A bovinocultura leiteira representa uma das principais fontes de renda e geração de empregos do setor agropecuário brasileiro, sendo marcada por acentuada heterogeneidade tanto em relação aos sistemas de produção quanto ao perfil dos rebanhos e de produtores. O status sanitário de um rebanho leiteiro é essencial dentro da cadeia de produção, em que a maior dificuldade enfrentada pelos produtores é a mastite. Sua etiologia é atribuída tanto a agentes ambientais quanto contagiosos, sendo as bactérias do gênero *Staphylococcus* a causa mais comum entre todos os casos e amplamente distribuída pelo mundo. O setor de produção animal se torna crucial na propagação tanto de patógenos quanto de genes de resistência, sendo a administração de antimicrobianos como promotores de crescimento e profiláticos a principal via de pressão seletiva sobre a microbiota animal e ambiental. Considerando-se o significativo risco mediante quadros infecciosos e os embargos econômicos implicados, a OMS declarou a resistência antimicrobiana uma ameaça substancial a saúde global. O objetivo deste trabalho foi avaliar a prevalência de espécies do gênero *Staphylococcus* e o perfil fenogenotípico de resistência antimicrobiana frente à classe dos beta-lactâmicos mediada pelo gene *mecA* a partir isolados obtidos de amostras de leite bovino coletados em propriedades no sul do estado de Rondônia e da região Sudeste, incluindo a Baixada Fluminense e propriedades localizadas na divisa com os estados de São Paulo e Minas Gerais, assim como avaliar o perfil higiênico-sanitário destas propriedades rurais. A amostragem abrangeu 127 amostras de leite, as quais foram submetidas a identificação fenotípica utilizando Ágar Manitol Vermelho de Fenol, teste de coagulase em tubo e resistência a bacitracina 0,04UI, e identificação proteômica por MALDI-TOF. A caracterização da resistência foi realizada pela técnica de difusão em disco usando cefoxitina, oxacilina e penicilina, e a detecção do gene *mecA* através de PCR. O levantamento do perfil higiênico-sanitário das propriedades foi feito pela aplicação de questionário durante a coleta das amostras. Os resultados obtidos demonstraram prevalência de aproximadamente 58% de *S. aureus*, frente a cerca de 42% de espécies de ECN. A resistência antimicrobiana fenotípica foi observada apenas em 35% dos isolados resistentes a penicilina, sendo que destes aproximadamente 43% foram provenientes da região Norte e 57% da região Sudeste. Dentre estes, foi confirmada a presença do gene *mecA* em cerca de 20% dos isolados, apresentando prevalência de 15% e 25% para as regiões Norte e Sudeste, respectivamente. Os resultados obtidos proporcionaram a comparação do perfil de resistência dos isolados e perfil higiênico-sanitário das propriedades incluídas no estudo. Desta forma, fica evidente a necessidade de abordagens direcionadas a atender as particularidades de cada região, sendo indispensáveis estudos mais profundos acerca do tema.

Palavras-chave: Bovinocultura leiteira, Resistência Antimicrobiana, Saúde Única.

ABSTRACT

MENDES, Marcela B. **Methicillin-resistant *Staphylococcus* in dairy production environment – a One Health approach.** 2024. 57 p. Dissertation (Master's in Veterinary Sciences). Veterinary Institute, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2024.

Dairy production represents one of the main sources of income and job opportunities in the Brazilian agribusiness sector, characterized by significant heterogeneity both in production systems and in the profiles of herds and producers. The sanitary status of a dairy herd is essential within the production chain, with mastitis being the primary challenge faced by producers. Its etiology is attributed to both environmental and contagious agents, with bacteria of the genus *Staphylococcus* being the most common cause and widely distributed around the world. The animal production sector plays a crucial role in the spread of both pathogens and resistance genes, with the use of antimicrobials as growth promoters and prophylactics being the main selective pressure on the animal and environmental microbiota. Given the significant risk posed by infectious outbreaks and the economic impacts involved, the WHO has declared antimicrobial resistance a substantial threat to global health. This study aimed to assess the prevalence of *Staphylococcus* species and the phenotypic-genotypic profile of antimicrobial resistance against beta-lactam classes mediated by *mecA* gene from isolates obtained from bovine milk samples collected in properties in the southern state of Rondônia and Southeast region, including Baixada Fluminense and properties located on the border with the states of São Paulo and Minas Gerais, as well as the hygienic-sanitary profiles of the producers. The sampling covered 127 milk samples, which were subjected to phenotypic identification using AMVF, tube coagulase test, and resistance to 0.04 UI bacitracin, and proteomic identification by MALDI-TOF. Resistance characterization was performed using the disk diffusion method with cefoxitin, oxacillin, and penicillin, and the detection of *mecA* gene through PCR. The hygienic-sanitary profile of the properties was assessed through a questionnaire administered during sample collection. The results showed a prevalence of approximately 58% of *S. aureus* compared to about 42% of coagulase-negative staphylococci (CNS). Phenotypic antimicrobial resistance was observed in only 35% of penicillin-resistant isolates, with approximately 43% of these coming from the Northern region and 57% from the Southeastern region. Among these, the presence of the *mecA* gene was confirmed in about 20% of the isolates, with a prevalence of 15% and 25% in the Northern and Southeastern regions, respectively. The results allowed for a comparison of the resistance profile of the isolates with the hygienic-sanitary profiles of the properties included in the study. Thus, it is evident that targeted approaches addressing the particularities of each region are necessary, with further in-depth studies on the topic being indispensable.

Keywords: Dairy Production, Antimicrobial Resistance, One Health.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- quantidade total de isolados identificados fenotipicamente como ECP e ECN, associado a respectiva região em que foram coletados.	37
Gráfico 2 - proporção de cepas identificadas pelo MALDI-TOF de acordo com a espécie.	38
Gráfico 3 - proporção de espécies identificadas de acordo com a origem das amostras no estado de Rondônia.	39
Gráfico 4 - proporção de espécies identificadas de acordo com a origem das amostras na região sudeste.	40
Gráfico 5 - porcentagem das espécies com maior prevalência dentre todos os isolados identificados.	41
Gráfico 6 - número de isolados resistentes à penicilina em relação ao total de isolados identificados conforme a espécie.	43
Gráfico 7 - quantidade de isolados identificados com resistência fenotípica à penicilina total e de acordo com a região de coleta das amostras.	43
Gráfico 8 – Porcentagem de isolados em que foi detectada a presença do gene <i>mecA</i> universal de acordo com a espécie.	45

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- animais com higienização dos tetos já realizada para início do processo de coleta em propriedade localizada no município de Vilhena-RO (A) e Seropédica-RJ (B). 31
- Figura 2- crescimento de *Staphylococcus* spp. em Ágar Manitol Vermelho de Fenol fermentador (A) e não fermentador (B). 32
- Figura 3- crescimento de *Staphylococcus* sp. em ágar Mueller Hinton (AMH) resistente à bacitracina 0,04 UI. 33
- Figura 4- prova da coagulase apresentando resultado positivo (A) e negativo (B). 33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Número de amostras coletadas por propriedade.	31
Tabela 2- Provas fenotípicas utilizadas para diferenciação e identificação fenotípica de <i>Staphylococcus</i> spp.	33
Tabela 3 – Correlação entre a identificação fenotípica e a identificação proteômica.	39

LISTA DE ABREVIACÕES

AMH	Ágar Mueller Hinton
AMVF	Ágar Manitol Vermelho de Fenol
ATCC	American type culture collection (Coleção americana de culturas)
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CFO	Cefoxitina
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute (Instituto Clínico e Laboratório de padronização)
CCS	Contagem de células somáticas
CMT	<i>California Mastitis Test</i>
COVID-19	doença do coronavírus 2019
CPP	Contagem padrão em placa
DNA	ácido desoxirribonucleico
ECN	Estafilococos coagulase negativa
ECP	Estafilococos coagulase positiva
ESBL	β -lactamases de espectro estendido
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
LABAC-VET	Laboratório de Bacteriologia Veterinária
LIMM	Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica
MALDI-TOF	Tempo de Voo de Ionização-Desorção por Laser Assistida por Matriz
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MDR	Multidroga-resistente
MLST	Tipagem da Sequência Multilocus
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> metilina-resistente
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
OMS	Organização Mundial de Saúde
OXA	Oxacilina
PAN-BR	Plano de Ação Nacional Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos
PAN-BR Agro	Plano de Ação Nacional Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no âmbito da Agropecuária
PBP	Proteína Ligante de Penicilina
PCR	Reação em Cadeia Polimerase
PEN	Penicilina G
PFGE	Eletroforese em Gel de Campo Pulsado
PIB	Produto Interno Bruto
POL	Polimixina B
RAM	Resistência antimicrobiana
RIISPOA	Regulamentação de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
SIF	Serviço de Inspeção Federal
SSC _{mec}	cassete cromossômico estafilocócico <i>mec</i>
TLR	Toll-like receptor
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
UFRRJ	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
VRE	<i>Enterococcus faecium</i> resistente à vancomicina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
	2.1 Panorama da Pecuária Leiteira Nacional	17
	2.2 Pecuária Leiteira de Rondônia	18
	2.3 Pecuária Leiteira da região Sudeste	19
	2.4 Mastite Bovina	20
	2.4.1 Mastite clínica	21
	2.4.2 Mastite subclínica	21
	2.4.3 Mastite ambiental	22
	2.4.3 Mastite contagiosa	22
	2.5 Resistência Antimicrobiana	23
	2.5.1 Fatores associados a emergência e disseminação da resistência antimicrobiana	24
	2.5.2 <i>Staphylococcus aureus</i> Meticilina Resistente (MRSA)	26
	2.6 Impacto da Resistência Antimicrobiana no Âmbito de Saúde Única	27
3	OBJETIVOS	30
4	MATERIAL E MÉTODOS	31
	4.1 Amostragem	31
	4.2 Isolamento	32
	4.3 Identificação fenotípica	32
	4.4 Identificação proteômica (MALDI-TOF)	34
	4.5 Análise fenotípica de resistência antimicrobiana	35
	4.5.1 Padronização do inóculo e metodologia	35
	4.5.2 Detecção fenotípica de resistência aos beta-lactâmicos em <i>Staphylococcus</i> spp.	35
	4.6 Análise genotípica de resistência antimicrobiana	35
	4.6.1 Extração de DNA pela técnica de lise térmica	35
	4.6.2 Preparo de reação para detecção dos genes por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)	35
	4.6.3 Detecção genotípica de resistência aos beta-lactâmicos em <i>Staphylococcus</i> spp.	36
	4.7 Aplicação de questionário técnico	36
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
6	CONCLUSÃO	51
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
	ANEXO	60

1 INTRODUÇÃO

O agronegócio brasileiro é atualmente um dos pilares que impulsiona a economia do país. A bovinocultura leiteira detém uma parcela significativa da produção do setor, estando presente em todos os estados do território nacional. Apesar de apresentar índices de produtividade não tão satisfatórios, a produção de leite brasileira está na quarta posição do ranking mundial. O estado de Rondônia tem sua base econômica na produção agropecuária e a terceira maior produção leiteira da região Norte. Quase em sua totalidade, as propriedades produtoras de leite são de origem familiar e baixa tecnificação. Já a produção da região Sudeste é a segunda maior do país, estando atrás somente da região Sul, e apresenta elevada heterogeneidade dentro da cadeia de produção.

O status sanitário de um rebanho leiteiro é essencial dentro da cadeia de produção, sendo que a maior dificuldade enfrentada pelos produtores é a mastite, enfermidade que ocasiona extensos prejuízos econômicos e significativa redução da qualidade da matéria-prima. O impacto desta doença se estende à saúde pública dado o potencial de transmissão de patógenos e toxinas via alimentação, além da veiculação de resíduos de antimicrobianos através do leite. A etiologia geralmente é atribuída a agentes infecciosos, sendo bactérias do gênero *Staphylococcus* mais comum entre todos os casos e amplamente distribuída pelo mundo.

A resistência bacteriana a antimicrobianos é um processo de adaptação e seleção natural dos microrganismos. Nas últimas décadas, o uso indiscriminado e em larga escala de substâncias antimicrobianas, naturais, sintéticas ou semissintéticas, é a principal causa da emergência de bactérias resistentes e disseminação de genes de resistência. A pressão de seleção determinada pela presença massiva dos antimicrobianos tem efeito sobre a microbiota humana e animal, e consequentemente sobre a microbiota ambiental, o que infere na modificação dos resistomas de múltiplos ambientes.

Nesse sentido, o setor de produção animal se torna crucial na propagação tanto de patógenos quanto genes de resistência. Sendo a administração de antimicrobianos, como promotores de crescimento e profiláticos, a principal via de pressão seletiva sobre a microbiota animal, além da interação entre estes e outros micro-ecossistemas e o compartilhamento de material genético. Não menos importante, a contaminação do ambiente com resíduos e metabólitos ativos de antimicrobianos, desinfetantes e metais pesados possivelmente induz ao mesmo fenômeno, tendo efeito seletivo sobre o microbioma natural ambiental.

Considerando-se o significativo risco mediante quadros infecciosos e os embargos econômicos implicados, a Organização Mundial de Saúde (OMS) declarou a resistência antimicrobiana uma ameaça substancial à saúde global. Sob a perspectiva do conceito de Saúde Única, a abordagem diante deste cenário deve ser direcionada a impulsionar a saúde em todos os âmbitos, sendo eles humano, animal e ambiental.

Quanto às ações nacionais relacionadas a essa problemática, encontram-se em vigor o Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos (PAN-BR) e Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no âmbito da Agropecuária (PAN-BR Agro); planos governamentais que visam a redução do uso de antimicrobianos a longo prazo na medicina humana e no setor agropecuário.

Diante deste contexto, se fazem necessários estudos que permitam o monitoramento de ambientes críticos quanto à emergência e disseminação de bactérias e genes de resistência antimicrobiana, bem como melhor entendimento em relação à dinâmica de transferência de genes responsáveis por esses mecanismos entre microrganismos de nichos diversos e o efeito que moléculas com potencial antimicrobiano tem causado em microbiomas humano, animal e ambiental.

Diante do atual cenário, objetivou-se com este estudo avaliar a prevalência de espécies do gênero *Staphylococcus* e o perfil fenogenotípico de resistência antimicrobiana frente à classe dos beta-lactâmicos mediada pelo gene *mecA* a partir isolados obtidos de amostras de leite bovino coletado em propriedades localizadas no sul do estado de Rondônia, e na região Sudeste, localizadas na Baixada Fluminense do Rio de Janeiro e na divisa com os estados de São Paulo e Minas Gerais, bem como o perfil higiênico-sanitário das propriedades visitadas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Panorama da Pecuária Leiteira Nacional

O agronegócio é o setor que lidera a economia brasileira, responsável por um terço do produto interno bruto (PIB) (Vilela *et al.*, 2016). Inserida neste ramo, a bovinocultura leiteira representa uma das principais fontes de renda e geração de empregos do setor (Almeida e Bacha, 2021; Ferrazza e Castellani, 2021). Distribuída por todo território nacional, é marcada por sua heterogeneidade tanto em relação aos sistemas de produção quanto ao perfil dos rebanhos e de produtores (Ferrazza e Castellani, 2021).

Em todo o país são observados sistemas de produção com o emprego de programas de rotina e equipamentos modernos, bem como modelos tradicionais de manejo e sistemas rústicos (Ragazzi *et al.*, 2020). Segundo dados do IBGE, existiam em 2006 1,35 milhão de estabelecimentos produtores de leite, representando 25% das propriedades rurais nacionais. Além disso, está entre uma das principais atividades praticadas por pequenos e médios produtores, exercendo papel social fundamental (Vilela *et al.*, 2016).

De acordo com o levantamento realizado por Ferrazza e Castellani (2021), o número de propriedades leiteiras no Brasil caiu para 1,18 milhões em 2017, indicando uma queda de 12,92%. Entretanto, o volume de 30 bilhões de litros de leite produzido neste mesmo ano representou um crescimento de 46,62% em relação a aproximadamente uma década atrás.

Em 2019, a produção mundial de leite bovino alcançou a marca de 852 milhões de toneladas, especialmente devido ao aumento da produção de alguns países como Índia, Paquistão e Brasil (Silva e Filho, 2020). Atualmente, o país se encontra na terceira posição do ranking mundial de produção de leite, estando atrás somente de Estados Unidos e Índia (FAO, 2022).

Dados demonstram que a atividade leiteira do Brasil obteve um crescimento de 391% de 1974 a 2019, passando de 7,1 bilhões para 34,8 bilhões de litros produzidos, com um rebanho de 16,2 milhões de vacas ordenhadas (Almeida *et al.*, 2022). Em 2021, estima-se que a produção tenha atingido cerca de 35,3 bilhões de litros (IBGE, 2022).

Quanto ao leite inspecionado, em 2021 foram produzidos 25,02 bilhões de litros em 2021, cerca de 2,3% a menos que em 2020, onde o volume alcançado foi de 25,53 bilhões de litros (EMBRAPA, 2022). Tal déficit de produção pode ser atribuído às dificuldades encontradas em decorrência da crise econômica instalada pela pandemia da Covid-19, período em que houve adoção de políticas restritivas que impactaram negativamente no mercado mundial (EMBRAPA, 2022; Silva e Filho, 2020).

Em 2022 foi registrada produção de 34,6 bilhões de litros de leite, com ênfase para os estados de Minas Gerais, Goiás, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Desse montante, cerca de 23,8 bilhões de litros abrangeu leite inspecionado. Já em 2023, observou-se aumento da produção formal, em torno de 24,5 bilhões de litros de leite. Vale ressaltar que as dez maiores mesorregiões leiteiras somam mais de 40% de toda a produção nacional (EMBRAPA, 2024).

Apesar dos valores supracitados e de ter apresentado uma das maiores taxa de crescimento (3,5%) dentre os maiores produtores leiteiros no período de 2018-2019, o Brasil ainda é um dos países com o menor índice de produtividade do mundo (Vilela *et al.*, 2017). O índice de produtividade do rebanho nacional ainda está muito aquém de diversas nações, sendo essa relacionada principalmente à heterogeneidade dos sistemas de produção, falta de tecnificação e acesso inadequado às tecnologias para otimização da produção (Almeida e Bacha, 2021).

A maioria dos estabelecimentos ainda opera a base de conhecimentos provenientes da cultura popular, com rebanhos de baixo índice zootécnico e ausência de controle operacional

(Ragazzi *et al.*, 2020). O baixo grau de instrução dos produtores, cerca de 60,3% são semianalfabetos, impede a implementação de modelos de produção mais tecnificados (Vilela *et al.*, 2016).

Historicamente, a pecuária leiteira surgiu no país em 1532 com a chegada dos europeus. A partir da década de 50 surgiram os primeiros sinais de modernização do setor com a aprovação do decreto de Regulamentação de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA). Já nos anos 90, a redução de custos e a melhoria da qualidade da matéria prima permitiu a expansão da produção para as bacias leiteiras das regiões Norte e Centro-Oeste (Vilela *et al.*, 2017).

A elaboração de legislação para normatizar os padrões de qualidade e transporte do leite no início do século XXI pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e a bonificação implantada pelas indústrias de laticínio pela matéria-prima dentro dos padrões de qualidade exigidos foram medidas que impulsionaram a garantia de maior rendimento industrial e produtos superiores do ponto de vista nutricional (Vilela *et al.*, 2016).

As perspectivas para o futuro do setor apontam para um crescimento significativo nos próximos anos. Estima-se que em 2025 o Brasil produzirá 47,5 bilhões de toneladas de leite. Nesse viés, a criação de sensores para monitoramento de parâmetros físicos, químicos e biológicos associados a conhecimentos de especialistas, permitirão uma pecuária mais tecnificada, resultando em melhor qualidade de produtos e processos, além de sustentabilidade ambiental (Vilela *et al.*, 2017).

Ainda há muito espaço para avançar em investimento em alimentação de qualidade, genética dos rebanhos e gestão no setor (EMBRAPA, 2024; Ferrazza e Castellani, 2021), o que impulsionará o fortalecimento e aumento da competitividade do leite brasileiro através da melhora na qualidade, produção e produtividade (Vilela *et al.*, 2016).

2.2 Pecuária Leiteira de Rondônia

Assim como o Brasil, o agronegócio é a atividade predominante no estado de Rondônia e responsável por cerca de 67,2% do PIB estadual. Em 2021, a agricultura e pecuária contribuíram com 92,8% do valor bruto da produção (VBP) do estado, sendo 57,4% atribuído a bovinocultura (Pfeifer *et al.*, 2021). Quanto a produção leiteira, esta é massivamente oriunda da agricultura familiar e, em 2019, encontrava-se na terceira posição dentre os estados que mais produzem na região Norte, atingindo 1,129 bilhão de litros de leite (EMBRAPA, 2021).

O levantamento realizado pelo IBGE (2022) demonstra que a produção leiteira rondoniense alcançou em 2022 em torno de 656 milhões de litros. O valor arrecado pela produção chegou a 1,3 bilhões de reais, consagrando Rondônia como oitavo maior produtor de leite do país e o primeiro da região Norte, responsável por 47% da produção regional (Pfeifer *et al.*, 2021). Em relação a produção de leite inspecionado, ainda se encontra muito aquém dos grandes produtores de leite do país, representando somente 2,3% (EMBRAPA, 2024).

A bovinocultura, tanto de corte quanto leiteira, tem feito parte da base econômica do estado desde a sua criação na década de 70. Em 1973, o rebanho bovino era de apenas 20.249 cabeças de animais. Em 2019, esse número era de aproximadamente 14,4 milhões de animais (Pfeifer *et al.*, 2021). A maior parcela do rebanho está localizada no município de Porto Velho, seguido de suas adjacências (IBGE, 2023).

Nota-se que em determinadas áreas, especialmente no sul do estado, a expansão da pecuária não foi significativa, fato que se deve ao aumento substancial das lavouras de soja e outras culturas dado pelas condições físicas e climáticas favoráveis, influência do avanço agrícola mato-grossense e a consolidação hidroviária do rio Madeira, rota importante para o escoamento de grãos (Pfeifer *et al.*, 2021).

Atualmente, dentre os 52 municípios de Rondônia, a maior parte da bovinocultura leiteira se concentra nas microrregiões de Ariquemes e Porto Velho, destacando-se as cidades de Jaru, Ouro Preto do Oeste, Machadinho D'Oeste, Porto Velho e Nova Mamoré, com a produção diária de 82,8 mil litros de leite, 80,8 mil litros, 75,8 mil litros, 75 mil e 69,8 mil litros, respectivamente (IDARON, 2023). Embora o estado apresente o melhor índice da região, a produtividade ainda se encontra muito aquém de regiões como Sul e Sudeste (EMBRAPA, 2021; Pfeifer *et al.*, 2021).

Ainda, 67,3% dos municípios rondonienses contam com a presença de indústria lácteas, as quais geram renda para cerca de 35 mil produtores (EMATER, 2023), sendo o Serviço de Inspeção Federal (SIF) responsável pelo processamento de 94,8% do leite industrializado do estado (EMBRAPA, 2021). O mercado consumidor interno absorve pouco mais de um terço da produção, sendo o restante comercializado com outros estados brasileiros (EMATER, 2023).

Devido ao caráter de produção familiar, uma significativa parcela das propriedades é de baixa tecnificação, refletindo em baixa produção diária por animal, em torno de 50 litros de leite/dia em mais da metade das propriedades. Neste cenário, tem se adotado a implantação de tanques de uso coletivo para resfriamento do leite, chegando a beneficiar 88% os produtores (EMBRAPA, 2021).

Segundo a EMBRAPA (2021), um dos grandes desafios da produção leiteira é a redução da contagem padrão em placa (CPP), associada frequentemente com a utilização de tanques de resfriamento comunitário, e a elevada correlação de fatores de risco para mastite subclínica em propriedades com maior grau de tecnificação.

O perfil de instabilidade do mercado leiteiro acaba por refletir o baixo nível de tecnológico e carência de especialização em grande parte dos produtores de Rondônia. A necessidade de políticas públicas que impulsionem a extensão rural, de maneira que seja dada atenção individualizada, é indispensável para a consolidação da cultura no estado rondoniense de forma sustentável (Pfeifer *et al.*, 2021).

2.3 Pecuária Leiteira da região Sudeste

A região Sudeste do país é uma das mais desenvolvidas em praticamente todos os setores da economia nacional. No que tange a produção leiteira, esta região, em conjunto com as regiões Sul e Centro-Oeste, detém a maior parte da produção de leite nacional (EMBRAPA, 2024, 2023, 2022, 2021). Segundo dados do IBGE (2022), em 2022 a região Sudeste produziu cerca de 11,6 bilhões de litros de leite, com destaque para Minas Gerais, maior produtor do país com 9,3 bilhões de litros.

De acordo com a EMBRAPA (2024), no ano de 2022 as dez mesorregiões produtoras de leite inspecionado representaram 43,3% de toda produção nacional. Destas, ocupando a terceira, quarta e décima posição, fazem parte do estado mineiro somando aproximadamente 20,3%. Quanto ao estado de São Paulo e Rio de Janeiro, a produção nesse mesmo ano foi de 1.514.425 e 395.697 mil litros de leite.

É evidente a heterogeneidade dos sistemas de produção dessa região, assim como no restante do território nacional. Algumas características peculiares divergentes entre áreas da mesma região, como a diversidade cultural, tipos de manejo, raças utilizadas e condições ambientais, tornam ainda mais complexa a cadeia de produção (Andrade *et al.*, 2023).

Historicamente, os estados de Minas Gerais e São Paulo sempre obtiveram uma parcela significativa da produção do setor agropecuário brasileiro, inclusive quanto à bovinocultura leiteira (Gilio *et al.*, 2016; Oliveira, 2015). Todavia, ao longo dos últimos 30 anos foi observada uma significativa evolução na produção de leite da região Sul (Oliveira, 2015), superando no ano de 2021 a produção da região Sudeste, com 9,8 bilhões de litros de leite beneficiados pela

indústria (EMBRAPA, 2022). Esse cenário demonstra o avanço do sistema de produção leiteiro em relação a tecnificação e investimento em tecnologias, apesar de ainda haver muito potencial a ser explorado (Almeida e Bacha, 2021).

Já o estado do Rio de Janeiro foi um grande produtor cafeeiro durante o século XIX, especialmente a região a sul fluminense denominada Vale do Paraíba. Com a decadência da cultura, a pecuária leiteira se estabeleceu e tornou-se a principal atividade agropecuária da área, marcadamente de cunho familiar (Santana *et al.*, 2019). Atualmente a bovinocultura de leite está presente em quase todos os municípios do estado e conta com cerca de 15 mil produtores concentrados nas regiões sul, noroeste e norte do estado (EMATER-RIO, 2022).

Segundo os dados mais recentes, a produção do estado de Minas Gerais representa em torno de 27% de todo leite produzido no Brasil, ao passo que os estados de São Paulo e Rio de Janeiro contribuem com 4,38 e 1,14% (EMBRAPA, 2024). Acredita-se que Minas Gerais apresente resultados melhores devido a maior homogeneidade das propriedades, resultado do investimento em assistência técnica, e a cadeia produtiva mais competitiva (Almeida e Bacha, 2021).

Em relação ao estado paulista, o decréscimo nas últimas duas décadas tanto das áreas de pastagem, quanto das propriedades leiteiras e animais em lactação, pode ser explicado devido à supervalorização do valor da terra e a elevada demanda por biocombustíveis, dando lugar para a expansão da produção de cana-de-açúcar (Ferrazza e Castellani, 2021). Para o Rio de Janeiro, a escala de produção leiteira está muito aquém de restante da região sudeste (Almeida e Bacha, 2021), o que justifica a necessidade da aquisição de 33% do volume de leite utilizado no setor industrial a partir de outros estados a fim de suprir a demanda social (Soares, 2018).

Especialmente quanto ao Rio de Janeiro, a importância social e econômica da pecuária leiteira para o estado é indiscutível. Dados apresentados pela EMATER-RIO (2018) denotam em torno de 15 mil propriedades rurais atuantes na bovinocultura de leite, em sua maioria agricultores familiares, e faz-se uma estimativa de que aproximadamente 45 mil pessoas estejam envolvidas diretamente na cadeia de produção no campo (Soares, 2018).

Diversos fatores, como clima, relevo, histórico de colonização e políticas diferenciais contribuem para a presença de variadas dinâmicas regionais quanto a produção agropecuária (Souza *et al.*, 2019), todavia fica evidente que esta heterogeneidade torna o setor frágil e instável. Sendo o segmento composto em sua grande parte por pequenos produtores atuando de maneira dispersa do mercado, cria-se uma complexidade quanto ao funcionamento da cadeia de produção, dificultando o investimento na atividade e comprometendo a qualidade da matéria prima (Borges *et al.*, 2016).

2.4 Mastite Bovina

A sanidade do rebanho leiteiro é um dos fatores fundamentais para se alcançar melhorias na produção de leite e, apesar disso, a grande maioria dos produtores é negligente quanto ao manejo sanitário adequado do rebanho (Fonseca *et al.*, 2021).

Uma das enfermidades de maior importância para a cadeia produtiva de leite é a mastite (Hoque *et al.*, 2020). As perdas vão desde a redução da produção de matéria-prima, descarte de animais acometidos e do leite, ônus com medicamentos e serviços veterinários, até a queda de rendimento e qualidade dos produtos beneficiados pela indústria láctea devido às alterações físico-química do leite (Ajose *et al.*, 2022; Cheng e Han, 2020; He *et al.*, 2020; Jamali *et al.*, 2018).

Definida como inflamação da glândula mamária de etiologia multifatorial, caracteriza-se por alterações físico-químicas teciduais dadas pelo influxo de células inflamatórias. Na

maioria dos casos está associada a infecção de origem bacteriana, sendo que a magnitude do quadro varia conforme a virulência do agente e capacidade imunológica do hospedeiro (Ajose *et al.*, 2022; Ruegg, 2021; Souza *et al.*, 2024).

É a doença mais comum e de maior incidência na pecuária leiteira (Kibebew, 2017), atribuindo-se cerca de 38% da morbididade do rebanho e mais de 25% das perdas financeiras à mesma. Segundo estimativas, o impacto na economia causado pela mastite pode chegar a 10% do faturamento das fazendas leiteiras do país (Fonseca *et al.*, 2021).

Fora os prejuízos econômicos, representa risco potencial à saúde humana pelo consumo de produtos de origem animal dada a transmissão de zoonoses, alérgenos e possibilidade de disbiose intestinal (Ajose *et al.*, 2022; Soares *et al.*, 2017). Ainda, por conta do uso de antimicrobianos no tratamento infecções intramamárias, há a chance de disseminação de bactérias resistentes através da cadeia leiteira (Economou e Gousia, 2015).

Existe uma vasta variedade de agentes infecciosos causadores de mastite, incluindo bactérias, leveduras, fungos e algas (Cheng e Han, 2020), sendo as bactérias as maiores responsáveis pelo acometimento da glândula mamária (Kibebew, 2017). A severidade depende do agente envolvido, sistema imunológico do animal, idade, estágio de lactação, genética e status nutricional (Ajose *et al.*, 2022; Ashraf e Imran, 2020).

Além de ser multifatorial, a mastite pode se apresentar de diversas formas: aguda, superaguda, subaguda e crônica. Sua classificação é dada conforme a manifestação clínica, dividindo-se em clínica e subclínica, ou de acordo com o modo de contágio e agente etiológico, em ambiental e contagiosa (Ajose *et al.*, 2022; Fonseca *et al.*, 2021; Ruegg, 2021; Souza *et al.*, 2024).

2.4.1 Mastite clínica

De forma geral, a mastite clínica caracteriza-se pela presença de acentuados sinais inflamatórios como hiperemia, edema, aumento de temperatura e sensibilidade da glândula mamária, além de redução da produção e alterações visuais do leite (Ajose *et al.*, 2022; He *et al.*, 2020; Souza *et al.*, 2024). A incidência pode variar entre 13 a 40% por ano (Jamali *et al.*, 2018), a depender dos sistemas de manejo e condições ambientais de cada região (He *et al.*, 2020).

A diferença entre os quadros clínicos se dá pela intensidade e gravidade dos sinais de inflamação. A forma superaguda é dada pela presença dos sinais clássicos da mastite acompanhada por alterações sistêmicas como febre, apatia, tremores, perda de apetite e peso. A mastite aguda, de maneira semelhante à superaguda, manifesta sinais sistêmicos de forma mais branda e desenvolve-se mais lentamente. Por sua vez, a subaguda costuma apresentar alterações visíveis do leite, entretanto os sinais típicos de inflamação da glândula mamária são pouco evidentes (Fonseca *et al.*, 2021; Jamali *et al.*, 2018; Kibebew, 2017).

Em alguns animais a enfermidade torna-se crônica, onde o úbere apresenta infecção persistente durante meses a anos, podendo ocorrer a perda dos quartos acometidos (Fonseca *et al.*, 2021) e/ou alterações permanentes na qualidade do leite (Souza *et al.*, 2024). Estes quadros se desenvolvem devido a persistência intramamária de alguns agentes como *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis* e *Staphylococcus aureus*.

2.4.2 Mastite subclínica

Considerada de maior prevalência no rebanho leiteiro, a mastite subclínica ocasiona aumento da contagem de células somáticas, altera os componentes do leite e reduz a produção

das matrizes. Pode estabelecer um quadro curta ou longa duração, este último categorizado como mastite subclínica crônica (Martins *et al.*, 2020).

Não há presença de sinais de inflamação na glândula mamária, tampouco sistêmicos. O leite não apresenta alterações visíveis, como a presença de grumos e coágulos (Ashraf e Imran, 2020; Kibebew, 2017; Souza *et al.*, 2024). Apesar disso, geralmente o leite é ordenhado e acondicionado para expedição junto ao de animais saudáveis (Ruegg, 2021).

Quanto à mastite subclínica crônica, esta representa ainda maior importância econômica em razão dos efeitos a longo prazo sobre o leite ordenhado. Causa significativos danos às células secretoras, o que leva a drástica redução do volume produzido e baixa qualidade da matéria-prima, bem como diminui a vida útil dos animais (Azooz *et al.*, 2020).

Estima-se que as manifestações subclínicas afetem em torno de 20 a 50% das vacas em lactação (Fonseca *et al.*, 2021). Dessa forma, o diagnóstico se torna indispensável para que possam ser adotadas as medidas de controle e estratégias de manejo necessárias, visando o isolamento e identificação laboratorial do agente causador (Ashraf e Imran, 2020; Souza *et al.*, 2024).

2.4.3 Mastite ambiental

A mastite ambiental está geralmente associada a quadros clínicos agudos e de curta duração, frequentemente nos momentos pré e pós-parto. Os microrganismos envolvidos não são adaptados ao ambiente interno da glândula mamária, mas sim ao meio externo, presentes no ar, solo, fezes, cama e água (Alencar *et al.*, 2014; Leira *et al.*, 2018).

Os principais agentes etiológicos são bactérias Gram negativas da família *Enterobacteriaceae* (Rodrigues *et al.*, 2017), Cocos Gram positivos como *Staphylococcus coagulase negativa*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* (He *et al.*, 2020; Melo *et al.*, 2018; Soares *et al.*, 2017), leveduras e algas aclorofiladas, especialmente do gênero *Prototheca* sp. (Osumi *et al.*, 2008).

A contaminação dos tetos pode ocorrer durante a ordenha devido a abertura do canal do teto, através das instalações, mãos do ordenhador ou teteiras da ordenhadeira mecânica e contato direto com o ambiente (ex.: cama, solo e dejetos) (Alencar *et al.*, 2014; Cheng e Han, 2020). Esses agentes requerem umidade, pH favorável e presença de matéria orgânica para sua sobrevivência no ambiente (Kibebew, 2017).

A resposta imunológica do hospedeiro tende a ser rápida e agressiva frente a bactérias Gram negativas, principalmente a *E. coli*. *Pseudomonas aeruginosa* provoca casos de mastite clínica esporádicos, sendo que usualmente a fonte de contaminação é a água (Ashraf e Imran, 2020). O estabelecimento de mastite causada por bactérias ambientais somente se dá quando há comprometimento do sistema imune do animal ou pelo manejo sanitário inadequado (Kibebew, 2017).

2.4.3 Mastite contagiosa

Ao contrário da ambiental, a mastite contagiosa é caracterizada pela sua manifestação na forma subclínica em grande parte dos casos. Os agentes habitam naturalmente a glândula mamária e geralmente se disseminam durante o processo de ordenha, sendo fonte de infecção primária entre quartos não infectados e infectados. (Alencar *et al.*, 2018; Ashraf e Imran, 2020; Fonseca *et al.*, 2021).

Os principais agentes etiológicos são do gênero *Staphylococcus*, em especial *S. aureus* (Melo *et al.*, 2018), *Streptococcus agalactiae* e, com menor frequência, *Mycoplasma bovis* e *Corynebacterium bovis* (Ashraf e Imran, 2020; Kibebew, 2017; Morales-Ubaldo *et al.*, 2023).

Esses microrganismos possuem fortes propriedades de aderência, as quais facilitam a permanência no interior da glândula mamária (Ashraf e Imran, 2020).

A transmissão pode ocorrer também através das mãos de ordenhadores, má higienização dos equipamentos de ordenha, entre outros (Fonseca *et al.*, 2021). O principal elemento envolvido na disseminação é homem, o qual é colonizado por esses microrganismos, particularmente *S. aureus*, em suas mucosas nasais e faríngeas, mãos e derme (Alencar *et al.*, 2018).

S. aureus é um dos agentes de maior prevalência em casos de mastite subclínica. Este coloniza a pele em volta do teto e tende a adentrar o úbere através do canal glandular, resultando em uma infecção crônica e de difícil erradicação (Soares *et al.*, 2017). A capacidade de produzir enzimas e toxinas danosas ao tecido glandular favorece sua penetração e sobrevivência na camada queratinosa do canal do teto, além da habilidade de evasão da fagocitose pela síntese de proteína A (Alencar *et al.*, 2018; Kibebew, 2017).

Já o *S. agalactiae*, microrganismo obrigatório da glândula mamária, é transmitido diretamente entre vacas durante a ordenha, infectando a cisterna glandular e os ductos mamários. Apesar da ausência de alterações macroscópicas no leite, é verificada significativa elevação da contagem de células somáticas (CCS) e diminuição da produção (Kibebew, 2017).

Em geral, bactérias Gram positivas não induzem resposta imune por sinalização de TLR (Toll-like receptor), o que explica a lenta e moderada resposta imunológica apresentada por parte do hospedeiro (Ashraf e Imran, 2020), característico dos quadros de mastite subclínica.

2.5 Resistência Antimicrobiana

Mecanismos de resistência são considerados resultado do processo evolutivo de adaptação e seleção natural microbiana em resposta a um ambiente adverso (Salam *et al.*, 2023). Evidências apontam elementos do genoma bacteriano responsáveis pelo desenvolvimento de resistência que datam milhares de anos antes do surgimento dos antimicrobianos (O'Neil, 2016; Silva *et al.*, 2019). Todavia, a resistência antimicrobiana se tornou um grave problema de saúde pública (Cheng *et al.*, 2019; Miranda *et al.*, 2019; Salam *et al.*, 2023; Souza *et al.*, 2024), consequência do seu uso inadequado e indiscriminado (O'Neil, 2016; Troncoso e Alencar, 2020).

A expressão da resistência pode ser definida mediante dois parâmetros: microbiológicos (resistência *in vitro*) e clínicos (resistência *in vivo*). Do ponto de vista microbiológico, uma cepa é tida como resistente quando permanece viável sob determinada concentração de uma substância antimicrobiana acima daquela suportada por outras cepas filogeneticamente ligadas; quanto à clínica. Entende-se como resistente quando a terapia antimicrobiana normalmente empregada e capaz de conter o quadro infeccioso é ineficaz (Castro *et al.*, 2022; Cheng *et al.*, 2019; Salam *et al.*, 2023).

Existem diversos meios de desenvolver resistência, dentre eles a capacidade de resistir a ação de determinado fármaco, seja por uma característica estrutural ou funcional intrínseca; mutações gênicas durante a replicação celular devido a fatores internos ou externos; aquisição de material genético proveniente de outras cepas carreadoras de genes de resistência por mecanismos de transferência horizontal (Costa e Silva, 2017; Salam *et al.*, 2023).

Os mecanismos são divididos em quatro categorias: alteração do sítio de ação, alteração da permeabilidade da membrana externa, bombas de efluxo e inativação enzimática. A alteração do sítio de ação é a principal forma de resistência aos beta-lactâmicos encontrada em cocos Gram positivos e é dada pela substituição de aminoácidos durante a síntese proteica que constitui o alvo antimicrobiano (Castro *et al.*, 2022; Salam *et al.*, 2023).

Alteração da permeabilidade de membrana externa é um mecanismo utilizado por bactérias Gram negativas através da restrição da entrada de moléculas hidrofílicas pela redução

da expressão de porinas, proteínas presentes na membrana externa celular bacteriana. Já as bombas de efluxo agem eliminando substâncias tóxicas presentes no interior da célula, frequentemente associadas à multirresistência. Quanto à síntese enzimática, a expressão de genes codificadores de hidrolases tornam moléculas antimicrobianas inativas, como as beta-lactamases (Blair, 2014; Castro *et al.*, 2022).

A expressão ou supressão de um fenótipo de resistência em determinada população bacteriana está intimamente relacionada aos fatores externos ambientais. Quando na ausência da pressão de seleção, a tendência é que os indivíduos expressem mecanismos de resistência cada vez menos. Entretanto, à medida que há substâncias exercendo estresse sobre essa população, indivíduos que carregam genes de resistência tendem a se multiplicarem (Z. Yu *et al.*, 2017).

Uma das maiores problemáticas de microrganismos resistentes é que grande parte deles carregam genes de resistência a múltiplas classes de antimicrobianos (Salam *et al.*, 2023; Troncoso e Alencar, 2020), resultando não só em limitações terapêuticas (Bert *et al.*, 2014), mas também na disseminação destes mecanismos a outros agentes, nos mais diversos ambientes (Cheng *et al.*, 2019).

2.5.1 Fatores associados a emergência e disseminação da resistência antimicrobiana

A medicina humana e veterinária vem fazendo o uso de antimicrobianos há mais de 60 anos, desde a descoberta da penicilina por Alexander Fleming em 1928 (Economou e Gousia, 2015; Kumar *et al.*, 2019; Salam *et al.*, 2023). Mesmo antes do surgimento de microrganismos resistentes, alertava-se para a possibilidade de que bactérias fossem capazes de desenvolver resistência a esses fármacos (McEwen e Collignon, 2018; Sharma *et al.*, 2018).

Os antimicrobianos são compostos produzidos naturalmente por microrganismos ou quimicamente sintetizados e/ou semi-sintetizados a moléculas análogas, originalmente criados para o tratamento quadros infecciosos (Ben *et al.*, 2019). Atualmente, utiliza-se em larga escala no setor agropecuário como promotores de crescimento, aditivos alimentares, além de controle e profilaxia de doenças (Ben *et al.*, 2019; Hoque *et al.*, 2020; O'Neil, 2016).

A capacidade de adaptação bacteriana ao estresse e ambientes adversos associada ao emprego de antimicrobianos em grandes quantidades pode exercer forte pressão seletiva sobre a microbiota humana, animal e ambiental (Ben *et al.*, 2019; Salam *et al.*, 2023). Tais alterações têm contribuído para modificação do resistoma de diversos meios, tornando-os fonte potencial de genes de resistência (Castro *et al.*, 2022; Hoque *et al.*, 2020).

Define-se resistoma como o conjunto de todos os tipos de genes de resistência, tanto intrínsecos quanto adquiridos, e seus precursores, bem como os potenciais mecanismos de resistência presentes em comunidades bacterianas que requerem algum processo evolutivo ou interferência do contexto ambiental para que a expressão seja detectada fenotipicamente (Cha e Kim, 2021; Medina, 2018).

Ambientes de produção animal são locais críticos quanto à emergência e disseminação de genes de resistência bacteriana devido ao elevado uso dos antimicrobianos e, possivelmente, ao compartilhamento de material genético entre microrganismos comensais e agentes patogênicos humanos e animais (Castro *et al.*, 2022; O'Neil, 2016; Salam *et al.*, 2023). Podem ser considerados como reservatórios desses genes (Economou e Gousia, 2015).

Estima-se que 90% dos antimicrobianos na produção animal são utilizados como agentes promotores de crescimento e profiláticos (Castro *et al.*, 2022; Priyanka *et al.*, 2017), em que a administração é feita via alimentação e água em baixas doses durante longos períodos. Em caso de tratamento, os protocolos empregados constituem-se na administração em todo o rebanho, ainda que poucos animais apresentem sintomatologia clínica (Economou e Gousia, 2015; Souza *et al.*, 2024).

Evidências sugerem que a cadeia de produção de alimentos seja uma das principais fontes de disseminação de bactérias resistentes, seja pelo contato direto ou indireto de trabalhadores e profissionais que atuam junto aos animais, pela contaminação ambiental através dos dejetos animais (Economou e Gousia, 2015; Salam *et al.*, 2023), por meio de rotas ambientais ou mesmo pelo consumo de produtos de origem animal (O'Neil, 2016; Salam *et al.*, 2023; Sharma *et al.*, 2018).

A presença de bactérias patogênicas dispersas em diferentes nichos favorece o surgimento de cepas resistentes (Economou e Gousia, 2015), sem contar que produtos oriundos da criação animal podem constituir reservatório de várias zoonoses (Sharma *et al.*, 2018). Quanto a persistência de agentes resistentes no ambiente, podem ser encontrados repetidamente em gerações animais subsequentes, mesmo em sistemas de produção de ciclos curtos e constantemente desinfetados (Davies e Wales, 2019; Hoque *et al.*, 2020).

Possivelmente o efeito do emprego de antimicrobianos na agropecuária relacione-se com a elevada dispersão de genes de resistência em elementos genéticos móveis (Hoque *et al.*, 2020; Medina, 2018), ainda que não seja completamente estabelecido quão influente é a pressão de seleção antimicrobiana sobre a transferência horizontal genética bacteriana. No entanto, uma vez que existam cepas resistentes no ambiente, a propagação física desses pode ocorrer mesmo na ausência de pressão seletiva (Davies e Wales, 2019).

Pode-se considerar que os efeitos do uso de antimicrobianos não se restringem apenas ao local de administração. A depender do grau de tecnificação do sistema de produção, os efluentes de águas residuais das propriedades representam uma fonte potencial de dispersão de desses genes, dada pela lixiviação em cursos d'água e águas subterrâneas (Castro *et al.*, 2022). Ademais, os próprios excrementos dos animais da produção tendem a penetrar no solo e alcançar superfícies aquáticas (Berglund, 2015).

A água constitui uma das vias mais importantes no que diz respeito a disseminação da resistência, meio pelo qual genes de resistência são inseridos no ecossistema da microbiota natural de determinado local (Medina, 2018; Salam *et al.*, 2023). Além de propiciar a troca de material genético e o surgimento de cepas resistentes, constitui também um reservatório destes genes capaz de alterar a microbiota de ambientes indiretamente relacionados (Castro *et al.*, 2022).

Fora a difusão de genes de resistência, há muitas vias pelas quais resíduos de antimicrobianos não degradados e seus metabólitos podem contaminar ambiente aquático, como esgoto urbano, efluentes industriais e estabelecimentos agropecuários (Medina, 2018; O'Neil, 2016). Particularmente a irrigação com água oriunda de tratamento de esgoto e adubação com estrume do solo representam fontes altamente potenciais de contaminação do ambiente (Ben *et al.*, 2018; O'Neil, 2016; Salam *et al.*, 2023). Nota-se que o surgimento de bactérias resistentes tende a seguir as mesmas rotas de contaminação de resíduos antimicrobianos (Berglund, 2015).

Considera-se contaminação permanente do ambiente, em vista o uso continuado de fármacos em larga escala (Ben *et al.*, 2018) e que o tratamento de esgoto não os remove completamente. Algumas dessas substâncias têm peso molecular muito baixo, o que permite que sejam rapidamente dissolvidas e persistam no meio (Kumar *et al.*, 2019), sugerindo que os efeitos adversos destes micropoluentes, como a indução de conjugação e recombinação bacteriana, podem se dar mesmo em concentrações ubíquas e subletais (Berglund, 2015).

A microbiota comensal desses ambientes sob a pressão seletiva de resíduos farmacológicos proporciona a emergência de cepas de genes de resistência (Ben *et al.*, 2018; O'Neil, 2016; Salam *et al.*, 2023). Apesar de muitos antimicrobianos possuírem meia-vida relativamente curta, é suficiente para o tempo de exposição induzir ativação de mecanismos de resistência na microbiota devido a exposição contínua (Kumar *et al.*, 2019).

Os impactos da contaminação não se restringem apenas as populações alvo, mas também aquelas inicialmente não susceptíveis. Indiretamente, fora o efeito bactericida e bacteriostático, induz-se a ativação de mecanismos de resistência em comunidades não alvo dada a longa exposição a esses fármacos. Como efeito, a estrutura e atividades metabólicas particulares de determinado nicho ecológico são drasticamente modificadas devido as alterações genéticas geradas (Kumar *et al.*, 2019).

Quanto à atuação indireta de metais pesados no processo de seleção de cepas resistentes, observa-se forte correlação entre a presença destes no solo com a presença de dejetos animal e genes de resistência bacteriana. O mecanismo pelo qual microrganismos adquirem resistência a esses compostos são similares aqueles responsáveis pela resistência aos antimicrobianos, categorizados como co-resistência, co-regulação, resistência cruzada e indução da formação de biofilme (Z. Yu *et al.*, 2017).

A presença de moléculas antimicrobianas e seus metabólitos ativos em diversos ambientes pode levar ao aceleração na emergência de bactérias resistentes e genes de resistência, à medida que se eleva o risco de transmissão a população humana (Ben *et al.*, 2018; Hoque *et al.*, 2020). Assim como ocorre o desbalanço na biodiversidade da microbiota ambiental responsável pelo equilíbrio ecológico natural (Kumar *et al.*, 2019), se dá a desregulação da homeostase orgânica humana, favorecendo o estabelecimento de agentes oportunistas e patogênicos (Ben *et al.*, 2018; Priyanka *et al.*, 2017).

2.5.2 *Staphylococcus aureus* Meticilina Resistente (MRSA)

Com a descoberta da penicilina na década de 20, o surgimento de cepas produtoras de penicilases se deu rapidamente nos anos subsequentes (Blair *et al.*, 2014; Salam *et al.*, 2023). Em 1959 foram introduzidas as penicilinas não afetadas pela ação destas beta-lactamases, chamadas penicilinas penicilinase-resistentes, como a meticilina, cloxacilina e a oxacilina (Bessa e Laranjeira, 2020; Salam *et al.*, 2023). Entretanto, em apenas um ano foi reportada a primeira cepa de *Staphylococcus* resistente a meticilina, denominada MRSA (Salam *et al.*, 2023).

O mecanismo de resistência aos beta-lactâmicos se dá de duas formas: produção de enzima beta-lactamase codificada pelo gene *blaZ* e pela modificação do sítio de ligação do fármaco conferida pelo gene *mecA* presente no elemento genético móvel denominado “cassete cromossômico estafilocócico *mec*” (SSC*mec*) (Botoni *et al.*, 2018; Melo, 2017; Motta, 2018). Este último é formado por dois componentes principais: complexo *mec* composto pelo *mecA* e seus reguladores *mecI* e *mecRI*; e complexo *ccr*, responsável por codificar recombinases que executam a excisão e integração deste elemento no cassete cromossômico (Melo, 2017; Motta, 2018).

O gene *mecA* e seus homólogos (*mecB* e *mecC*) são responsáveis pela codificação de PBPs alteradas (PBP2a ou PBP2') de baixa afinidade aos antimicrobianos beta-lactâmicos (Lucas *et al.*, 2021). A PBP2a é capaz de realizar reações de transpeptidação permitindo a síntese de peptidoglicano necessário na formação da parede celular bacteriana enquanto as PBPs normais encontram-se ligadas ao antimicrobiano (Motta, 2018). A identificação de SSC*mec* nas demais espécies de *Staphylococcus* sugere alta capacidade de dispersão desse gene (Blair *et al.*, 2015).

O método mais acurado de identificação do gene *mecA* é dado por técnicas moleculares, entretanto tem baixa disponibilidade na rotina (Botoni *et al.*, 2018). Dentre elas, comumente faz-se o uso de PFGE (Eletroforese em Gel de Campo Pulsado), tipagem do gene *spa*, o MLST (Tipagem da Sequência Multilocus) e tipagem do cassete SSC*mec* (Motta, 2018).

Embora técnicas moleculares sejam precisas, preconiza-se para o diagnóstico microbiológico clínico a utilização de cefoxitina e oxacilina como predição de resistência

mediada por *mecA* (CLSI, 2024). Todavia, a alta heterogeneidade na forma de expressão desse gene dificulta a correta detecção do mecanismo de resistência (Melo, 2017), o qual é de extrema importância tendo em vista que confere resistência a toda classe de beta-lactâmicos.

Estudos anteriores acerca da detecção de *Staphylococcus* meticilina resistente obtidos de amostras de animais (Mendonça, 2012; Soares, 2010) verificaram diversas divergências ao analisarem os dados fenotípicos e genotípicos. Grande parte dos isolados, apesar do fenótipo de resistência presente, não apresentaram resultado positivo nas análises genotípicas utilizando-se as metodologias tradicionais, já bem consolidadas cientificamente.

Dessa forma, Melo *et al.* (2014) identificaram uma variação do gene *mecA* em *Staphylococcus aureus* oriundo de leite bovino a partir do sequenciamento e comparação do gene variante com o gene clássico. Foram observadas mutações pontuais ao longo da sequência de nucleotídeos, as quais justificaram a ausência de correlação fenogenotípica quanto a resistência nos isolados estudados (Melo, 2017).

A sequência variante relacionada a amostras bovinas divergiu significativamente de demais espécies animais, como roedores, equinos e animais de companhia, e humana (Melo, 2014). Isto demonstrou a necessidade da utilização de métodos de detecção compatíveis com as variações interespecíficas dentre amostras de estudos dessa natureza, em que o desenvolvimento do *primer* por Melo *et al.* (2014) capaz de detectar essa variação genética permite a detecção precisa de cepas portadoras de resistência aos beta-lactâmicos.

Devido à alta capacidade de dispersão de agentes patogênicos, incluindo *Staphylococcus* spp., em ambientes de produção e o contato estreito com o homem, estudos demonstraram a presença do gene *mecA* variante em isolados obtidos de outras espécies animais e humanos (Melo, 2017; Pimenta, 2018). Este fato evidenciou a necessidade do desenvolvimento de metodologia capaz de detectar o gene clássico e variante, bem seus homólogos (Melo *et al.*, 2017).

Desse modo, Melo *et al.* (2017) a partir da análise das sequências de gene *mecA* originários de amostras humana e animal elaboraram *primer* universal capaz de englobar os genes clássico e suas variações, bem como seus homólogos. Esta nova abordagem trouxe considerável avanço no que diz respeito a identificação e monitoramento da circulação de cepas portadoras desses genes de resistência nos mais variados ambientes e diferentes espécies (Melo *et al.*, 2019).

2.6 Impacto da Resistência Antimicrobiana no Âmbito de Saúde Única

O conceito de Saúde Única (*One Health*) se refere à interrelação e interdependência entre a saúde humana, animal e do ambiente, abrangendo estratégias de ações integrativas que levem a promoção da saúde em todos os níveis (Carneiro e Pettan-Brewer, 2021; Menin, 2018). De acordo com a Organização Mundial da Saúde Animal (OIE), o setor de saúde é responsável por reduzir as vulnerabilidades sociais e intervir acerca dos impactos ambientais, corroborando com tal proposta (Araújo *et al.*, 2020).

Historicamente sempre houve a cooperação entre os profissionais de saúde humana e veterinária. O médico grego Hipócrates (460-367 a.c.) já trazia em sua época a noção de saúde pública, em que afirmava a interrelação entre a saúde do paciente e fatores ambientais (Araújo *et al.*, 2020; Carneiro e Pettan-brewer, 2021).

Ao longo dos séculos diversos médicos, veterinários, epidemiologistas, entre outros profissionais, abordaram a ideia da Saúde Única, entretanto somente na década de 60 é que se cunhou o termo *One Health*, precedendo o estabelecimento da Medicina Veterinária Preventiva como parte da formação acadêmica de médicos veterinários (Carneiro e Pettan-brewer, 2021).

Os avanços tecnológicos e modernização industrial, novos padrões de movimentação humana no turismo, globalização e consumismo resultaram em um novo mundo altamente

conectado, tornando possível a introdução e disseminação de doenças emergentes e reemergentes, além de alterações de ecossistemas e impactos ambientais (Carneiro e Pettan-Brewer, 2021; Medina, 2018; Salam *et al.*, 2023).

É estimado que cerca de 60% das enfermidades infecciosas humanas e 75% de doenças infecciosas emergentes são zoonoses, sendo as principais raiva, tuberculose, febre Q, leishmaniose visceral, brucelose e tripanossomíases (Menin, 2018).

A emergência da resistência antimicrobiana é um grave problema de saúde pública de caráter multifatorial que ameaça não só a saúde humana e animal, como denota uma crise econômica e de segurança global (Cheng *et al.*, 2019; O'Neil, 2016). Estima-se que até 2050 em torno de 10 milhões de mortes por doenças infecciosas sejam atribuídas a bactérias resistentes (White e Hughes, 2019).

O uso impróprio e indiscriminado de antimicrobianos vem favorecendo a emergência de cepas resistentes e dispersão de genes de resistência (O'Neil, 2016; Sharma *et al.*, 2018; Souza *et al.*, 2024), como efeito tem-se as falhas terapêuticas nos tratamentos clínicos (Saraiva *et al.*, 2022), aumento das taxas de mortalidade e severos prejuízos econômicos (Medina, 2018; Saraiva *et al.*, 2022).

Em 2019 a OMS determinou a resistência bacteriana como uma das principais ameaças de saúde global (Cheng *et al.*, 2019; White e Hughes, 2019), sendo que em 2017 já havia listado os agentes patogênicos resistentes a antimicrobianos tidos como prioridade, catalogando doze famílias de bactérias que representam a maior ameaça para a saúde humana (OPAS/OMS, 2017).

A grande maioria das classes de antimicrobianos são utilizadas tanto em humanos quanto em animais, incluindo-se mamíferos domésticos, aves, sistema de produção de peixes, entre outros, além de alguns setores de produção agrícola como a horticultura (McEwen e Collignon, 2018; O'Neil, 2016). Especificamente no setor de produção, são empregados como medida profilática, promotores de crescimento e tratamento de doenças infectocontagiosas (McEwen e Collignon, 2018; Souza *et al.*, 2024, 2020).

Com base no conceito de resistoma, compreende-se que a presença de microrganismos resistentes é inerente a diversos microbiomas, sendo o resistoma ambiental reservatório de genes de resistência e moldado pela estrutura das comunidades microbianas naturais do meio. No entanto a atividade humana tende a interferir nesses micros ecossistemas, possibilitando o fluxo de transferência dada por elementos genéticos móveis entre variados nichos (Cha e Kim, 2021; Medina, 2018).

Uma das questões mais controversas quanto ao uso de antimicrobianos é a utilização como promotores de crescimento na produção animal, tendo em vista que a administração prolongada de doses subterapêuticas é condição favorável ao surgimento de cepas resistentes dada a pressão de seleção exercida e a transferência das mesmas entre espécies animais e o homem, principalmente através da alimentação (McEwen e Collignon, 2018; Medina, 2018; Sharma *et al.*, 2018; Souza *et al.*, 2024).

Outro aspecto relevante diz respeito aos animais selvagens, considerados potenciais reservatórios de microrganismos resistentes e genes de resistência, bem como os ecossistemas aquáticos, em que a transferência horizontal genética a patógenos humanos já foi evidenciada (Vittecoq *et al.*, 2016; White e Hughes, 2019).

Ainda, a contaminação ambiental com resíduos antimicrobianos derivada da indústria farmacêutica, agropecuária, água proveniente de tratamento de esgoto e descarte inadequado de fármacos de uso humano, exerce pressão seletiva sobre a emergência de bactérias resistentes (Medina, 2018; White e Hughes, 2019).

As águas residuais e estações de tratamento de esgoto, a presença de antimicrobianos, metais pesados e substâncias desinfetantes tem sido associada ao aumento da transferência e

capacidade de co-seleção de genes de resistência, ainda que em concentração significativamente mais baixas que doses terapêuticas (Cha e Kim, 2021; Medina, 2018).

Em países desenvolvidos em que a população tem acesso ao saneamento básico e consome água de boa qualidade, a transmissão de bactérias e genes de resistência provenientes de sistemas de produção animal ocorre em grande parte de origem alimentar, ao passo que países com precário tratamento de água e esgoto, a transmissão através da água potável é provavelmente uma via importante (Mcewen e Collignon, 2018; O'Neil, 2016).

Em 2006 a União Europeia banuiu a prática da administração de antimicrobianos como promotores de crescimento no setor agropecuário, apesar de ainda permitir o uso terapêutico de substâncias aprovadas para animais (Mcewen e Collignon, 2018). Desde 2016 o Brasil vem implementando o PAN-BR, alinhado com o Plano de Ação Global definido pela OMS, OIE e Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO). Em 2018 o MAPA lançou o PAN-BR Agro, integrado com o PAN-BR (Saraiva *et al.*, 2022).

Embora legislações e iniciativas a fim de limitar o uso de antimicrobianos na produção animal estejam sendo colocadas em prática, tais medidas aparentam não serem capazes de solucionar o problema por si só (O'Neil, 2016; Saraiva *et al.*, 2022), evidenciando a relevância da atuação dos profissionais da área, em especial médicos veterinários.

Dada a complexidade e as múltiplas rotas de exposição, torna-se dificultoso determinar com precisão a contribuição dos diferentes meios na disseminação da resistência antimicrobiana (White e Hughes, 2019). Ainda faltam estudos integrados quanto à resistência bacteriana e a tríade homem, animal e ambiente, considerando que muitos dos genes de resistência fazem parte de elementos genéticos móveis e circulam com facilidade entre estes meios (Menin, 2018).

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a prevalência e o perfil fenogenotípico de resistência de bactérias do gênero *Staphylococcus* presentes na glândula mamária de bovinos leiteiros, bem com o perfil higiênico-sanitário de propriedades de bovinocultura leiteira com ênfase na perspectiva de Saúde Única e a emergência de resistência antimicrobiana em ambientes de produção animal.

3.2. Objetivos Específicos

3.2.1 Quanto a pesquisa laboratorial

1. Isolar e identificar os agentes bacterianos presentes no leite de vacas em lactação;
2. Caracterizar as cepas isoladas fenogenotipicamente;
3. Avaliar o perfil fenogenotípico da resistência.

3.2.2 Quanto as ações de extensão

1. Realizar diagnóstico higiênico-sanitário dos estabelecimentos produtores de leite, mediante a aplicação de entrevistas semiestruturadas a fim de identificar as suas características predominantes.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostragem

Foram analisadas amostras de leite coletadas de vacas leiteiras em lactação de pequenos produtores rurais na região Norte, localizado no sul do estado de Rondônia, e na região Sudeste, localizadas na Baixada Fluminense do Rio de Janeiro e na divisa com os estados de São Paulo e Minas Gerais. Todas as coletas foram realizadas em *pool* dos quartos mamários de cada animal anteriormente à ordenha em recipiente estéril, priorizando-se pela higienização prévia dos tetos e desprezo dos três primeiros jatos de leite.

Os animais incluídos no estudo foram selecionados de forma aleatória, sendo excluídos da amostragem somente os animais com mastite clínica.

Figura 1- animais com higienização dos tetos já realizada para início do processo de coleta em propriedade localizada no município de Vilhena-RO (A) e Seropédica-RJ (B).



Fonte: Arquivo pessoal, 2023.

Dentre as coletas realizadas no território rondoniense, duas propriedades eram localizadas no município de Cabixi, uma propriedade proveniente do município de Corumbiara, uma localizada em Nova Conquista, e uma em Vilhena. No estado do Rio de Janeiro foram coletadas amostras em uma propriedade no município de Seropédica, uma propriedade localizada em Queluz-SP e uma em Santo Antônio do Aventureiro-MG. A amostragem total do trabalho foi de 127 amostras (tabela 1).

Tabela 1- Número de amostras coletadas por propriedade.

Código propriedade	Localização	Nº de amostras coletadas
1	Cabixi-RO	05
2	Cabixi-RO	10
3	Corumbiara-RO	15

4	Nova Conquista-RO	12
5	Vilhena-RO	20
6	Queluz-SP	15
7	Seropédica-RJ	27
8	Santo Antônio do Aventureiro-MG	23
Total		127

Fonte: Arquivo pessoal (2023).

Todas as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Bacteriologia Veterinária (LABAC-VET) da UFRRJ para dar início ao processo de isolamento e identificação das espécies envolvidas e do perfil fenogenotípico de resistência antimicrobiana.

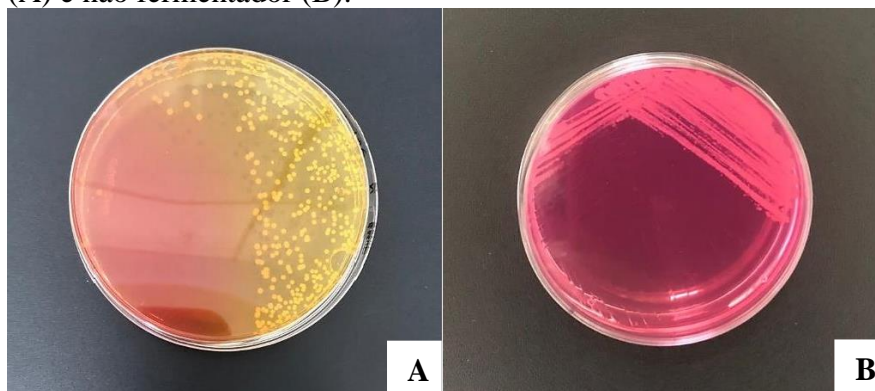
O projeto foi aprovado pelo CEUA-IV UFRRJ processo número 6239180418.

4.2 Isolamento

Todas as amostras de leite foram semeadas diretamente em Ágar Manitol Vermelho de Fenol (AMVF) (Kasvi®) para obtenção do isolamento primário e incubadas em estufa bacteriológica a $\pm 35^{\circ}\text{C}$ por 48 horas, sendo realizadas leituras com 24 e 48 horas.

O AMVF é um meio seletivo e diferencial para bactérias Gram-positivas, especialmente do gênero *Staphylococcus*, fazendo parte de sua composição 7,5% de NaCl e vermelho de fenol como indicador de pH (figura 2). Este indicador possibilita visualizar a fermentação do manitol presente no meio pelo aparecimento de coloração amarela, ou a utilização de peptona através da presença de coloração rosa.

Figura 2- crescimento de *Staphylococcus* spp. em Ágar Manitol Vermelho de Fenol fermentador (A) e não fermentador (B).



Fonte: Arquivo pessoal (2021).

O gênero *Micrococcus* não é diferenciado pela característica morfofotintorial, no entanto *Bacillus* spp. demonstram formas bacilares coradas pelo cristal violeta, geralmente bastante alongadas e significativamente maiores que cocos Gram-positivos, sendo que em detrimento da sua baixa patogenicidade e pouca importância em saúde pública estes crescimentos foram desconsiderados. Os isolados não identificados como *Bacillus* spp. seguiram para diferenciação de gênero *Micrococcus* e *Staphylococcus*, além da identificação de espécie deste último.

4.3 Identificação fenotípica

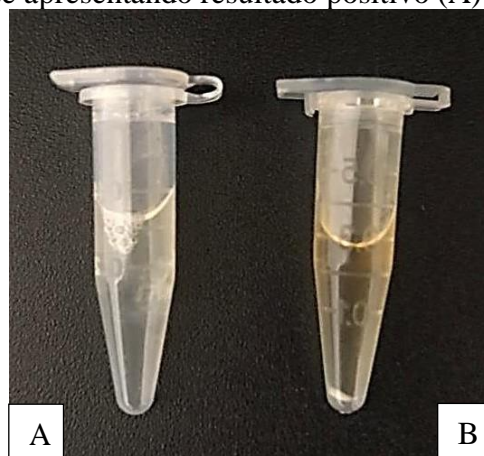
Os isolados selecionados de colônias do AMVF compatíveis com cocos Gram-positivos foram submetidos ao teste de sensibilidade a bacitracina 0,04 UI (figura 4) para diferenciação de *Staphylococcus* spp. de *Micrococcus* spp. Aqueles que apresentaram resistência foram testados quanto a produção de coagulase para distinção de *Estafilococos* coagulase-negativa (ECN) e *Estafilococos* coagulase-positiva (ECP) (figura 5). Os ECP foram submetidos a diferenciação de espécie pela observação de resistência ou sensibilidade à polimixina B (tabela 2) (Koneman *et al.*, 2018).

Figura 3- crescimento de *Staphylococcus* sp. em ágar Mueller Hinton (AMH) resistente à bacitracina 0,04 UI.



Fonte: Arquivo pessoal (2021).

Figura 4- prova da coagulase apresentando resultado positivo (A) e negativo (B).



Fonte: arquivo pessoal (2021).

Tabela 2- Provas fenotípicas utilizadas para diferenciação e identificação fenotípica de *Staphylococcus* spp.

Prova	Princípio	Metodologia	Leitura
Resistência à bacitracina 0,04 UI	Observar a presença ou ausência de halo de crescimento bacteriano em torno do disco.	Pelo método de difusão em disco, padronizar isolado em salina 0,9% a 0,5 da escala de McFarland; em seguida	Após 24 horas, realizar medição do diâmetro caso haja formação de halo e classificar como sensível ou resistente de acordo com ponto de corte pré-estabelecido; em caso de

		passar com <i>swab</i> estéril em placa de AMH uniformemente; depositar disco de bacitracina 0,4 UI na placa e incubar a 35 \pm 2°C por 24 horas.	crescimento até os limites dos disco, classificar como resistente.
Coagulase	Avaliar a presença da enzima coagulase através da formação de coágulo a partir de plasma de coelho.	Adicionar 200 microlitros de caldo BHI com crescimento bacteriano ao plasma de coelho; incubar em estufa à 35C durante 4 a 6 horas e posteriormente manter em temperatura ambiente por mais 18 horas.	Após 24 horas, observar a formação de coágulo.
Resistência à polimixina B	Observar a presença ou ausência de halo de crescimento bacteriano em torno do disco.	Pelo método de difusão em disco, padronizar isolado em salina 0,9% a 0,5 da escala de McFarland; em seguida passar com <i>swab</i> estéril em placa de AMH uniformemente; depositar disco de polimixina B na placa e incubar a 35 \pm 2°C por 24 horas.	Após 24 horas, realizar medição do diâmetro caso haja formação de halo e classificar como sensível ou resistente de acordo com ponto de corte pré-estabelecido; em caso de crescimento até os limites dos disco, classificar como resistente.

Fonte: Koneman *et al.* (2018).

4.4 Identificação proteômica (MALDI-TOF)

Os isolados identificados fenotipicamente foram posteriormente submetidos a identificação proteômica pela técnica do Tempo de Voo de Ionização / Desorção por Laser Assistida por Matriz (MALDI-TOF MS) pelo Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica (LIMM) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

Os isolados foram cultivados em Ágar CLED a 35 \pm 2°C por 24 horas. Cada cultura bacteriana foi transferida, em duplicata, para microplaca (Microflex, Bruker Daltonics – Germany) e, ao sedimento bacteriano, foi adicionada uma solução de lise (ácido fórmico 70%) em quantidade suficiente para cobri-lo. Em seguida, 1 μ l de solução da matriz (ácido-alfa-ciano-4-hidroxi-cinâmico diluído em acetonitrila 50% e ácido trifluoracético 2,5%) foi utilizado para cobrir o extrato bacteriano, para finalmente ser processado. Os espectros de cada amostra foram gerados em um espectrômetro de massa (MALDI-TOF LT Microflex Bruker) equipado com laser de 337nm de nitrogênio no modo linear controlado pelo programa FlexControl 3.3. Os espectros foram coletados na faixa de massas entre 2.000-20.000 m/s e posteriormente, analisados pelo programa MALDI Biotyper 2.0, com as configurações padronizadas para identificação bacteriana.

O programa confronta os espectros da amostra desconhecida com amostras de referência em um banco de dados. Os resultados obtidos variam em uma escala que vai de zero a três, sendo que entre zero e 1.699 indica que não há possibilidade de identificação, entre 1.7 e 1.999 indica provável identificação de gênero, entre 2.0 e 2.299 indica identificação de gênero confiável e provável identificação de espécie, e entre 2.3 e três configura identificação confiável em nível de espécie. Neste trabalho foram considerados como identificação aceitável em nível de gênero os resultados acima de 2.0 e em nível de espécie acima de 2.3.

4.5 Análise fenotípica de resistência antimicrobiana

4.5.1 Padronização do inóculo e metodologia

A análise fenotípica de resistência foi direcionada para a pesquisa de bactérias de importância em Saúde Pública como preconizado pela OMS (WHO, 2017). Padronizaram-se os isolados através de suspensão em solução salina 0,9% de colônias com crescimento de 24 horas em meio não seletivo, em concentração equivalente à escala 0,5 de McFarland. Utilizou-se o método de difusão em disco, em que suspensões foram estriadas uniformemente na superfície de meio AMH com *swab* estéril e, em seguida, depositados os discos de antimicrobianos selecionados. As placas foram incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por um período de 18 a 24 horas.

Os diâmetros formados pelos halos de crescimento bacteriano em torno dos discos foram observados e medidos em milímetros, os quais interpretaram-se de acordo com os pontos de corte disposto pelo CLSIVET (2024), sendo classificados como sensível (S), sensível aumentando a exposição (I) e resistente (R).

4.5.2 Detecção fenotípica de resistência aos beta-lactâmicos em *Staphylococcus* spp.

As cepas de *Staphylococcus* spp. foram submetidas ao teste de difusão em disco com os antimicrobianos cefoxitina (30µg) (CFO) e oxacilina (10µg) (OXA) para pesquisa de resistência aos beta-lactâmicos mediada pelo gene *mecA*, e penicilina G (10UI) (PEN) para o gene *blaZ* (CLSIVET, 2018; OPAS/OMS, 2017).

Com relação ao gene *mecA*, utilizou-se como marcador de resistência a CFO para as espécies identificadas como ECN e para os isolados identificados como *S. aureus*.

4.6 Análise genotípica de resistência antimicrobiana

4.6.1 Extração de DNA pela técnica de lise térmica

A extração de DNA foi realizada pelo método de lise térmica segundo Buyukcangaz e colaboradores (2013) com modificações estabelecidas pelo LABAC-VET - UFRRJ. Cada isolado foi cultivado em ágar CLED a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas. Posteriormente as colônias foram inoculadas em microtubos contendo 200µl de água ultrapura e agitadas em vórtex, para então serem incubadas em banho-maria a 100°C durante 10 minutos. Em seguida os microtubos foram esfriados em temperatura ambiente e centrifugados por dois minutos a 13.500 rpm. Aproximadamente 180µl de sobrenadante foram transferidos para novos microtubos e armazenados em temperatura de -20°C .

4.6.2 Preparo de reação para detecção dos genes por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)

Para a detecção dos genes tanto de identificação quanto de resistência a antimicrobianos, foram realizadas reações de PCR utilizando 25µl de volume total, cujas concentrações dos reagentes foram: 1X de tampão (10mM Tris-HCl, pH 9,0; 50 mM KCl; 0,1% Triton X-100), 3mM de MgCl₂ (Invitrogen®), 0,4µM de cada *primer*, 0,2mM de dNTP (Invitrogen®), 1U de Taq polimerase (Invitrogen®), água ultrapura para completar o volume total da reação e 20ng do DNA total extraído da cepa a ser testada. Para a amplificação foi utilizado o termociclador TC-9639 (Loccus Biotecnologia®) e as condições de ciclagem para cada gene trabalhado

encontram-se descritas ao longo desta dissertação nos quadros de exposição de cada iniciador utilizado, com sua devida referência. Os amplicons foram avaliados por eletroforese em gel de agarose 1,5% revelado com SYBR Green (Invitrogen®) e visualizados através do sistema de captura de imagem em Transiluminador L-PIX EX (Loccus Biotecnologia®).

4.6.3 Detecção genotípica de resistência aos beta-lactâmicos em *Staphylococcus* spp.

A pesquisa genotípica da resistência à meticilina foi realizada para todos os isolados de *Staphylococcus* spp., inclusive para aqueles que se mostraram fenotipicamente sensíveis aos beta-lactâmicos. Tal pesquisa se deu através da PCR para detecção do gene *mecA* utilizando primers descritos por Murakami *et al.* (1991) e *mecA* universal e *mecA* variante utilizando sequências desenhadas por Melo *et al.* (2017) e Melo *et al.* (2013), respectivamente. Também foi realizada PCR para detecção do gene *blaZ*, que codifica a produção de beta-lactamases no gênero bacteriano em estudo (Rosato *et al.*, 2003) (Quadro 1). Para detecção destes genes foram realizadas reações de PCR seguindo metodologia citada anteriormente no item 4.5.2. Foram utilizados como controle-positivos das reações: *S. aureus* ATCC® 43300 para o gene *mecA*, *mecA* universal e *mecA* variante, e *S. aureus* ATCC® 29213 para o gene *blaZ*.

Quadro 1- Primers e ciclos empregados para amplificação dos genes de resistência aos beta-lactâmicos em *Staphylococcus* spp.

Gene (fragmento)	Sequência dos primers (5'-3')	Ciclos*	Referência
<i>mecA</i> universal (574 pb)	ACGTTACAAGATATGAAGGAAACA TTAATAGCCATCATC	1	MELO <i>et al.</i> , 2017
<i>mecA</i> variante (809 pb)	ACGTTACAAGATATGAAG ACATTAATAGCCATCATC	2	MELO <i>et al.</i> , 2013
<i>mecA</i> (533 pb)	AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC AGTTCTGCAGTACCGGATTTC	3	MURAKAMI <i>et al.</i> , 1991
<i>blaZ</i> (861 pb)	TACAACTGTAATATCGGAGG CATTACACTCTTGGCGGTTT	4	ROSATO <i>et al.</i> , 2003

*1. 95 °C 5 min (94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min) x 30 e 72 °C 10 min. 2. (94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min) x 30 e 72 °C 10 min; 3. 94 °C 4 min (94 °C 30 s, 53 °C 30 s, 72 °C 1 min) x 30 e 72 °C 4 min. 4. 95 °C 2 min (95 °C 1 min, 53 °C 1 min, 72 °C 1 min) x 30 e 72 °C 7 min;

4.7 Aplicação de questionário técnico

O questionário utilizado para a coleta de dados foi dividido em aspectos técnicos quanto às características gerais da propriedade, manejo de ordenha e práticas de manejo higiênico-sanitário, o qual foi aplicado em todas os locais de coleta incluídos neste projeto (Anexo 1). As questões que buscaram avaliar o conhecimento técnico do produtor a respeito da atividade leiteira desenvolvida na propriedade.

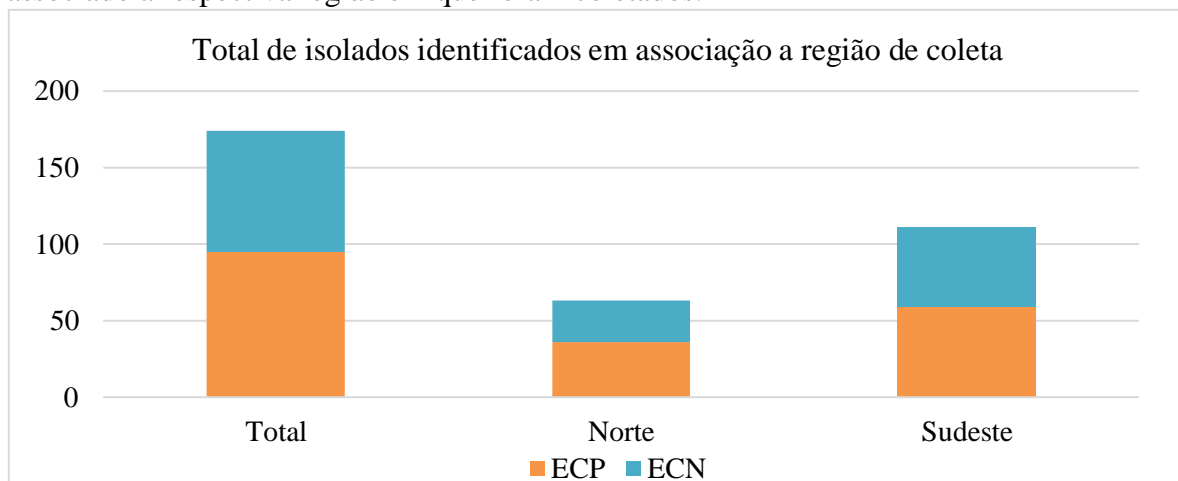
O preenchimento do questionário foi realizado por meio de entrevista com o produtor e através de observações realizadas durante as visitas as propriedades. As variáveis que estavam relacionadas com os processos da atividade foram avaliadas através de respostas afirmativas, quando a atividade era realizada corretamente, ou negativas, quando a atividade era realizada incorretamente, total ou parcial, ou não era realizada.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As espécies de *Staphylococcus* estão entre as principais causadoras de mastite bovina em todo o mundo. *S. aureus* é um dos agentes etiológicos mais comum em infecções de glândula mamária bovina, com alto potencial de disseminação antropozoonótica (Dorneles *et al.*, 2018; Melo *et al.*, 2014, 2018), embora tenha se observado um aumento significativo em espécies de estafilococos coagulase negativa como agente primário em quadros de mastite (Melo *et al.*, 2018; Phophi *et al.*, 2019).

Das 127 amostras de leite coletadas neste estudo, 84,25% (107/127) apresentaram crescimento bacteriano. Destas, foram isoladas e identificadas fenotipicamente 174 cepas pertencentes ao gênero *Staphylococcus*. Destas, 54,6% (95/174) foram confirmadas como coagulase positiva e 45,4% (79/174) coagulase negativa. Dentre as cepas classificadas como ECP, 37,9% (36/95) foram provenientes das amostras coletados no estado de Rondônia e 62,1% (59/95) do Rio de Janeiro e em propriedades localizadas nas divisas com os estados de São Paulo e Minas Gerais. Já os isolados identificados como ECN, foi observado 34,1% (27/79) e 65,9% (52/79), respectivamente (gráfico 1).

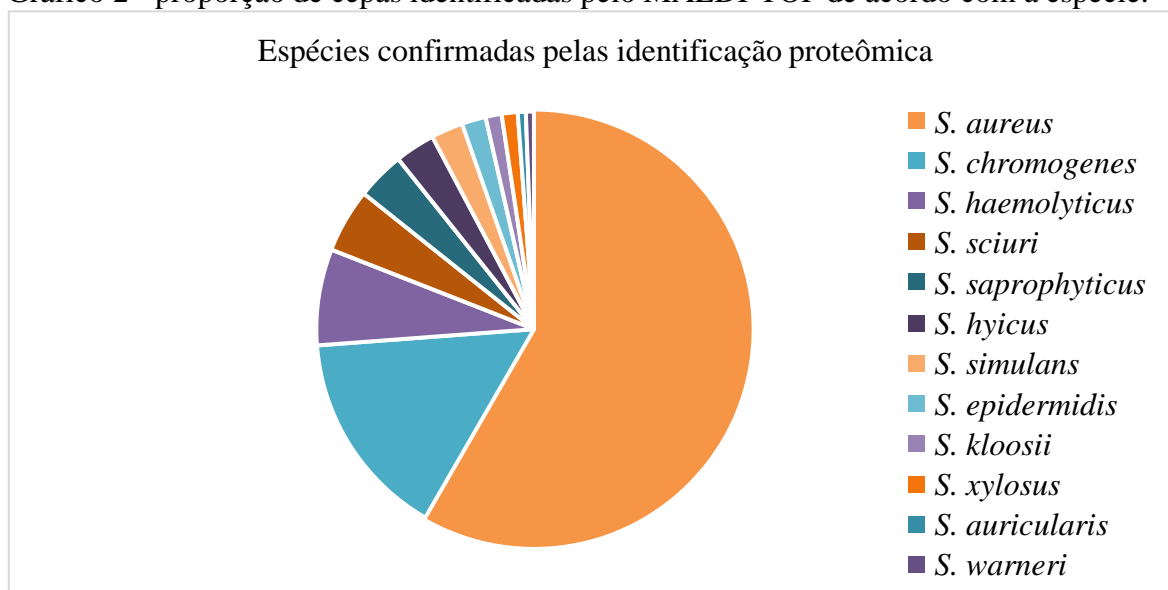
Gráfico 1- quantidade total de isolados identificados fenotipicamente como ECP e ECN, associado a respectiva região em que foram coletados.



Fonte: Arquivo pessoal (2023).

A ferramenta MALDI-TOF permitiu a identificação proteômica de 96,5% das cepas isoladas (168/174). Dentre estas, 58,3% (98/168) foram confirmadas como *Staphylococcus aureus*, 15,47% (26/168) *S. chromogenes*, 7,14% (12/168) *S. haemolyticus*, 4,76% (8/168) *S. sciuri*, 3,57% (6/168) *S. saprophyticus*, 2,97% (5/168) *S. hyicus*, 2,38% *S. simulans*, 1,78% (3/168) *S. epidermidis*, 1,2% *S. kloosii* e *S. xylosus*, e 0,6% (1/168) como *S. auricularis* e *S. warneri* (gráfico 2). Somente 3,44% (6/174) dos isolados não puderam ser identificados.

Gráfico 2 - proporção de cepas identificadas pelo MALDI-TOF de acordo com a espécie.



Fonte: Arquivo pessoal (2023).

O método de identificação proteômica é uma ferramenta extremamente assertiva no diagnóstico de espécimes bacterianas, em especial para o grupo de ECN. Assim como para Melo *et al.* (2018), essa metodologia permitiu neste trabalho a confirmação em nível de espécie em 96,5% (168/174) dos isolados, demonstrando elevado potencial de identificação (tabela 3). Quanto a correlação entre os resultados fenotípicos e proteômicos, foi possível observar que dentre os isolados classificados fenotipicamente como coagulase positiva, apenas 1% (1/93) foi identificado pelo MALDI-TOF como uma espécie do grupo ECN, sendo este *S. chromogenes*. Em contrapartida, dentre aqueles classificados com fenótipo de coagulase negativa, 10% (8/74) foram confirmados proteômicamente como *S. aureus*, espécie rotineiramente tida como coagulase positiva (tabela 3).

A correta diferenciação entre esses dois grupos de estafilococos é de significativa importância epidemiológica. Melo (2017) identificou em seu trabalho cinco *S. aureus* com resultado negativo na prova de coagulase em tubo, este interpretado como uma possível clivagem parcial dada por estafiloquinases, tendo em vista que a expressão da produção de coágulo é regulada por vários genes.

Em contrapartida, Melo (2017) também verificou a presença de seis isolados (2 *S. haemolyticus*, 1 *S. chromogenes*, 1 *S. equorum*, 1 *S. xylosus* e 1 *S. epidermidis*) coagulase negativa que demonstraram resultados positivos no teste de coagulação em tubo. Sobre *S. chromogenes*, Israel *et al.* (2018) observou que 47,2% dos isolados desta espécie apresentaram fenótipo de coagulação de plasma, o que pode induzir a identificação inequívoca de *S. chromogenes* como *S. aureus*.

Estudos demonstram que esta tem elevada semelhança filogenética com demais espécies consideradas coagulase variáveis (Santos *et al.*, 2016). Apesar desse fenótipo de coagulação ser raro nessa espécie, isto pode levar a identificação errônea como *S. aureus*, patógeno de importância crítica a saúde humana (Melo, 2017; Santos *et al.*, 2016). Ainda, fica evidente a importância da ferramenta MALDI-TOF na identificação acurada de espécies do gênero *Staphylococcus* (Soares *et al.*, 2012).

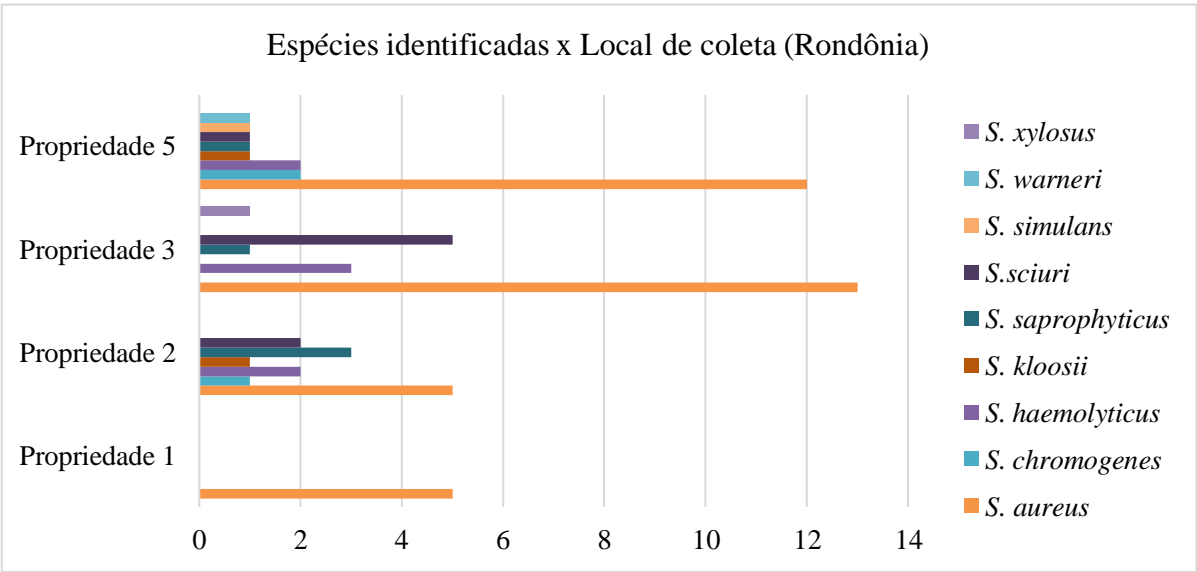
Tabela 3 – Correlação entre a identificação fenotípica e a identificação proteômica.

Identificação fenotípica	Nº	%	Identificação proteômica	Nº	%
ECP	93	55,3	<i>S. aureus</i>	89	95,7
			<i>S. hyicus</i>	3	3,2
			<i>S. chromogenes</i>	1	1,1
			<i>S. chromogenes</i>	25	33,7
			<i>S. haemolyticus</i>	12	16,2
			<i>S. aureus</i>	8	10,8
			<i>S. sciuri</i>	8	10,8
ECN	74	44,7	<i>S. saprophyticus</i>	6	8,1
			<i>S. simulans</i>	4	5,4
			<i>S. epidermidis</i>	3	4
			<i>S. hyicus</i>	2	2,7
			<i>S. kloosii</i>	2	2,7
			<i>S. xylosus</i>	2	2,7
			<i>S. auricularis</i>	1	1,3
			<i>S. warneri</i>	1	1,3

Fonte: arquivo pessoal (2024).

Em relação às espécies isoladas por local de coleta, considerando as amostras obtidas no sul de Rondônia, a propriedade 1 apresentou 100% (5/5) dos isolados identificados como *S. aureus*; na propriedade 2 foram identificados 35,7% (5/14) como *S. aureus*, 21,4% (3/14) *S. saprophyticus*, 14,28% (2/14) *S. haemolyticus* e *S. sciuri*, e 7,14% (1/14) *S. chromogenes* e *S. kloosii*; a propriedade 3 apresentou cerca de 56,5% (13/23) de *S. aureus*, 21,7% (5/23) de *S. sciuri*, 13% (3/23) de *S. haemolyticus*, e 4,34% (1/23) de *S. saprophyticus* e *S. xylosus*, respectivamente; a quinta e última propriedade do estado demonstrou em torno de 57,14% (12/21) de cepas identificadas como *S. aureus*, 9,5% (2/21) como *S. chromogenes* e *S. haemolyticus*, e 4,76% (1/21) como *S. kloosii*, *S. saprophyticus*, *S. sciuri*, *S. simulans* e *S. warneri*. Não foram obtidos isolados da propriedade 4 (gráfico 3).

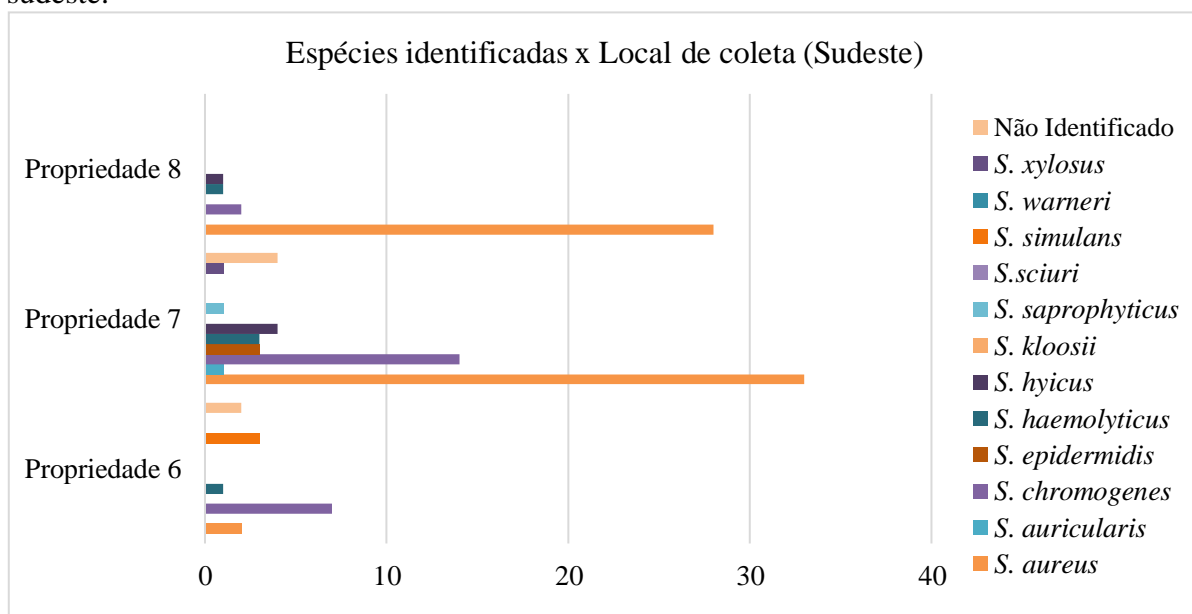
Gráfico 3 - proporção de espécies identificadas de acordo com a origem das amostras no estado de Rondônia.



Fonte: Arquivo pessoal (2023)

Acerca das cepas identificadas em propriedades da região Sudeste, na propriedade 6 (RJ) verificou-se 53,8% (7/13) de isolados da espécie *S. chromogenes*, 23% (3/13) *S. simulans*, 15,4% (2/13) *S. aureus* e 7,7% (1/13) *S. haemolyticus*, sendo que dois dos isolados (2/15) não puderam ser identificados; a propriedade 7 (SP) apresentou 55% (33/60) dos isolados como *S. aureus*, 23,3% (14/60) *S. chromogenes*, 6,6% (4/60) *S. hyicus*, 5% (3/60) *S. epidermidis* e *S. haemolyticus*, e 1,6% (1/60) *S. auricularis*, *S. saprophyticus* e *S. xylosus*, em que 4 cepas isoladas (4/64) não obtiveram identificação. Por fim, na propriedade 8 (MG) foi observada prevalência de 87,5% (28/32) de cepas pertencentes a espécie *S. aureus*, 6,25% (2/32) *S. chromogenes*, e 3,1% (1/32) *S. haemolyticus* e *S. hyicus* (gráfico 4).

Gráfico 4 - proporção de espécies identificadas de acordo com a origem das amostras na região sudeste.

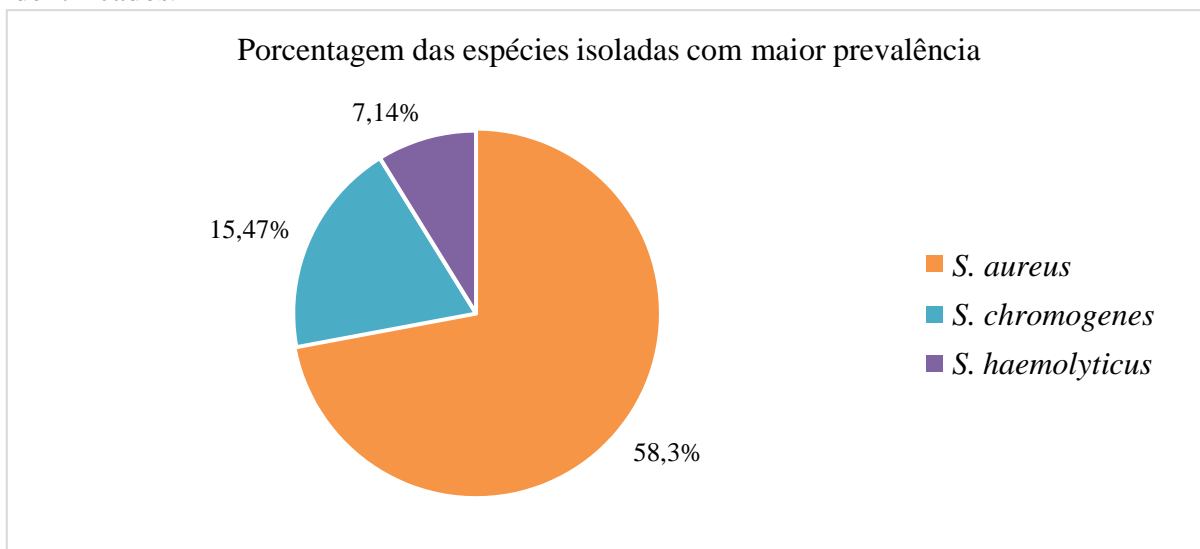


Fonte: Arquivo pessoal (2023)

Com exceção da propriedade 6 e 4, foi possível averiguar que em todas as outras a espécie *S. aureus* foi a mais prevalente, representando 58,3% (98/168) em comparação com as demais identificadas. Seguido desta, a espécie *S. chromogenes* representou em torno de 15,47% (26/168) e *S. haemolyticus* cerca de 7,14% (12/168) (gráfico 5). No entanto, apesar de a espécie *S. chromogenes* ter apresentado uma prevalência relativamente alta, mais de 50% (14/26) foram isoladas a partir de uma única propriedade.

Como já descrito por outros autores, além de *S. aureus*, a maior prevalência em infecções intramamárias bovinas entre as espécies coagulase negativa tem sido atribuída a *S. chromogenes*, *S. simulans*, *S. xylosus* e *S. epidermidis* (Melo *et al.*, 2018). Essa divergência parcial com os dados do presente trabalho pode ser justificada pelas particularidades epidemiológicas de cada região.

Gráfico 5 - porcentagem das espécies com maior prevalência dentre todos os isolados identificados.



Fonte: Arquivo pessoal (2023).

No que diz respeito aos dados referentes a região norte brasileira, um estudo realizado por Dias *et al.* (2022) em 15 propriedades leiteiras no estado de Rondônia foram isoladas 97 cepas bacterianas provenientes de amostras de leite, sendo 63,9% identificadas como *S. aureus* e 26,8% como ECN, corroborando com os dados obtidos neste estudo em que a prevalência de *S. aureus* neste mesmo estado foi de 55,5% (35/63) e 44,4% para ECN (28/63).

Assemelhando-se aos dados obtidos neste trabalho, um estudo realizado na região sudeste do Pará encontrou prevalência de 24,56% dos isolados identificados como *S. aureus* e cerca de 14% como ECN, oriundos de amostras de leite de vacas com mastite clínica e subclínica (Lima *et al.*, 2020).

Em contrapartida, segundo Ferreira *et al.* (2022), a espécie com maior prevalência identificada em amostras de leite oriundas de vacas com mastite subclínica no Acre foi *S. chromogenes* (58,4%), seguido de *S. aureus* (19,8%) e *S. hyicus* (7,9%). De acordo com Israel *et al.* (2018), o qual também observou alta prevalência de *S. chromogenes* (60%) em amostras de leite no estado acreano, esta espécie tem sido a mais isolada nos casos de mastite bovina dentre o grupo dos ENC, indicando uma possível emergência de espécies coagulase negativa como agente principal causador dessa enfermidade.

Quando comparado aos resultados observados na região sudeste, a espécie de maior prevalência encontrada foi *S. aureus*, cerca de 60% (63/105), e 40% (42/105) de espécies coagulase negativa, semelhante aos dados provenientes de Rondônia e demais estudos realizados nesta região. Aproximando-se destes dados, Alencar *et al.* (2014) observaram a presença de 59% de cepas coagulase negativa e 41% coagulase positiva, sendo que destes 24,28% foram identificados como *S. aureus*, a partir de amostras de leite bovino com mastite.

Entretanto, Noel *et al.* (2016) ao avaliarem amostras de leite bovino mastístico oriundos da região Sul Fluminense do Rio de Janeiro, verificaram prevalência de 48,3% de *S. xylosum*, 18,35% de *S. haemolyticus*, 11,1% de *S. aureus*, 9,17% de *S. intermedius* e 8,2% de *S. simulans*, demonstrando uma significativa diferença entre a presença de espécies coagulase negativa e *S. aureus*, a espécie de maior relevância dentro do grupo de espécies coagulase positiva.

Apesar da frequência de isolados identificados como *S. aureus* em ambas as regiões, norte e sudeste, ter sido mais elevada em comparação com as demais, a porcentagem de espécies ECN verificadas neste estudo (41%) corrobora com dados obtidos por Walid *et al.* (2021), o

qual verificou uma frequência de 56,36% de espécies ECN em amostras de leite de animais com mastite subclínica no Egito, sendo *S. epidermidis* (48,4%), *S. saprophyticus* (32,3%) e *S. haemolyticus* (19,4%) as mais prevalentes. De maneira semelhante, Bhavana e Chaitanya (2022), constataram que dentre as espécies de *Staphylococcus* obtidas de amostras de leite bovina na Índia, 64% eram coagulase negativa enquanto apenas 36% foram identificadas com *S. aureus*.

Essas espécies geralmente estão associadas à ocorrência de mastite subclínica leve, além de fornecerem proteção ao tecido mamário contra infecção causada por outros patógenos de maior importância clínica. Contudo, tem sido observada uma forte semelhança entre os quadros de mastite causados por *S. aureus* e ECN, sendo que estes tendem a persistir na glândula mamária assim como *S. aureus* (Sender *et al.*, 2017).

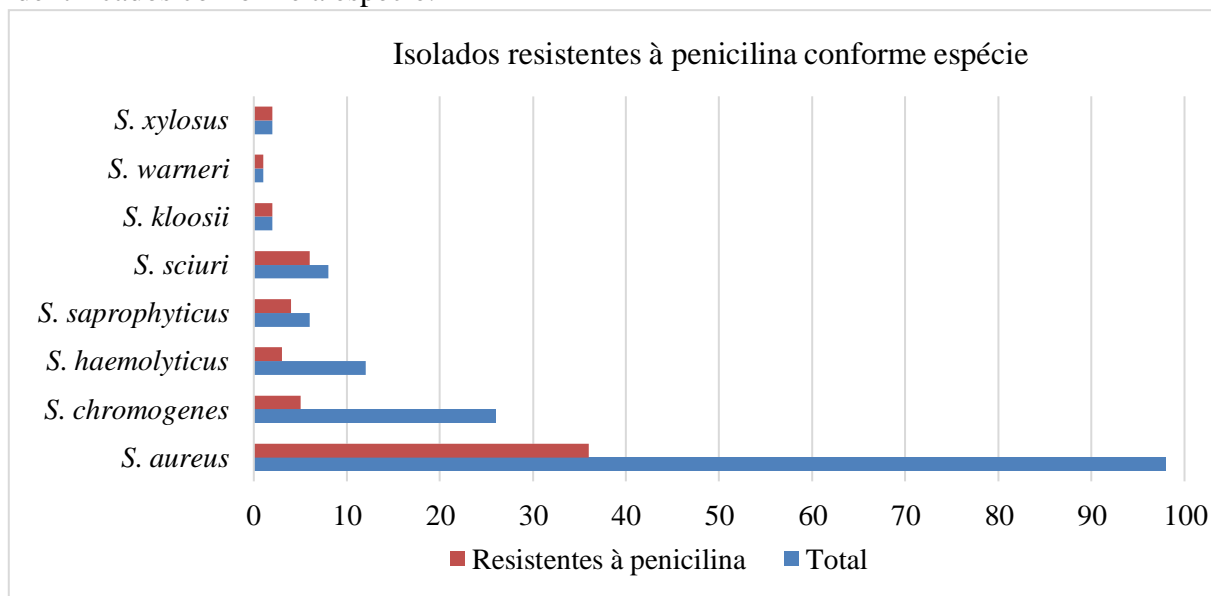
Ainda que ECN já tenham sido categorizados como agentes secundários e de menor importância na mastite bovina (Srithanasuwan *et al.*, 2023), essas observações têm significativa relevância, tendo em vista emergência desses como agentes primários na etiologia da mastite bovina e carreadores de genes de resistência (Khazandi *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2019; Melo *et al.*, 2018). Além disso, evidências apontam para uma forte correlação entre espécies coagulase negativa presentes na glândula mamária bovina e a habilidade de produzir biofilme (Felipe *et al.*, 2017).

A produção de biofilme é fator que impacta no prognóstico dos quadros de mastite, diretamente relacionada com aumento da capacidade de resistência bacteriana e dificuldade em erradicar agentes patogênicos do rebanho (Marques *et al.*, 2017; Souza *et al.*; 2024). Além do mais, promove aderência significativa em utensílios e equipamentos, apesar da lavagem periódica, tornando-se fonte para o estabelecimento de novos quadros de mastite (Marques *et al.*, 2017).

O principal mecanismo de ação de biofilme associado ao desenvolvimento de resistência se dá pela formação de barreira química e física frente a ação de antimicrobianos, bem como limitação de receptores bacterianos alvos destas substâncias. Sugere-se que a neutralização da ação dos fármacos possa promover diluição para concentrações subinibitórias quando alcançadas as células bacterianas (Marques *et al.*, 2017).

Quanto à detecção fenotípica de resistência antimicrobiana, foi observada somente a penicilina em 35,1% (59/168) das cepas identificadas. Analisando de acordo com a espécie, *S. aureus* apresentou 36,7% (36/98) das cepas resistentes a penicilina. No que se refere as espécies de ECN, *S. chromogenes* demonstrou resistência em 19,2% (5/26) dos isolados, *S. haemolyticus* 25% (3/12), *S. saprophyticus* 66,6% (4/6), *S. sciuri* 75% (6/8), e *S. kloosii* (2/2), *S. warneri* (1/1) e *S. xylosus* (2/2) em 100% das cepas, respectivamente (gráfico 6).

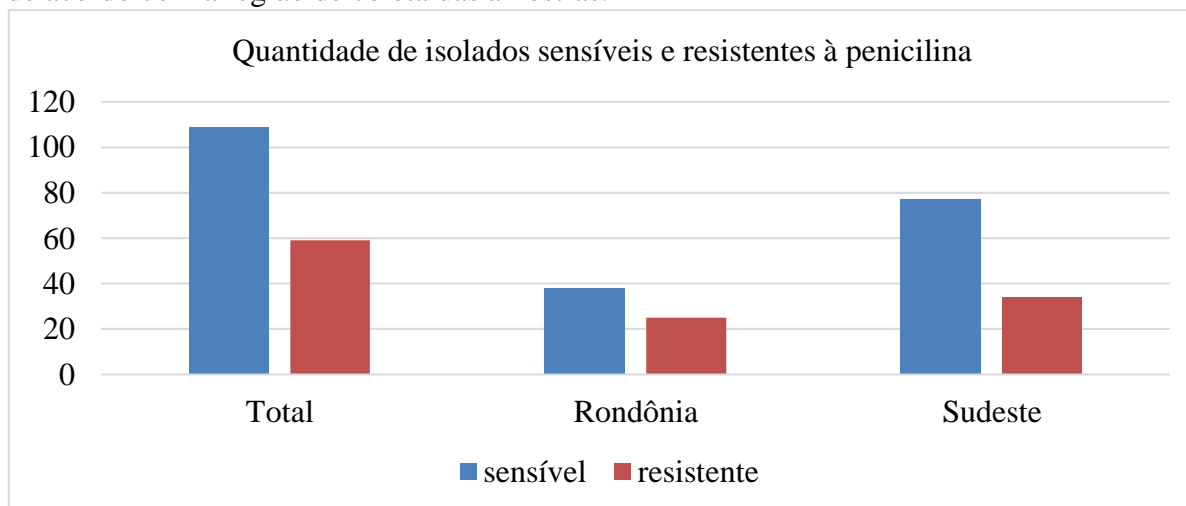
Gráfico 6 - número de isolados resistentes à penicilina em relação ao total de isolados identificados conforme a espécie.



Fonte: Arquivo pessoal (2023).

Considerando a prevalência total de cepas resistentes à penicilina neste estudo, 42,37% (25/59) tiveram origem nas amostras coletadas no estado de Rondônia e 57,62% (34/59) na região Sudeste (gráfico 7).

Gráfico 7 - quantidade de isolados identificados com resistência fenotípica à penicilina total e de acordo com a região de coleta das amostras.



Fonte: Arquivo pessoal (2023).

No estado rondoniense, Dias *et al.* (2022) observou cerca de 14,5% e 29,8% de resistência à penicilina para *S. aureus* e ENC, respectivamente; e 3,8% de resistência à oxacilina para ECN. Já Ferreira *et al.* (2022), verificou em torno de 71,4% e 38,9% de resistência à penicilina para ECP e ECN, respectivamente; quanto a cefoxitina, 14,3% em ECP e 26,4% em ECN. É possível que esta divergência de dados se dê pela microrregião do estado em que cada

estudo foi realizado, tendo em vista as diferenças de manejo e medicação de uso profilático e terapêutico nos quadros de mastite.

Na região fluminense, foi verificada uma variação de resistência à penicilina em *Staphylococcus* spp. de 80% (Alencar *et al.*, 2014) a 99,5% (Noel *et al.*, 2016). Este último ainda observou cerca de 37,7% e 26,1% de resistência à cefoxitina e oxacilina, respectivamente. Corroborando com os dados obtidos neste trabalho, Marques *et al.* (2017) em estudo acerca da resistência aos beta-lactâmicos em *S. aureus* nessa mesma região, verificou 100% de resistência fenotípica à penicilina, ao passo que a sensibilidade à cefoxitina e oxacilina foi observada em 100% dos isolados.

Em comparação com dados das demais regiões do país, nota-se que a prevalência de resistência difere significativamente entre as espécies de *Staphylococcus* e quanto ao princípio ativo. Um levantamento realizado na região da Zona da Mata no estado de Minas Gerais demonstrou uma frequência de resistência à penicilina de 78,9% e 100% em *S. aureus* e ECN, respectivamente, ao passo que a resistência à oxacilina foi de 75% para as espécies coagulase negativa frente a 2,8% em *S. aureus* (Dorneles *et al.*, 2018).

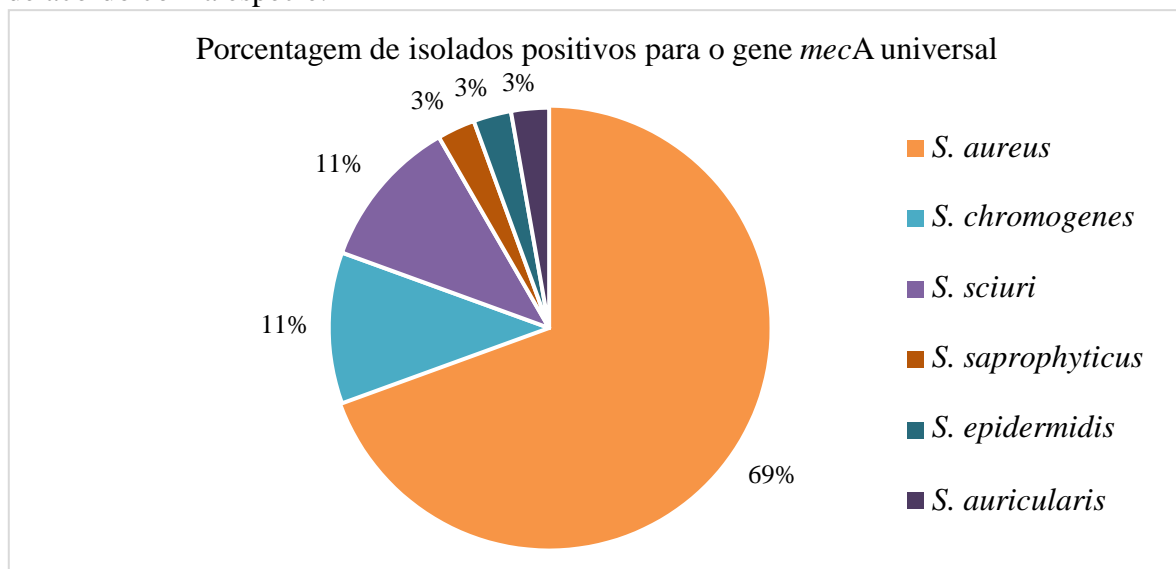
A elevada resistência à penicilina encontrada por diversos autores possivelmente está relacionada com o uso frequente ao longo dos últimos anos na medicina veterinária, especialmente na bovinocultura (Dorneles *et al.*, 2018), e embora seu uso não seja mais priorizado, muitos produtores ainda utilizam devido ao baixo custo (Marques *et al.*, 2017). Vale ressaltar que o fácil acesso aos antimicrobianos pelos produtores e uso inadequado no tratamento de mastite pode ser associado à emergência de cepas resistentes (Phophi *et al.*, 2019).

A detecção dos genes de resistência neste trabalho demonstrou 7,5% (13/173) de isolados positivos para o gene *blaZ* e 20,8% (36/173) positivos para o gene *mecA* universal. Para este último gene, a prevalência de cepas positivas detectadas no estado rondoniense foi de aproximadamente 15%, sendo que até o presente momento não há dados na literatura acerca da detecção de genes de resistência bacteriana para o estado.

Em contrapartida, a prevalência na região fluminense foi cerca de 25% para o gene *mecA* e 7,5% para *blaZ*, enquanto Soares *et al.* (2012) verificaram a presença do gene *mecA* em 13,8% e 55% de *blaZ* em ECN. Já Marques *et al.* (2017) e Soares *et al.* (2017) detectaram 70% e 40% de *S. aureus* carreadores do gene *blaZ*, respectivamente.

Em relação a prevalência entre as espécies em que foi detectado o gene *blaZ*, 46,1% (6/13) foram *S. aureus* e 53,8% (7/16) ECN. Para o gene *mecA* universal, 69,4% (25/36) foram *S. aureus* e 30,6% (11/36) ECN (gráfico 8).

Gráfico 8 – Porcentagem de isolados em que foi detectada a presença do gene *mecA* universal de acordo com a espécie.



Fonte: Arquivo pessoal, 2024.

Como já descrito por diversos autores, a ampla resistência à penicilina mediada pelo gene *blaZ* se deve principalmente ao uso em larga escala desta droga nos sistemas de produção animal. Contudo, a emergência de resistência à penicilina acompanhada de mecanismos de resistência às penicilinas semissintéticas e outras classes de antimicrobianos se torna um desafio no tratamento de infecções causadas por esses agentes (Soares *et al.*, 2012). Associado a isso, deve se levar em conta o potencial zoonótico e risco à saúde pública dada pela transferência de genes de resistência a microbiota humana pelo consumo de leite cru e derivados (Ajose *et al.*, 2022).

Apesar das proibições impostas pela legislação brasileira (BRASIL, 2017), a comercialização de leite cru e produtos lácteos artesanais não inspecionados por pequenos produtores ainda é realidade em boa parte do país, como demonstrado por Pena *et al.* (2020). Nesse estudo, os autores identificaram a presença de bactérias patogênicas de importância em saúde pública acima dos limites estabelecidos pela legislação em amostras de leite cru e queijo artesanal, além de detectarem isolados multidroga-resistente (Pena *et al.*, 2020). Isto evidencia importância da cadeia produtiva de alimentos como fonte de agentes patogênicos e, potencialmente, genes de resistência antimicrobiana.

Quanto ao gene *mecA* e suas variações, a amplificação destes é considerada como padrão-ouro para a identificação de MRSA (CLSI, 2024). A ocorrência de mutações pontuais nesse gene pode impedir o adequado anelamento dos *primers* e, consequentemente, a confirmação de sua presença nos isolados testados (Melo *et al.*, 2014). Este fato impacta diretamente na confiabilidade dos resultados, além de dificultar o monitoramento de cepas carreadoras desse mecanismo.

Dentre os isolados positivos na amplificação do gene *mecA* universal neste estudo, 13,8% (5/36) amplificaram o gene *mecA* clássico descrito por Murakami *et al.* (1991), ao passo que não houve resultados positivos para o gene *mecA* variante descrito por Melo *et al.* (2013). Estas observações podem ser explicadas pelo alto índice de mutabilidade apresentado por esse gene (Melo, 2013, 2017; Souza *et al.*, 2020).

É sabido que o gene *mecA* variante possui alta correlação com isolados provenientes de amostras bovinas, como já demonstrado por Melo (2013) e Melo *et al.* (2014). Nesse contexto, o ambiente de produção animal de bovinocultura leiteira representa um desafio quanto a

emergência de novas variações de genes mediadores de resistência beta-lactâmica, especialmente considerando-se o uso frequente desta classe no controle e prevenção de mastite subclínica (Souza *et al.*, 2020).

Por outro lado, já foi evidenciada a presença do gene variante em isolados obtidos de amostras de carne suína e frango, bem como das mãos de ordenhadores (Melo *et al.*, 2019). Isto demonstra a capacidade de circulação e adaptação em ambientes diversos das cepas portadoras desse gene, o que torna o controle da resistência a classe de beta-lactâmicos cada vez mais desafiador.

Ainda, espécies do gênero *Staphylococcus* são comensais de uma variada gama de animais, incluindo cães, gatos, coelhos, equinos, suínos, frangos, bovinos e algumas espécies exóticas (Souza *et al.*, 2020). Logo, é possível que esses agentes atuem como reservatórios de genes de resistência e permitam a transmissão bidirecional entre diferentes espécies animais, considerando a baixa especificidade por hospedeiros (Khazandi *et al.*, 2018).

É importante enfatizar que, apesar de não haver resistência fenotípica à cefoxitina e oxacilina, obtiveram-se resultados positivos para o gene *mecA* (36/173). Isto pode ser justificado devido à heteroresistência apresentada por determinadas populações bacterianas, implicando que nem todos os indivíduos portadores desse mecanismo o expressaram fenotipicamente (Melo *et al.*, 2014; Pereira *et al.*, 2021).

Como já descrito por outros autores, as divergências entre resultados fenotípicos e genotípicos sugerem a possibilidade de mecanismos de resistência diversos, tornando necessária a investigação mais profunda destes (Melo *et al.*, 2018). A exemplo, Alves *et al.* (2020) em seu estudo detectaram a presença do gene *mecC* em 26% de *S. aureus* isolados de amostras de leite bovino, sendo que nenhum dos isolados havia apresentado resistência fenotípica.

O gene *mecC* já foi detectado tanto a partir de amostras de humanos quanto de animais de produção. Apesar de haver 70% de compatibilidade com seu homólogo *mecA* (Souza *et al.*, 2020), os métodos diagnósticos de rotina não são capazes de identificar esse gene, o que representa um grave entrave a detecção desse gene. Além disso, fenotipicamente, o gene *mecC* é relativamente mais susceptível à oxacilina e mais resistente à cefoxitina quando comparado ao *mecA* (Blair *et al.*, 2015).

Khazandi *et al.* (2018) detectou em seu estudo a presença de homólogos de *mecA* em espécies de ECN oriundas de amostras de leite bovino através da técnica de sequenciamento genético total, enfatizando que o uso de metodologias convencionais como a PCR não possibilitou tal identificação.

Nesse mesmo estudo, quando comparado os isolados de origem animal e humana, foi observada elevada semelhança entre os genomas (Khazandi *et al.*, 2018). Estas semelhanças demonstram que possivelmente existe relação clonal entre estes isolados e é fundamental o entendimento deste aspecto, pois permite determinar a possível fonte e rota de infecção, modo de transmissão e analisar a efetividade das medidas de controle (Soares *et al.*, 2021).

A elevada ocorrência de cepas resistentes fenotipicamente em conjunto com a baixa detecção de genótipos de resistência também pode ser interpretada como indicativo de alterações genéticas dadas por mutações, ação de bacteriófagos e presença de transposons (Pereira *et al.*, 2021). Devido a esta alta heterogeneidade é que se considera a confirmação da presença do gene *mecA* fundamental na identificação de MRSA (Melo *et al.*, 2018; Souza *et al.*, 2020).

Para o homem, a infecção por MRSA é um sério problema de saúde pública, principalmente em ambientes hospitalares. Esses agentes são associados desde quadros de dermatite a infecções sistêmicas. A OMS reportou índices de resistência aos beta-lactâmicos provocada por MRSA entre 80 a 100% na África, cerca de 90% nas Américas e 60% na Europa (Mcewen e Collignon, 2018). De acordo com Polianciuc *et al.* (2020), na Europa estima-se que

39% dos óbitos atribuídos a infecção por bactérias resistentes sejam devido a resistência a colistina ou carbapenêmicos, este último pertencente a classe dos beta-lactâmicos.

Nesse viés, a presença de MRSA pode resultar em repostas clínicas ineficazes frente aos tratamentos, os quais frequentemente são portadores de genes de resistência a outras classes de antimicrobianos como macrolídeos, aminoglicosídeos, tetraciclina e lincosamidas (Phophi *et al.*, 2019), frequentemente utilizadas no setor de produção animal. Ademais promove a perpetuação do agente no ambiente (Melo *et al.*, 2019).

Os dados obtidos neste trabalho demonstraram que aproximadamente 60% das propriedades utilizam compostos exclusivamente a base de aminoglicosídeos ou em associação com outros princípios ativos, cerca de 40% cefalosporinas de terceira geração e penicilinas, isoladas ou em associação, e em torno de 15% combinações de macrolídeos e polipeptídeos a aminoglicosídeos. Vale ressaltar que mais de 70% desses produtores realizam terapia de vaca seca através da aplicação de bisnaga intramamária, as quais geralmente tem os aminoglicosídeos como base farmacológica.

Tomazi e Santos (2020) ao avaliarem as principais classes de antimicrobianos administradas para o tratamento de mastite bovina na região sudeste do país, observaram que os aminoglicosídeos apresentaram a maior incidência de uso na via intramamária, seguidos por combinações de tetraciclina, aminoglicosídeos e polipeptídeos, e por cefalosporinas de terceira geração. Quanto ao tratamento sistêmico, as fluoroquinolonas tiveram maior incidência, seguidas por fármacos a base penicilina e combinações de sulfonamidas com pirimidinas.

Nesse contexto, ao caracterizar o perfil dos produtores incluídos neste estudo, com exceção da propriedade 6, a qual desenvolve atividade de pesquisa científica na área de produção leiteira, todas as demais são qualificadas como agricultura familiar e tem como atividade predominante a produção de leite. Nesse sentido, das propriedades familiares, 28,5% dos produtores têm nível de escolaridade ensino médio (2/7) e graduação (2/7); e 42,8% têm nível de escolaridade ensino fundamental (3/7).

Avaliando-se as práticas de manejo, 37,5% (3/8) realizam ordenha manual e 62,8% (5/8) possuem ordenhadeira mecânica. Quanto ao manejo sanitário, somente 37,5% (3/8) afirmaram fazer a sanitização dos equipamentos de ordenha, ao passo que 75% (6/8) disseram efetuar a lavagem dos tetos com água previamente a ordenha. Com relação ao pré-dipping, 62,8% (5/8) fazem uso desta prática e 50% (4/8) realizam o pós-dipping. Para a secagem dos tetos, apenas 37,5% (3/8) afirmaram utilizar papel-toalha, enquanto 62,8% (5/8) fazem uso de toalhas de tecido.

Em relação a detecção de mastite no rebanho, 50% (4/8) realizam o teste da caneca de fundo preto para detecção de mastite clínica diariamente, enquanto 37,5% (3/8) fazem o monitoramento de mastite subclínica através do CMT (*California Mastitis Test*) quinzenal e 12,5% (1/8) mensal. Apenas em uma das propriedades é realizado o controle de casos de mastite e dos protocolos de tratamento administrados. Quanto a administração de antimicrobianos para tratamento dos casos de mastite, 100% afirmaram fazer o uso desta prática, embora apenas 25% (2/8) relatou já haver realizado cultura bacteriana e antibiograma para diagnóstico e direcionamento do tratamento.

Sabe-se que o uso de antimicrobianos no tratamento de infecções e como profilaxia no manejo de animais de produção é uma prática rotineira e culturalmente bem estabelecida entre os produtores (Alencar *et al.*, 2014). Frequentemente observa-se a administração de subdoses, suspensão de tratamento antes do prescrito, descarte inadequado de fármacos, dentre outros (Tomazi e Santos, 2020). A utilização dessas substâncias de forma imprudente reflete em questões ligadas a saúde pública, especialmente resistência antimicrobiana (Alencar *et al.*, 2014; Souza *et al.*, 2024).

A conscientização dos produtores e profissionais envolvidos na cadeia de produção leiteira sobre a adoção de práticas de manejo sanitário, bem como a correta aplicação destas, e

o uso racional dos antimicrobianos é fundamental na busca do controle e prevenção dos quadros de mastite, além de impactar diretamente no combate à emergência de bactérias resistentes (Dubenczuk, 2019).

Jones *et al.* (2015) ao avaliarem condutas relacionadas à administração de antimicrobianos por produtores leiteiros na Inglaterra observaram que 70% dos produtores acreditam que se deve reduzir o uso de antimicrobianos, todavia a maior motivação é minimização de custos. Aproximadamente 90% afirmam adotar práticas eficientes de manejo, contudo 50% alegaram não possuir conhecimento acerca de guias práticos de uso de antimicrobianos em sistemas de produção leiteira, bem como 30% disseram não ter ciência quanto à restrição do uso de cefalosporinas de terceira e quarta geração em ambientes de produção e 14% admitiram não seguir a recomendação de dosagem dos fármacos.

Apesar de a realidade brasileira divergir de outros países, a carência de conhecimento técnico a respeito dessa temática está presente em grande parte do setor de produção de leite do país (Dubenczuk, 2019). Segundo Tomazi e Santos (2020), a administração de antimicrobianos sistêmicos em casos de mastite clínica moderada ocorreu em 65,2% dos casos avaliados, sendo esta uma conduta controversa. Observaram também elevada frequência de associação de entre todas as classes antimicrobianas e utilização de doses acima da recomendação terapêutica.

Em especial quando se fala de mastite clínica, é comum o estabelecimento de abordagens de tratamento equivocadas e incompatíveis com as diretrizes de uso de antimicrobianos. Geralmente todos os casos de mastite são tratados com o mesmo protocolo terapêutico, independente de diagnóstico laboratorial, resultando em falha na cura clínica, desenvolvimento de quadros crônicos, seleção de agentes resistentes e disseminação destes ao longo da cadeia produtiva (Souza *et al.*, 2024).

Particularmente para *S. aureus*, devido a sua habilidade em penetrar e persistir nos tecidos da glândula mamária, o desafio em obter sucesso terapêutico é ainda maior (Souza *et al.*, 2024). A taxa de cura no tratamento de mastite causada por esse agente é de aproximadamente 10 a 30% (AJose *et al.*, 2022), salientando a importância de se determinar a etiologia corretamente em cada caso, bem como o estabelecimento de terapia antimicrobiana que possibilite êxito no tratamento (Souza *et al.*, 2024).

Vale enfatizar que os fármacos de uso veterinário possuem os mesmos princípios ativos de medicações utilizadas na medicina humana (Dorneles *et al.*, 2018; McEwen e Collignon, 2018; Sharma *et al.*, 2023). A exemplo, colistina, fluoroquinolonas e macrolídeos têm ampla aplicação no setor de produção animal, sendo que essas drogas são consideradas pela OMS de extrema importância no tratamento de infecções em humanos (McEwen e Collignon, 2018).

Sob tal perspectiva, entre 40 a 90% das drogas administradas aos animais são excretadas nas fezes e urina na forma de compostos bioativos. Tais dejetos tornam-se fontes de contaminação para todo o ecossistema associado ao ambiente de produção, incluindo solo, corpos d'água, vegetação e demais espécies presentes (Polianciuc *et al.*, 2020). Esses resíduos antimicrobianos exercem pressão seletiva não somente sobre a microbiota dos animais, mas também do solo, de plantas e da água, obrigando a adaptação destes através de mecanismos de resistência (McEwen e Collignon, 2018).

Zhao *et al.* (2021) ao avaliar a presença de genes de resistência a partir de amostras de dejetos oriundos de estação de tratamento de esgoto detectou 213 subtipos de genes mediadores de resistência antimicrobiana, representando quase a totalidade dos principais genes encontrados em amostras humanas e animais. Acredita-se que esses compostos proporcionem a expressão genética desses mecanismos dada a presença de altas concentrações de antimicrobianos, os quais advêm do descarte de dejetos comunitários, hospitalares e de setores de produção animal.

A interação entre a fração bioativa dessas drogas e o ambiente depende de muitos fatores, como pH, concentração de compostos de carbono orgânico, teor de água, perfil do solo,

entre outros. A degradação das substâncias é dada tanto por elementos bióticos, como fungos e bactérias, quanto por processos físico-químicos de oxidação, hidrólise e redução. No caso das penicilinas e cefalosporinas, por exemplo, possuem alta susceptibilidade à hidrólise e baixa capacidade de absorção pelo solo. Em contrapartida, apresentam tendência em formar complexos ligados a cátions, acumulando-se em sedimentos e dejetos (Polianciuc *et al.*, 2020).

Particularmente em relação as cefalosporinas de terceira geração, o ceftiofur é uma substância largamente utilizada no tratamento de diversas afecções em animais de produção, especialmente devido ao amplo espectro de ação, elevada eficiência clínica e período zero de carência para animais em lactação (Mcewen e Collignon, 2018). Nesse sentido, o aumento da emergência de cepas resistente a esta classe pode ser atribuído a facilidade em que se disseminam as partículas bioativas acumuladas no ambiente, principalmente através da água (Polianciuc *et al.*, 2020).

O vasto alcance desses genes altera significativamente o microbioma de diversos nichos ecológicos, demonstrando a profunda interconexão entre os mais variados ambientes. Já foi constatado que a origem do mecanismo de resistência de muitas bactérias patogênicas deriva de fontes naturais, incluindo o solo. Dessa forma, existem múltiplas vias que proporcionam a exposição humana a genes de resistência (Mcewen e Collignon, 2018).

Um estudo realizado ao longo de 15 anos acerca dos impactos da aplicação de dejetos animais e fertilizantes químicos na microbiota e genes de resistência bacteriana presentes no solo demonstrou um aumento significativo na diversidade e abundância destes genes quando utilizada fertilização com esterco, especialmente aos aminoglicosídeos e tetraciclinas. Sugere-se que o uso a longo prazo de fertilizantes naturais favoreça a manutenção, diversificação e disseminação desses genes no ambiente (Wang *et al.*, 2020).

A elevada quantidade de elementos genéticos móveis presente em solos fertilizados indica a capacidade de transferência destes entre bactérias provenientes dos dejetos e a microbiota natural ambiental, considerando que a maioria das bactérias encontradas no esterco não persistem por longos períodos no ambiente (Furlan *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020). Acredita-se que maiores concentrações de nutrientes no ambiente também seja responsável pela elevação desta capacidade, possivelmente devido ao aumento da taxa metabólica bacteriana (Medina, 2018; Zhao *et al.*, 2021).

Dessa maneira, os microrganismos do solo são uma importante fonte de mecanismos de resistência que sofrem pressão de seleção não somente por substâncias antimicrobianas, mas também por compostos químicos como metais pesados e biocidas (Furlan *et al.*, 2020; Medina, 2018; Wang *et al.*, 2020).

Quando avaliado os setores de criação de animais de produção também se observa grande quantidade de bactérias resistente e genes de resistência, em particular enterobactérias produtoras de ESBL (beta-lactamase de espectro estendido), MRSA e VRE (*Enterococcus* vancomicina-resistente) (Furlan *et al.*, 2020; Souza *et al.*, 2024). Essas áreas, onde a deposição de dejetos animais é constante, têm apresentado concentrações criticamente mais elevadas tanto de bactérias multidroga-resistentes quanto de genes de resistência quando comparadas com outros setores (Furlan *et al.*, 2020).

Nessa perspectiva é plausível considerar o setor de produção animal como potencial reservatório de bactérias carreadoras de genes de resistência, sendo um local favorável ao compartilhamento desses mecanismos entre agentes patogênicos e a microbiota ambiental (Salam *et al.*, 2023; Souza *et al.*, 2024). Diversas rotas de disseminação configuram risco a saúde humana, dentre elas os produtos lácteos, um dos alimentos mais consumidos no mundo (Berglund, 2015; Furlan *et al.*, 2020).

O uso responsável de antimicrobianos é um conceito que envolve múltiplos fatores, os quais devem ser abordados de maneira conjunta (Regan *et al.*, 2023). No que diz respeito à bovinocultura de leite, a terapia antimicrobiana é indispensável na manutenção da saúde da

glândula mamaria, tal qual no bem-estar animal (Hoque *et al.*, 2020). Entretanto as abordagens terapêuticas devem ter em vista múltiplos fatores, sobretudo a etiologia, perfil de sensibilidade antimicrobiana e a implementação de medidas de manejo sanitário eficientes (Souza *et al.*, 2024).

Logo, para se alcançar uma mudança significativa da realidade atual é preciso desenvolver uma profunda mudança comportamental e cultural nos profissionais envolvidos e produtores. A começar por uma abordagem mais proativa que reativa, como a implementação de medidas de biossegurança, melhora das práticas de higiene, protocolos de vacinação, entre outros (Regan *et al.*, 2023).

6 CONCLUSÃO

O presente trabalho possibilitou a análise de amostras de leite bovino na região sul do Estado de Rondônia, o que é de extrema relevância dada a escassez de informações sobre o tema produzidas na Região Norte.

Foi possível caracterizar o perfil fenogenotípico de resistência antimicrobiana aos beta-lactâmicos mediada pelo gene *mecA* em *Staphylococcus* utilizando o primer universal desenvolvido no LABAC-VET.

A detecção do gene *mecA* a partir de amostras de leite bovino corrobora a necessidade de caracterização dos ambientes de produção animal como fontes de disseminação de agentes patogênicos e genes de resistência visando atender aos princípios de interdisciplinaridade da Saúde Única.

Os resultados obtidos proporcionaram a comparação tanto do perfil de microrganismos isolados quanto das propriedades incluídas no estudo, evidenciando a necessidade de abordagens direcionadas a atender as particularidades de cada região e estudos mais profundos acerca do tema, principalmente quanto a detecção precisa do gene *mecA*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AJOSE, Daniel Jesuvenu *et al.* Combating bovine mastitis in the dairy sector in an era of antimicrobial resistance: ethno-veterinary medicinal option as a viable alternative approach. **Frontiers in veterinary science**, v. 9, p. 800322, 2022.
- ALENCAR, Tatiani Abreu *et al.* Aspectos das condições higiênico-sanitárias em unidades leiteiras em municípios do estado do Rio de Janeiro, Brasil e análise dos agentes bacterianos envolvidos na etiologia das mastites. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 36, n. 2, p. 199-208, 2014.
- ALMEIDA, Mariza de; BACHA, Carlos José Caetano. Literatura sobre eficiência na produção leiteira brasileira. **Revista de Política Agrícola**, v. 30, n. 1, p. 20, 2021.
- ALMEIDA, Mariza *et al.* Pecuária Leiteira do Rio Grande do Sul: uma análise espacial da produtividade a partir da década de 1980. **COLÓQUIO-Revista do Desenvolvimento Regional**, v. 19, n. 1, jan/mar, p. 123-147, 2022.
- ALVES, Maria de Fatima NF *et al.* First report of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* harboring mecC gene in milk samples from cows with mastitis in southeastern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 51, p. 2175-2179, 2020.
- ANDRADE, Ricardo Guimarães *et al.* Zoneamento dos efeitos do estresse térmico em vacas leiteiras no Sudeste do Brasil. **Revista Contemporânea**, v. 3, n. 12, 2023.
- ANDRADE, Ricardo *et al.* Evolução Recente da Produção e da Produtividade Leiteira no Brasil. **Revista Foco (Interdisciplinary Studies Journal)**, v. 16, n. 5, 2023.
- ARAUJO, A. de S.; SILVA, O. N.; LEAL, R. D. One health-a saúde única sob a percepção do estudante de medicina veterinária do Distrito Federal. **Revista ciência e saúde animal**, v. 2, n. 2, p. 10-18, 2020.
- ASHRAF, Aqeela; IMRAN, Muhammad. Causes, types, etiological agents, prevalence, diagnosis, treatment, prevention, effects on human health and future aspects of bovine mastitis. **Animal health research reviews**, v. 21, n. 1, p. 36-49, 2020.
- AZOOZ, M. F.; EL-WAKEEL, Safaa A.; YOUSEF, H. M. Financial and economic analyses of the impact of cattle mastitis on the profitability of Egyptian dairy farms. **Veterinary world**, v. 13, n. 9, p. 1750, 2020.
- BEN, Yujie *et al.* Human health risk assessment of antibiotic resistance associated with antibiotic residues in the environment: A review. **Environmental research**, v. 169, p. 483-493, 2019.
- BERGLUND, Björn. Environmental dissemination of antibiotic resistance genes and correlation to anthropogenic contamination with antibiotics. **Infection ecology & epidemiology**, v. 5, n. 1, p. 28564, 2015.
- BERT, F.; BIALEK-DAVENET, S.; LEFLON-GUIBOUT, V.; NOUSSAR, L.; NICOLAS-CHANOINE, M.-H. Frequency and epidemiology of extended-spectrum -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* isolates susceptible to third-generation cephalosporins or to aztreonam. **Médecine et maladies infectieuses**, v. 44, p. 76-78, 2014.
- BESSA, V.C.; LARANJEIRA, B.J. Mecanismos de resistência bacteriana em cocos Gram positivos. **Revista Científica UNIFAGOC**, v. 1, p.40-48, 2020.
- BHAVANA, R. N.; CHAITANYA, R. K. Identification of coagulase negative staphylococcal species from bovine mastitis in India. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v. 23, n. 4, p. 358, 2022.
- BLAIR, Jessica MA *et al.* Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature reviews microbiology**, v. 13, n. 1, p. 42-51, 2015.
- BORGES, Marcio Silva; GUEDES, Cezar Augusto Miranda; CASTRO, Maria Cristina Drumond. Programa de assistência técnica para o desenvolvimento de pequenas propriedades

leiteiras em Valença-RJ e região Sul Fluminense. **Cadernos EBAPE. BR**, v. 14, p. 569-592, 2016.

BRASIL. Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017. Regulamenta a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. Brasília: Diário Oficial da União, 2017.

BUYUKCANGAZ, ESRA *et al* Molecular typing os *Staphylococcus aureus* and methicillinresistant *S. aureus* (MRSA) isolated from animals and retail meat in North Dakota, United States. *Foodborne pathogens and disease*, v.10, n.7, p.608-617. 2013

CARNEIRO, Liliane Almeida; PETTAN-BREWER, Christina. One Health: conceito, história e questões relacionadas–revisão e reflexão. In: **Pesquisa em Saúde & Ambiente na Amazônia: perspectivas para sustentabilidade humana e ambiental na região**. Editora Científica Digital, 2021. p. 219-240.

CASTELLANO GONZÁLEZ, M.J.; PEROZO-MENA, A.J. Mecanismos de resistencia a antibióticos beta-lactámicos en *Staphylococcus aureus*. **Kasmera**, v. 38, n. 1, p. 18-35, 2010.

CASTRO, Ícaro Rainyer Rodrigues; CASTRO, Lucas Rodrigues; LIMA, Alyne Cristina Sodré. Bactérias resistentes a antibióticos em ambiente aquático: efeito na produção animal. **Ciência Animal**, v. 32, n. 1, p. 84-99, 2022.

CHENG, Wei Nee; HAN, Sung Gu. Bovine mastitis: Risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments—A review. **Asian-Australasian journal of animal sciences**, v. 33, n. 11, p. 1699, 2020.

CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals*. 7th ed. CLSI supplement VET01S. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2024.

COSTA NOEL, Caroline *et al*. Perfil de suscetibilidade antimicrobiana e produção de “slime” de isolados de *Staphylococcus* spp. provenientes de casos de mastite bovina na região sul-fluminense. **Revista de Saúde**, v. 7, n. 1, p. 22-26, 2016.

COSTA, A.; SILVA, G.J. Resistência à Colistina e sua Disseminação: Implicações em Saúde Pública. **Rev. Port. Farmacoter**, v. 10, p. 47-52, 2017.

DAVIES, Robert; WALES, Andrew. Antimicrobial resistance on farms: a review including biosecurity and the potential role of disinfectants in resistance selection. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 18, n. 3, p. 753-774, 2019.

DIAS, Juliana Alves *et al*. Antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus* spp. isolates in cattle herds from Western Amazon. 2022.

DORNELES, Elaine MS *et al*. Genetic diversity and antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* isolates from bovine mastitis in Minas Gerais, Brazil. **Microbiologyopen**, v. 8, n. 5, p. e00736, 2019.

DUBENCZUK, Felipe Carlos *et al*. Análise microbiológica da qualidade do leite e avaliação de medidas de prevenção e controle da mastite bovina em unidades leiteiras no Rio Grande do Sul. 2019.

ECONOMOU, Vangelis; GOUSIA, Panagiota. Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria. **Infection and drug resistance**, p. 49-61, 2015.

EMATER-RIO. **Bovinocultura: Pecuária de leite/corte**. Rio de Janeiro, 2018.

EMATER-RIO. **Relatório de Atividades 2020**. Rio de Janeiro, 2020.

EMATER-RO. Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural. **Bovinocultura de Leite**. 2023. Disponível em: <[bovinocultura de leite \(emater.ro.gov.br\)](http://bovinocultura.de.leite(emater.ro.gov.br))>. Acesso em: 27 de maio de 2023.

EMBRAPA, GADO DE LEITE. ANUÁRIO leite 2021: saúde única e total. **Embrapa Gado de Leite**, v. 1, p. 1-53, 2021.

EMBRAPA, GADO DE LEITE. ANUÁRIO Leite 2022: Pecuária leiteira de precisão. **Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite**, v. 2022, 2022.

FELIPE, Verónica *et al.* Evaluation of the biofilm forming ability and its associated genes in *Staphylococcus* species isolates from bovine mastitis in Argentinean dairy farms. **Microbial pathogenesis**, v. 104, p. 278-286, 2017.

FERRAZZA, Rodrigo A.; CASTELLANI, Elena. Análise das transformações da pecuária brasileira: um enfoque na pecuária leiteira. **Ciência Animal Brasileira/Brazilian Animal Science**, v. 22, 2021.

FERREIRA, Lilian Bernardina *et al.* Risk factors associated with the occurrence of multiresistant *Staphylococcus* spp. isolated from bovine subclinical mastitis in northern Brazil. 2022.

FONSECA, Maria Eduarda Barbosa *et al.* Mastite bovina: revisão. **Pubvet**, v. 15, p. 162, 2021.

GILIO, Leandro *et al.* O agronegócio em Minas Gerais: evolução do Produto Interno Bruto entre 2004 e 2015. **Revista de Economia e Agronegócio/Brazilian Review of Economics and Agribusiness**, v. 14, 2016.

HE, Wenjuan *et al.* Prevalence, etiology, and economic impact of clinical mastitis on large dairy farms in China. **Veterinary microbiology**, v. 242, p. 108570, 2020.

HOQUE, M. Nazmul *et al.* Insights into the resistome of bovine clinical mastitis microbiome, a key factor in disease complication. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 860, 2020.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Cidades e Estados**. 2023. Disponível em: < <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/ro/porto-velho/pesquisa/18/16532>>. Acesso em 27 de maio de 2023.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção de leite no Brasil**. 2022. Disponível em: < <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/leite/rj>>. Acesso em: 27 de maio de 2023.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Rebanhos e valor dos principais produtos de origem animal foram recordes em 2022**. 2022. Disponível em: <<https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2012-agencia-de-noticias/noticias/37937-rebanhos-e-valor-dos-principais-produto-de-origem-animal-foram-recordes-em-2022#:~:text=A%20produ%C3%A7%C3%A3o%20de%20leite%20foi,margens%20t%C3%AAm%20desestimulado%20a%20produ%C3%A7%C3%A3o>>. Acesso em: 27 de maio de 2023.

IDARON. Agência de Defesa Sanitária Agrossilvopastoril de Rondônia. **Valor bruto da produção leiteira em Rondônia deve superar os 1,1 bilhão de reais este ano**. 2023. Disponível em: <<http://www.idaron.ro.gov.br/index.php/2023/03/31/valor-bruto-da-producao-leiteira-em-rondonia-deve-superar-os-11-bilhao-de-reais-este-ano/#:~:text=Na%20ind%C3%BAstria%20do%20leite%2C%20por,o%20primeiro%20da%20regi%C3%A3o%20Norte>>. Acesso em: 27 de maio de 2023.

ISRAEL, L. F. S. *et al.* Produção de biofilme por *Staphylococcus chromogenes* isolados de amostras de leite provenientes de rebanhos bovinos com mastite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, p. 1943-1949, 2018.

JAMALI, Hossein *et al.* Invited review: Incidence, risk factors, and effects of clinical mastitis recurrence in dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 101, n. 6, p. 4729-4746, 2018.

JONES, P. J. *et al.* Factors affecting dairy farmers' attitudes towards antimicrobial medicine usage in cattle in England and Wales. **Preventive veterinary medicine**, v. 121, n. 1-2, p. 30-40, 2015.

KHAZANDI, Manouchehr *et al.* Genomic characterization of coagulase-negative staphylococci including methicillin-resistant *Staphylococcus sciuri* causing bovine mastitis. **Veterinary microbiology**, v. 219, p. 17-22, 2018.

KIBEBEW, Kinfe. Bovine mastitis: A review of causes and epidemiological point of view. **Journal of Biology, Agriculture and Healthcare**, v. 7, n. 2, p. 1-14, 2017.

KIM, Dae-Wi; CHA, Chang-Jun. Antibiotic resistome from the One-Health perspective: understanding and controlling antimicrobial resistance transmission. **Experimental & molecular medicine**, v. 53, n. 3, p. 301-309, 2021.

KIM, Su-Jeong *et al.* Antimicrobial resistance and genetic characterization of coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis milk samples in Korea. **Journal of dairy science**, v. 102, n. 12, p. 11439-11448, 2019.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; PROCOP, G.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JR., W. C.; WOODS, G. Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido. 6ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018.

KUMAR, Mohit *et al.* Antibiotics bioremediation: Perspectives on its ecotoxicity and resistance. **Environment international**, v. 124, p. 448-461, 2019.

LEIRA, Matheus Hernandes *et al.* Fatores que alteram a produção e a qualidade do leite: Revisão. **Pubvet**, v. 12, p. 172, 2018.

LIMA, Allana Lais Alves *et al.* Perfil de sensibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de leite de vacas com mastite em propriedades de agricultura familiar. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 11, p. e099119438-e099119438, 2020.

LUCAS, A.P.; FARIAS, A.R.B.; SILVA, E.C.; SANTORO, K.R.; MANDONÇA, M.; SILVA, E.R. Detection of β -lactamase, *blaZ* and *mecA* in penicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Garanhuns, Brazil. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 15, n. 2, p. 140-145, 2021.

MARQUES, Viviane Figueira *et al.* Biofilm production and beta-lactamic resistance in Brazilian *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. **Brazilian journal of microbiology**, v. 48, p. 118-124, 2017.

MARTINS, Larissa *et al.* Chronic subclinical mastitis reduces milk and components yield at the cow level. **Journal of dairy research**, v. 87, n. 3, p. 298-305, 2020.

MCEWEN, Scott A.; COLLIGNON, Peter J. Antimicrobial resistance: a one health perspective. **Antimicrobial resistance in bacteria from livestock and companion animals**, p. 521-547, 2018.

MEDINA, Jessica *et al.* Influence of anthropogenic pollution on the prevalence, maintenance and spread of antibiotic resistance in aquatic microbial communities. 2018.

MELO, Dayanne A. de *et al.* Impairments of *mecA* gene detection in bovine *Staphylococcus* spp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, p. 1075-1082, 2014.

MELO, Dayanne A. de *et al.* Implicações da utilização de parâmetros humanos na detecção do gene *mecA* em *Staphylococcus* spp. isolados de mastite bovina e seus impactos na predição da resistência aos beta-lactâmicos em ambientes de produção leiteira. 2013.

MELO, Dayanne A. *et al.* Accuracy of PCR universal primer for methicillin-resistant *Staphylococcus* and comparison of different phenotypic screening assays. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 51, p. 403-407, 2019.

MELO, Dayanne A. *et al.* Characterization of Coagulase-Negative Staphylococci and phenotypic beta lactam resistance evaluation in samples from bovine Intramammary infection. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, p. 368-374, 2018.

MELO, Dayanne Araújo de *et al.* *Staphylococcus* metilina-resistentes de origem animal: detecção de variantes do gene *mec* e seus reguladores. 2017.

MENDONÇA, Elaine C. L. *et al.* Caracterização fenogenotípica da resistência antimicrobiana em *Staphylococcus* spp. isolados de mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, p. 859-864, 2012.

MENIN, Álvaro. Saúde única: uma reflexão. **Encuentro de Salud Animal**, v. 4, 2018.

MIRANDA, I.F.; SANTOS, M.L. DOS; OLIVEIRA, W.C.S.; OLIVEIRA, M.C. *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase do tipo Kpc: Disseminação mundial e situação atual no Brasil. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 25, n. 2, p. 113-119, 2019.

MORALES-UBALDO, Ana Lizet *et al.* Bovine mastitis, a worldwide impact disease: prevalence, antimicrobial resistance, and viable alternative approaches. **Veterinary and animal science**, p. 100306, 2023.

MOTTA, Cássia Couto da *et al.* Análise genotípica e proteômica na identificação de *Staphylococcus* spp. coagulase-positivos isolados do leite e sua cadeia produtiva e caracterização da resistência a beta-lactâmicos. 2014.

MURAKAMI, Kazuhisa *et al.* Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. **Journal of clinical microbiology**, v. 29, n. 10, p. 2240-2244, 1991.

OLIVEIRA, Samuel *et al.* Evolução da captação de leite no Brasil, 1997–2015. **Oeste**, v. 17, p. 5, 2016.

OMS publica lista de bactérias para as quais se necessitam novos antibióticos urgentemente. Paho, 2017. Disponível em <https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5357:oms-publica-lista-de-bacterias-para-as-quais-se-necessitam-novos-antibioticos-urgentemente&Itemid=812> Acesso em: 25 de nov. de 2020.

O'NEILL, Jim. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. 2016.

OSUMI, Takafumi *et al.* Prototheca zopfii genotypes isolated from cow barns and bovine mastitis in Japan. **Veterinary Microbiology**, v. 131, n. 3-4, p. 419-423, 2008.

PENA, Renata Henriques Ragi; FREITAS, Filipe; CASTRO, Bruno Gomes de. Hygienic-sanitary quality and antimicrobial sensitivity profile of Escherichia coli in milk and cheese sold illegally in municipalities of northern Mato Grosso, Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 88, p. e0702019, 2021.

PEREIRA, Camila S. *et al.* Proteomics characterization of *Staphylococcus* spp. from goat mastitis and phenogeno-typical assessment of resistance to beta-lactamics. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 41, p. e06129, 2021.

PFEIFER, Luiz Francisco Machado *et al.* **Caracterização da pecuária em Rondônia**. 2021.

PHOPHI, Lufuno; PETZER, Inge-Marie; QEKWANA, Daniel Nenene. Antimicrobial resistance patterns and biofilm formation of coagulase-negative *Staphylococcus* species isolated from subclinical mastitis cow milk samples submitted to the Onderstepoort Milk Laboratory. **BMC veterinary research**, v. 15, p. 1-9, 2019.

PIMENTA, Ramon Loureiro *et al.* Avaliação da resistência antimicrobiana e da virulência em cepas bacterianas isoladas de aves em estabelecimentos de corte e postura no estado do Rio de Janeiro. 2018.

POLIANCIUC, Svetlana Iuliana *et al.* Antibiotics in the environment: causes and consequences. **Medicine and pharmacy reports**, v. 93, n. 3, p. 231, 2020.

PRIYANKA, Panigrahi S. *et al.* Antibiotic residues in milk-a serious public health hazard. **Journal of Environment and Life Sciences**, v. 2, n. 4, p. 99-102, 2017.

RAGAZZI, Fernanda Giácomo *et al.* Análise da variação estacional na produção de leite nas diferentes bacias leiteiras no Brasil. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 4, n. 1, p. 976-988, 2021.

REGAN, Áine *et al.* Behaviour change interventions for responsible antimicrobial use on farms. **Irish Veterinary Journal**, v. 76, n. 1, p. 8, 2023.

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

ROSATO, Adriana E. *et al.* mecA-blaZ corepressors in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 47, n. 4, p. 1460-1463, 2003.

RUEGG, Pamela L. What is success? A narrative review of research evaluating outcomes of antibiotics used for treatment of clinical mastitis. **Frontiers in veterinary science**, v. 8, p. 639641, 2021.

SALAM, Md Abdus *et al.* Antimicrobial resistance: a growing serious threat for global public health. In: **Healthcare**. MDPI, 2023. p. 1946.

SALMAN, A. K. D.; SCHLINDWEIN, J. A.; PFEIFER, L. F. M. (org.). Avanços da pecuária na Amazônia: pesquisas em desenvolvimento regional em Rondônia. Porto Velho: Edufro, 2021.

SANTANA, D. P. *et al.* Sistemas ILPF e transferência de tecnologia nos Estados de Minas Gerais, Espírito Santo e Rio de Janeiro. 2019.

SANTANA, D. P.; NOCE, M. A.; BORGHI, E.; ALVARENGA, R. C.; GONTIJO NETO, M. M.; MULLER, M. D.; MARTINS, C. E.; BERNARDO, W. F.; VIANA, M. C. M.; PIRES, J. A. de A.; CALSAVARA, L. H. F.; MELLO, B. L. B. de; COSTA, F. A. de S.; OLIVEIRA, C. S. S. e. SKORUPA, L. A.; MANZATTO, C. V. (Ed.). Sistemas de integração lavoura-pecuária-floresta no Brasil: estratégias regionais de transferência de tecnologia, avaliação da adoção e de impactos. Brasília: DF, Embrapa, 2019. p. 192-233.

SANTOS, Danielle Cabral *et al.* *Staphylococcus chromogenes*, a coagulase-negative *Staphylococcus* species that can clot plasma. **Journal of clinical microbiology**, v. 54, n. 5, p. 1372-1375, 2016.

SARAIVA, Mauro M. S. *et al.* Antimicrobial resistance in the globalized food chain: A One Health perspective applied to the poultry industry. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 1-22, 2022.

SENDER, Grażyna *et al.* Current concepts on the impact of coagulase-negative staphylococci causing bovine mastitis as a threat to human and animal health—a review. **Animal Science Papers and Reports**, v. 35, n. 2, p. 123-135, 2017.

SHARMA, Chetan *et al.* Antimicrobial resistance: its surveillance, impact, and alternative management strategies in dairy animals. **Frontiers in veterinary science**, v. 4, p. 237, 2018.

SILVA, Felipe Pinto; FILHO, José Eustáquio Ribeiro Vieira. CONDICIONANTES DA EXPORTAÇÃO BRASILEIRA DA PECUÁRIA DE LEITE¹. Boletim regional, urbano e ambiental IPEA, 2020.

SILVA, Liliam Sousa; DA SILVA JESUS, Marleide; TAKETANI, Natália Franco. Desenvolvimento De Resistência Bacteriana Por Moléculas Não Antibióticas. **Revista Ensaios Pioneiros**, v. 3, n. 2, p. 37-47, 2019.

SOARES, B. S. *et al.* Characterization of virulence and antibiotic profile and agr typing of *Staphylococcus aureus* from milk of subclinical mastitis bovine in State of Rio de Janeiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69, p. 843-850, 2017.

SOARES, Bianca *et al.* Molecular characterization and genetic diversity of *Staphylococcus aureus* isolates of dairy production farms in Rio de Janeiro, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 43, n. 1, p. e001120-e001120, 2021.

SOARES, L. C. Correlação entre marcadores fenotípicos e genotípicos de virulência e resistência à oxacilina em *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos isolados a partir de mastite bovina. 82 p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária.

- Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.
- SOARES, Lidiane C. *et al.* Antimicrobial resistance and detection of *mecA* and *blaZ* genes in coagulase-negative *Staphylococcus* isolated from bovine mastitis. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, p. 692-696, 2012.
- SOARES, RAQUEL MULLER. Certificação E Controle De Propriedades De Produção Leiteira Livres De Brucelose E Tuberculose No Estado Do Rio De Janeiro: Experiência Da Pesagro-Rio Na Primeira Certificação Do Estado. 2018.
- SOUZA, Miliane Moreira Soares *et al.* Antimicrobial therapy approaches in the mastitis control driven by one health insights. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 46, p. e002624-e002624, 2024.
- SOUZA, Miliane Moreira Soares *et al.* Of animal and men: The importance of animal environment to antimicrobial resistance: A one health approach. In: **Antimicrobial Resistance- A One Health Perspective**. IntechOpen, 2020.
- SOUZA, Paulo Marcelo de; SOUZA, Hadma Milaneze de; FORNAZIER, Armando; PONCIANO, Nivaldo José. Análise regional da produção agropecuária do Rio de Janeiro, considerando-se os segmentos familiar e não familiar. *Estudos Sociedade e Agricultura*, v. 27, n. 3, p. 645-670, out. 2019.
- SOUZA, Paulo Marcelo *et al.* Análise regional da produção agropecuária do Rio de Janeiro, considerando-se os segmentos familiar e não familiar: Regional analysis of agricultural production of Rio de Janeiro, considering the family and non-family sectors. **Estudos Sociedade e Agricultura**, v. 27, n. 3, p. 645-670, 2019.
- SRITHANASUWAN, Anyaphat *et al.* In Vitro Bacterial Competition of *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, and *Escherichia coli* against Coagulase-Negative *Staphylococci* from Bovine Mastitis Milk. **Antibiotics**, v. 12, n. 3, p. 600, 2023.
- TOMAZI, Tiago; SANTOS, Marcos Veiga. Antimicrobial use for treatment of clinical mastitis in dairy herds from Brazil and its association with herd-level descriptors. **Preventive veterinary medicine**, v. 176, p. 104937, 2020.
- TRONCOSO, A.T.; ALENCAR, G.A. de B.C. Atualidades em resistência bacteriana: Uma revisão bibliográfica. **Revista Da Faculdade De Medicina De Teresópolis**, v. 4, n.1, p. 22-31, 2020.
- VILELA, Duarte (Ed.). **Pecuária de leite no Brasil: cenários e avanços tecnológicos**. Embrapa, 2016.
- VILELA, Duarte *et al.* A evolução do leite no Brasil em cinco décadas. **Revista de política agrícola**, v. 26, n. 1, p. 5-24, 2017.
- WALID, M. S. *et al.* Antibigram and antibiotic resistance genes among coagulase-negative staphylococci recovered from bovine mastitis. **Adv. Anim. Vet. Sci**, v. 9, n. 8, p. 1267-1274, 2021.
- WANG, Fenghua *et al.* Fifteen-year application of manure and chemical fertilizers differently impacts soil ARGs and microbial community structure. **Frontiers in microbiology**, v. 11, p. 62, 2020.
- WHITE, Allison; HUGHES, James M. Critical importance of a one health approach to antimicrobial resistance. **EcoHealth**, v. 16, p. 404-409, 2019.
- WIELER, Lothar H. *et al.* Methicillin-resistant staphylococci (MRS) and extended-spectrum beta-lactamases (ESBL)-producing Enterobacteriaceae in companion animals: nosocomial infections as one reason for the rising prevalence of these potential zoonotic pathogens in clinical samples. **International journal of medical microbiology**, v. 301, n. 8, p. 635-641, 2011.
- YU, Zhongyi *et al.* Antimicrobial resistance and its association with tolerance to heavy metals in agriculture production. **Food microbiology**, v. 64, p. 23-32, 2017.

ZHAO, Xin *et al.* The fate of antibiotic resistance genes and their influential factors during excess sludge composting in a full-scale plant. **Bioresource Technology**, v. 342, p. 126049, 2021.

ZIMERMANN, Katia Fabiane; ARAUJO, Maria Eugênia Moraes. Mastite bovina: agentes etiológicos e susceptibilidade a antimicrobianos. **Revista Campo Digital**, v. 12, n. 1, 2017.

ANEXO

Anexo 1 – Questionário para coleta de dados técnicos.

IDENTIFICAÇÃO			
Nome do produtor:			
Endereço:			
ASPECTOS GERAIS DE MANEJO DA PROPRIEDADE			
Classificação UFC:			
Classificação CCS:			
Nº de vacas em lactação:			
Média de produção diária:			
Sistema de produção: <input type="checkbox"/> confinamento <input type="checkbox"/> semiconfinamento <input type="checkbox"/> a pasto			
Base do alojamento: <input type="checkbox"/> concreto <input type="checkbox"/> terra <input type="checkbox"/> borracha <input type="checkbox"/> serragem			
Tipo de cama utilizada: <input type="checkbox"/> areia <input type="checkbox"/> serragem <input type="checkbox"/> colchão <input type="checkbox"/> nenhuma			
Área total da propriedade:			
Área destinada a produção de leite:			
MANEJO DE ORDENHA			
Tipo de ordenha: <input type="checkbox"/> balde ao pé <input type="checkbox"/> mecânica			
Nº de conjuntos de ordenha: <input type="checkbox"/> 01 <input type="checkbox"/> 02 <input type="checkbox"/> 03 <input type="checkbox"/> 04 <input type="checkbox"/> 05 <input type="checkbox"/> 06			
Nº de ordenhas/dia: <input type="checkbox"/> 01 <input type="checkbox"/> 02 <input type="checkbox"/> 03			
Nº de pessoas na ordenha: <input type="checkbox"/> 01 <input type="checkbox"/> 02 <input type="checkbox"/> 03 <input type="checkbox"/> 04			
Linha de ordenha: <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não			
Desinfecção dos equipamentos de ordenha: <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não			
Lavagem das mãos antes e durante a ordenha: <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não			
Uso luvas na ordenha: <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não			
Presença de bezerro ao pé: <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não			
Lavagem dos tetos com água: <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não			
Queima de pelos ao redor dos tetos: <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não			
Descarte dos 3 primeiros jatos: <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não			
Realização de teste da caneca de fundo preto: <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não Frequência:			
Realização de pré-dipping: <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não			
Realização de pós-dipping: <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não			
Uso de papel toalha: <input type="checkbox"/> 1 por teto <input type="checkbox"/> 1 para 2 ou mais tetos <input type="checkbox"/> não			
Tempo de refrigeração do leite:			
Anotações durante a ordenha:			
PRÁTICAS SANITÁRIAS DE PREVENÇÃO A MASTITE			
Controle dos casos de mastite clínica: <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não Quantos?			
Controle dos protocolos de tratamento: <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não Quais?			
Uso de antimicrobianos para tratamento de mastite: <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não Quais?			
Terapia de vaca seca: <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não Qual produto?			
Realização de CMT: <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não Frequência:			
Realização de CCS individual: <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não Frequência:			
Realização de cultura bacteriana para diagnóstico: <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não			
Descarte de animais com mastite: <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não			
Nº de casos de mastite/mês:			
Utilização de vacina contra mastite: <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não			

Fonte: adaptação Dubenczuk (2019).