



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

Perfil clonal, resistência antimicrobiana e atividade bactericida do Polipirrol e extrato aquoso de *Moringa oleifera* em *Staphylococcus* spp. de leite, ambiente e ordenhadores

JOSÉ GIVANILDO DA SILVA

RECIFE
2020



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

Perfil clonal, resistência antimicrobiana e atividade bactericida do Polipirrol e extrato aquoso de *Moringa oleifera* em *Staphylococcus* spp. de leite, ambiente e ordenhadores

JOSÉ GIVANILDO DA SILVA

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Biociência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota

RECIFE
2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

J83p

Silva, José Givanildo da

Perfil clonal, resistência antimicrobiana e atividade bactericida do Polipirrol e extrato aquoso de Moringa oleifera em Staphylococcus spp. de leite, ambiente e ordenhadores / José Givanildo da Silva. - 2020.
116 f. : il.

Orientador: Rinaldo Aparecido .
Inclui referências.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Recife, 2020.

1. Fazendas leiteiras. 2. Multirresistência. 3. Perfil genético. I. , Rinaldo Aparecido, orient. II. Título

CDD 636.089

FOLHA DE APROVAÇÃO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Biociência Animal, outorgado pela Universidade Federal Rural de Pernambuco, à disposição na Biblioteca Central desta universidade. A transcrição ou utilização de trechos deste trabalho é permitida, desde que respeitadas as normas de ética científica.

José Givanildo da Silva

Data de aprovação ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota

Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE

Prof. Dr. José Wilton Pinheiro Junior

Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE

Profa. Dra. Maria Beatriz de Abreu Glória

Departamento de Ciências do Consumo – UFRPE

Profa. Dra. Maria José de Sena

Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE

Profa. Dra. Mônica Maria de Oliveira Pinho Cerqueira

Escola de Veterinária – UFMG

À “Mainha”, Maria José Silva de Freitas
e a todos que lutam pelo fim das desigualdades
e de qualquer forma de discriminação, **dedico**.

AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente por me conceder o dom da vida. Por me amar incondicionalmente, por se fazer presente a todo instante, por permitir que eu chegasse até aqui e por me dar forças para caminhar.

A Nossa Senhora da Imaculada Conceição, minha grande intercessora que escuta minhas preces e as leva a Cristo e vibra com cada vitória minha. Muito obrigado, minha mãe!

A minha mãe, Maria, por ser a pessoa que mais acredita em minhas potencialidades, e pelo seu exemplo de força, fé, trabalho, persistência, coragem e acima de tudo amor. Tê-la como mãe é a maior benção que Deus poderia me conceder.

Ao meu avô, Francisco, pela dedicação, preocupação, ensinamentos e exemplo de homem que não precisou conhecer as letras para ensinar o que é ter caráter, coragem e determinação.

Ao meu pai, Givanildo, por estar cada dia mais presente em minha vida e pelo amor imenso que tem por mim.

Aos meus irmãos, Fernando e Marcela, pelo apoio, cumplicidade, fraternidade e, acima de tudo, amor que têm me dado ao longo da vida.

A todos os meus amigos de Barreiros, especialmente Rafael Luís, Maura Fernanda, Juliana Silva, Natalie Vasconcelos, Sarah Michelle, Bruna Mello, Edinaide Miranda, Antônio Marcos, Laércio Santos, Alice, Mayara Galdino e James Correia por estarem comigo apesar da distância.

A minha cidade natal, Barreiros-PE, terra de gente forte que sabe driblar as adversidades.

A Pernambuco, terra de poetas, músicos, culinária, de uma cultura ímpar e, principalmente de um povo guerreiro, forte e lutador. Sinto muito orgulho de ser pernambucano.

A todos os meus familiares pela ajuda, confiança e crédito e em especial aos meus tios Gilberto e Inêz, as minhas avós Irene e Conceição, a minha prima Natália que estão torcendo por mim em outro plano espiritual.

Aos amigos que fiz ao longo do curso de graduação em Medicina Veterinária, especialmente Claudia, Majjora (e minha afilhada Alice) e Armele, por estarem sempre ao meu lado, me aconselhando, “puxando minha orelha” quando preciso e pelo amor de irmãos que criamos, jamais esquecerei o nosso “quarteto fantástico”.

Ao Professor Rinaldo Mota, pela orientação, carinho, amizade e por acreditar no meu trabalho, assumindo muitas vezes o papel de pai, irmão, tio e amigo. O senhor certamente é um dos maiores exemplos de pessoa e profissional que tenho obrigado por existir!

A Professora Héliida de Mélo do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco-*Campus* Barreiros, por ter despertado em mim a vontade ir além, de fazer um curso superior. E por ter se tornado uma grande amiga, alguém que admiro bastante.

A todos os mineiros e membros da Escola de Veterinária da UFMG, vocês com seus “uai, trem, sô, aqui, garrado e cê” foram uma grande família que formei nesse estado tão especial, podem ter certeza que serei eternamente grato por tudo o que fizeram por mim, jamais esquecerei de vocês.

Nessa vida algumas pessoas chegam “do nada” e nos marcam para sempre e assim aconteceu com Cosme, Renatinha, Breno, Muller e Danilo muito obrigado por tudo. Vocês são pessoas muito especiais para mim, verdadeiras joias que o universo me deu.

Ao meu amigo Marcus Vinicius (*in memoriam*) pela amizade curta, mas jamais esquecida, lembro-me do seu sonho em fazer veterinária e após sua partida prometi a mim mesmo e a você que realizaria seu sonho. Hoje estou o concretizando, dei o melhor de mim e espero ter cumprido essa promessa da melhor forma possível.

A UFRPE, por ser uma mãe e ter se transformado em minha casa no decorrer desses anos, todos os momentos sejam os bons ou os ruins foram extremamente importantes para minha formação.

A todos os professores do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, vocês me deram a chance de conhecer um novo mundo, de construir conhecimentos a respeito desta profissão tão grandiosa.

Aos colegas do Laboratório de Doenças Infectocontagiosas dos Animais Domésticos (LDIC) pela contribuição, auxílio e apoio. Toda conquista na vida é fruto da participação/ajuda que recebemos, se cheguei até aqui podem ter certeza que foi pela contribuição de vocês. Especialmente a Renata Pimentel, Breno, Raylson, Junior Mário, André Santos e Gabriela Silva pelo auxílio efetivo na realização da tese.

A Cleide e Sandra pela alegria, conversas e energia positiva que transmitem a cada dia.

A todos dos Laboratórios de Inspeção de Produtos de Origem Animal e Doenças Bacterianas do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa pelo auxílio na realização da PFGE e detecção molecular dos sistemas de efluxo multidrogas.

Ao Laboratório de Análise Produtos de Origem Animal (LAPOA) do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba pela realização do sequenciamento genético das amostras e tipagem em especial a Larissa Dias, Priscylla e Núbia pela convivência tão alegre.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro ao projeto e a CAPES pela concessão da bolsa de doutorado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da UFRPE, pela oportunidade de ter sido discente, ao trabalho sem igual da coordenação e aos colegas e amigos que convivi nesse programa.

E por fim, às Políticas Públicas Educacionais e de Inclusão Social dos Governos Lula e Dilma que forneceram as oportunidades necessárias para que um menino sonhador, do interior pernambucano, pudesse me converter em um Doutor que ama seu país e que possui uma vontade imensa de trabalhar para que outras histórias como a sua deixem de ser exceção e virem regra! MEU MUITO E ETERNO OBRIGADO!

“O nordestino é, antes de tudo, um forte!”

(Euclides da Cunha)

RESUMO

O objetivo desta pesquisa foi determinar a frequência de mastite bovina por *Staphylococcus* spp. em fazendas leiteiras no estado de Pernambuco, Brasil. Detectar os genes *mecA* e *mecC* responsáveis pela resistência à meticilina e *norA*, *norB*, *norC*, *msrA*, *mgrA*, *tet-38* e *ImrS* de sistema de efluxo multidrogas em isolados de *Staphylococcus* spp., realizar a tipagem dos isolados de *S. aureus* Resistentes à Meticilina (MRSA) por meio da técnica de Eletroforese em Gel Pulsante (PFGE) e avaliar a atividade antimicrobiana das Nanopartículas Polipirrol (NPs-PPy) e do extrato aquoso de *Moringa oleifera* nos isolados de *Staphylococcus* spp. portadores dos genes de sistema de efluxo multidrogas. Foram coletadas 676 amostras de leite de vacas, 15 amostras de *swabs* nasais e de mãos de ordenhadores, 14 *swabs* de teteiras e nove de baldes de ordenha em cinco propriedades rurais (A-E). Inicialmente foi realizado o *California Mastitis Tests* (CMT) e as amostras que apresentaram resultado $\geq +$ (uma cruz) (319 amostras) ou aquelas que foram positivas no teste da caneca (16 amostras) foram coletadas para as análises microbiológicas. As amostras foram submetidas ao exame microbiológico para detecção de *Staphylococcus* spp., técnica molecular (PCR) para identificação de *Staphylococcus aureus* e dos genes *mecA*, *mecC*, *norA*, *norB*, *norC*, *msrA*, *mgrA*, *tet-38* e *ImrS*. Para os isolados de *mecA*-MRSA foi determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e, estes foram submetidos à genotipagem por meio da técnica de *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE) e naqueles portadores de *mecC* foi realizado o sequenciamento do genoma. Nos isolados portadores dos genes de sistema de efluxo multidrogas foi determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) das NPs-PPy e do extrato aquoso *Moringa oleifera*. MRSA foi detectado em 1,49% (5/335), 20% (3/15), 6,6% (1/15) e 7,1% (1/14) das amostras de leite, nariz, mãos e teteiras, respectivamente. Todos os isolados foram sensíveis à oxacilina na CIM. Na PFGE foi possível identificar VIII pulsotipos (A-H), divididos em três *clusters* maiores nos isolados de MRSA. O *mecC* foi detectado em 4,68% (3/64) isolados de *S. aureus* pertencentes a mesma cepa. No sequenciamento, esta cepa apresentou genes de virulência relacionados às exoenzimas, toxinas, enterotoxina, genes de sistema de efluxo multidrogas, de inativação de antibióticos e plasmídeo, e esta cepa foi atribuída a ST 126 e MRSA t605; ainda foram identificadas nove proteínas relacionadas à

resistência à meticilina. Os resultados obtidos apresentam impacto direto na saúde pública uma vez que, este é o primeiro estudo que detecta a disseminação de isolados de *Staphylococcus* spp. multirresistentes com diferentes perfis clonais no ambiente agropecuário de fazendas leiteiras no estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil. Também foi comprovada a atividade bactericida do extrato aquoso de *Moringa oleifera* e das NPs-PPy, sendo necessários novos estudos com o intuito de utilizar essas compostos como alternativas para tratamento de infecções por *Staphylococcus* spp. resistentes a antimicrobianos.

Palavras-chaves: Fazendas leiteiras. Multirresistência. Perfil genético.

ABSTRACT

This study aimed to determine the frequency of bovine mastitis caused by *Staphylococcus* spp. in dairy farms from Pernambuco state, Brazil. Detect *mecA* and *mecC* genes responsible for resistance to methicillin, and *norA*, *norB*, *norC*, *msrA*, *mgrA*, *tet-38* and *lmrS* genes responsible for multidrug efflux system on *Staphylococcus* spp. isolates, typify Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) strains by Pulsed Field Electrophoresis Gel (PFGE) method, and evaluate the antimicrobial activity of Polypyrrole Nanoparticles (PPy-NPs) and aqueous extract of *Moringa oleifera* on multidrug efflux system gene carrying *Staphylococcus* spp. strains. 676 milk samples, 15 swabs from milker's nostrils and hands, 14 swabs from teat cup and 9 from milking buckets were collected from 5 rural properties (A-E). Initially, the *California Mastitis Tests* (CMT) was performed, and samples with results higher than $\geq +$ (one cross) (319 samples) or those positive on the strip cup test (16 samples) were collected for microbiological analysis. Samples were submitted to microbiological test for detection of *Staphylococcus* spp., molecular technique (PCR) for identification of *Staphylococcus aureus* and *mecA*, *mecC*, *norA*, *norB*, *norC*, *msrA*, *mgrA*, *tet-38* and *lmrS* genes. For *mecA*-MRSA isolates, Minimal Inhibitory Concentration (MIC) was determined and genotyped by *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE), and *mecC*-carrying isolates were submitted to genome sequencing. On isolates carrying multidrug efflux system genes, Minimal Inhibitory Concentration (MIC) and Minimal Bactericidal Concentration (MBC) of PPy-NPs and aqueous extract of *Moringa oleifera* were determined. MRSA were detected in 1,49% (5/335), 20% (3/15), 6,6% (1/15) and 7,1% (1/14) of milk, nostrils, hands, and teat liners samples respectively. All isolates were susceptible to oxacillin by MIC. By PFGE it was possible to identify VIII pulsotypes (A-H) between MRSA isolates, divided into three major clusters. *MecC* gene was detected in 4,68% (3/64) isolates of *S. aureus* of the same strain. By sequencing, this strain presented virulence genes related to exoenzymes, toxins, enterotoxins, multidrug efflux system, antibiotic inactivation genes and plasmid, this strain was attributed to ST 126 and MRSA t605, also nine new proteins related to methicillin resistance were identified. The results obtained impact directly on public health as this is the first study that detects dissemination of multi-resistant *Staphylococcus* spp. isolates with different clonal profiles in agricultural environment of dairy farms from Pernambuco state,

Northeastern of Brazil. It was also comproved the bactericidal activity of aqueous extract of *Moringa oleifera* and PPy-NPs, being necessary new studies about using these compounds as alternatives for treatment of infections by multidrug resistant *Staphylococcus* spp.

Key-words: Dairy Farms. Multi-resistance. Genetic profile.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1. Mastite	19
2.2. <i>Staphylococcus</i> spp.....	21
2.2.1. <i>Staphylococcus</i> spp. como agente causador de infecções	22
2.3. Mecanismos de resistência de <i>Staphylococcus</i> spp. a antimicrobianos	24
2.3.1. Produção de enzimas.....	25
2.3.2. Sistema de efluxo multidroga	26
2.3.3. Modificação do sítio de ação	28
2.4. <i>Staphylococcus</i> spp. resistentes à metilina (MRS)	29
2.5. <i>Staphylococcus</i> spp. resistentes à metilina em casos de mastite bovina	30
2.5.1. Aspectos epidemiológicos e clínicos	30
2.5.2. Técnicas de diagnóstico da mastite causada por MRS	32
2.5.3. Profilaxia das infecções por MRS em fazendas leiteiras	35
2.5.4. Terapias alternativas ao uso de antimicrobianos	36
3. OBJETIVOS.....	38
3.1. Objetivo geral.....	38
3.2. Objetivos específicos	38
4. REFERÊNCIAS	39
5. ARTIGO 1	51
6. ARTIGO 2	58
7. ARTIGO 3	78
8. ARTIGO 4	95
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	115

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 2

Figure 1. Dendrogram of PFGE profiles generated from the *UPGMA/Dice* (Bionumerics, Applied Maths) for 10 MRSA isolates **69**

ARTIGO 3

Figure 1. Amplification of *mecC* fragment in *S. aureus* isolated from cow's milk with mastitis, milkers and milking utensils. **84**

Figure 2. Dendrogram of Rep-PCR profiles generated from the UPGMA algorithm (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages). **85**

LISTA DE QUADROS

ARTIGO 1

Quadro 1. Frequência de <i>Staphylococcus</i> Meticilina resistente (MRS) em casos de mastite bovina	55
---	-----------

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Quadros infecciosos causados por *Staphylococcus* spp. em diferentes espécies animais. **23**

Tabela 2. Frequência de *Staphylococcus* Meticilina-resistente (MRS) em casos de mastite bovina no mundo. **32**

ARTIGO 2

Table 1. Distribution by dairy farm of samples collected. **61**

Table 2. Genes, oligonucleotide sequences and size of amplified fragments. **62**

Table 3. Isolation, molecular identification of *Staphylococcus* spp. and *mecA* samples from milk, milkers, and milking utensils. **66**

Table 4. Genetic profiles of MRSA isolates obtained from dairy farms in the state of Pernambuco, Brazil. **70**

ARTIGO 3

Table 1. Target genes, primer sequences, and estimated amplicon sizes. **82**

Table 2. Frequency of *Staphylococcus aureus* *mecC* positive in milk, milkers and Milking buckets in dairy farms in Northeast Brazil. **85**

Table 3. General genomic and epidemiological characteristics of *mecC* *Staphylococcus aureus*. **86**

ARTIGO 4

Table 1. Distribution by sample of *Staphylococcus* spp. isolates. **100**

Table 2. Genes, oligonucleotide sequences and size of amplified fragments. **103**

Table 3. Frequency of multi-drug efflux system genes in *Staphylococcus* spp. isolated from milk, environment and milkers from dairy farms in Pernambuco, Brazil. **104**

Table 4. Frequency of the efflux system genes in *Staphylococcus* spp. according to origin. **104**

Table 5. Distribution by MIC of the aqueous extract of *Moringa oleifera* against *Staphylococcus* spp. carriers of *norA*, *norC*, *tet-38* and *msrA* isolated from milk, Milkers and dairy farm environment. **105**

Table 6. Distribution by MIC of the aqueous extract of polypyrrole nanoparticles (PPy-NPs) against *Staphylococcus* spp. carriers of *norA*, *norC*, *tet-38* and *msrA* isolated from milk, Milkers and dairy farm environment. **106**

1. INTRODUÇÃO

A bovinocultura leiteira é uma das atividades mais representativas da pecuária brasileira. A partir de 2013, o país passou a ser considerado o quarto maior produtor mundial de leite, com uma produção anual superior a 24 mil toneladas (FAO, 2013; EMBRAPA, 2019). Nesse contexto, o estado de Pernambuco é o terceiro maior produtor de leite da região Nordeste, com pouco mais de 470 milhões de litros em 2017, sendo os estados da Bahia e Ceará os primeiros colocados na região (IBGE, 2017).

Boa parte do leite produzido em Pernambuco é destinado a elaboração de queijo de coalho que é um produto artesanal e tradicional do estado. Desde 1999 é permitida a fabricação deste produto a partir de leite cru, e para isso é necessária a adoção de medidas higiênico-sanitárias tanto em relação ao rebanho quanto na elaboração do produto (PERNAMBUCO, 1999). Porém, nem todas as propriedades seguem com rigor os procedimentos adequados de higiene desde a ordenha até o beneficiamento do leite, tornando o produto suscetível à contaminação por agentes deteriorantes e/ou patogênicos, e conferindo risco à saúde dos consumidores.

Um dos principais reflexos de falhas no manejo higiênico-sanitário das propriedades é a ocorrência de mastites nos rebanhos. Além disso, já foram relatadas altas contagens bacterianas nos equipamentos de ordenha e nas mãos de ordenhadores, corroborando a importância da inclusão dessas variáveis como decisivas para a qualidade do leite obtido e a ocorrência da mastite nos rebanhos (PALES et al., 2005; LIM et al., 2013).

Dentre os microrganismos causadores de mastite, destacam-se as bactérias do gênero *Staphylococcus*. Essas são frequentemente associadas a uma ampla variedade de infecções de caráter oportunista em seres humanos e animais (SCHMIDLIN et al., 2010; CAPPARELLI et al., 2011). *Staphylococcus aureus* é considerada um importante patógeno veiculado por alimentos e causador de doenças transmitidas entre humanos e animais, incluindo as mastites (LEE et al., 2012).

Associada às infecções, outra grande preocupação dos profissionais de saúde é a resistência aos antimicrobianos apresentada por algumas cepas de *Staphylococcus* spp. No caso específico das mastites bacterianas, o tratamento de

eleição é a antibioticoterapia. Porém, o uso elevado de antimicrobianos ou a sua utilização de forma indiscriminada aumenta o risco de resíduos no leite. Isso contribui para a contaminação do ambiente e da cadeia alimentar, e para o surgimento de cepas resistentes às drogas de importância para a saúde humana, a exemplo de *Staphylococcus* spp. Resistente à Meticilina (MRS) (RAIA JUNIOR, 2001; ROLLIN, 2001). Uma vez que pode ocorrer a transmissão cruzada interespecífica de linhagens resistentes pelo consumo de alimentos de origem animal, existe o risco para a saúde dos consumidores (GUIMARÃES, 2011).

A resistência à metilina é uma das mais preocupantes em termos de saúde pública, pois cepas de *Staphylococcus aureus* Resistentes à Meticilina (MRSA) são comumente identificadas como causadoras de infecções hospitalares, até mesmo nas Unidades de Terapia Intensiva (UTI). Além disso, algumas delas também podem produzir enterotoxinas, comprometendo ainda mais a saúde dos pacientes (INTRAKAMHAENG et al., 2012; RABELO et al., 2014).

Cepas MRSA têm sido identificadas em fazendas leiteiras, nas quais já foi relatada a transmissão horizontal do patógeno entre bovinos e trabalhadores de fazendas, sugerindo que o contato entre os humanos e animais pode favorecer a sua transmissão (JUHÁSZ-KASZANYITZKY et al., 2007; LIM et al., 2013). No Brasil, existem poucos estudos que identificaram casos de mastites causadas por MRSA (ANDRADE, 2012; SOARES et al., 2012; MATOS, 2014; SILVA et al., 2014b; SANTOS et al., 2016; MELO et al., 2018). Em relação ao estado de Pernambuco não foram encontrados, na literatura consultada, relatos sobre a detecção de MRS em mastite bovina (KREWER et al., 2015; SANTOS et al., 2018).

Com isso, é importante a realização de estudos para identificar *Staphylococcus* spp. resistentes a antimicrobianos, contribuindo assim para a epidemiologia da resistência a estas drogas no ambiente agropecuário de produção de leite nos diversos estados brasileiros, a exemplo de Pernambuco.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Mastite

Mastite é a inflamação da glândula mamária, caracterizada por uma série de alterações físico-químicas e sensoriais no leite, bem como modificações patológicas no parênquima da glândula mamária (MEGID, RIBEIRO e PAES, 2016). É

considerada a doença que acarreta maiores prejuízos econômicos à produção leiteira, decorrente da redução da quantidade e comprometimento da qualidade do leite produzido, custos com medicamentos e honorários de veterinários, perda total da capacidade secretora da glândula mamária e descarte de animais (RIBEIRO et al., 2003; PEIXOTO, MOTA e COSTA, 2010).

Convencionalmente, a mastite possui três classificações: de acordo com as alterações no leite e na glândula mamária (clínica e subclínica), segundo o tipo microrganismo envolvido (ambiental e contagiosa) e a mastite de verão. Na mastite clínica, os animais apresentam sinais evidentes da doença como edema, aumento de temperatura, rubor e dor na glândula mamária e/ou aparecimento de grumos no leite. O animal também pode apresentar sinais clínicos sistêmicos como aumento de temperatura retal, depressão, anorexia e desidratação (SANTOS e FONSECA, 2007).

Na forma subclínica não são observados sinais clínicos aparentes, favorecendo a disseminação do patógeno no rebanho, pois gera no produtor uma falsa tranquilidade quanto a inexistência da doença no rebanho. No entanto, esta cursa com diminuição no volume de leite produzido, tanto em vacas primíparas quanto nas múltiparas (PRESTES et al., 2003; ACOSTA et al., 2016; COSTA et al., 2017; MESQUITA et al., 2018). A depender da produtividade, a redução na produção de leite decorrente desses casos pode acarretar prejuízos que variam de R\$ 249,47 a 776,91 por vaca em lactação (DEMEU et al., 2016). De acordo com Santos e Fonseca (2007), estima-se que a mastite subclínica corresponda a 90-95% dos casos da doença nos rebanhos leiteiros e que sua prevalência seja de 15 a 40 vezes maior que a forma clínica.

Na mastite de verão é observada a doença aguda de vacas e novilhas secas que causa danos extensos e dolorosos ao úbere. O quarto infectado fica permanentemente danificado, resultando no descarte precoce do animal. É mais provável que a infecção ocorra quando as vacas estão em um ambiente onde os tetos são facilmente expostos a danos físicos e a altas populações de moscas. Os sinais clínicos de mastite de verão são hipertermia, rubor e edema dos quartos acometidos, associado a uma secreção espessa caracterizada por um cheiro desagradável (KIBEBEW, 2017).

A mastite também é classificada de acordo com agente causador da infecção em ambiental ou contagiosa (KHAN, 2006). Segundo Kuang et al. (2009) mais de

150 microrganismos podem provocar a doença. Na mastite ambiental, os agentes que habitam o ambiente onde o animal se encontra, como por exemplo, *Enterobacteriaceae*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Corynebacterium* spp., *Pasteurellaceae*, *Pseudomonas* spp. e *Streptococcus zooepidemicus* podem causar a doença, sendo responsáveis por um alto número de casos clínicos (BERGONIER et al., 2003).

Já na mastite contagiosa, há alta ocorrência de casos subclínicos sendo causada por patógenos que habitam a glândula mamária e a superfície de pele e tetos, entre eles estirpes de *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma bovis* e *Staphylococcus* spp. (BERGONIER et al., 2003; MURICY, 2003; MOTA et al., 2012; SOUZA et al., 2019).

2.2. *Staphylococcus* spp.

Morfologicamente, o gênero *Staphylococcus* é caracterizado como cocos Gram positivos, aeróbios e anaeróbios facultativos, medindo de 0,5 a 1,5 μm , imóvel, oxidase negativo e não formadores de esporos. Além disso, várias espécies são anaeróbias facultativas e produtoras de catalase. Existem mais de 60 espécies e subespécies de *Staphylococcus* spp. e, grande parte é comensal da pele e tegumento de seres humanos e animais, sendo encontradas nas mucosas do trato respiratório, urogenital e digestivo (QUINN et al., 1999; LAMERS et al., 2012).

Staphylococcus spp. são microrganismos mesófilos, apresentando crescimento na faixa de 7° a 51°C, sendo a temperatura de 37°C considerada ideal para seu desenvolvimento. Além disso são tolerantes à concentração de 5-7% de NaCl e à redução da atividade de água (A_w) (0,86-0,90) (ADAMS e MOSS, 2008; MEDVEĐOVÁ; VALÍK; STUDENIČOVÁ, 2009).

Tradicionalmente, os estafilococos eram divididos em duas categorias: *Staphylococcus* coagulase negativo, que compõem a microbiota natural dos seres humanos e animais, e positivo que apresentam maior potencial patogênico, tendo como principal representante, *Staphylococcus aureus* (NEVES et al., 2007). Esta classificação baseiava-se na capacidade de coagular o plasma, sendo esta característica considerada um importante fator de patogenicidade. Contudo, atualmente é admitida outra classificação: *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* não *aureus* (SNA), sendo este último um grupo heterogêneo de estafilococos que têm sido relacionado com a etiologia de infecções, a exemplo das mastites, em

seres humanos e animais (CUNHA; SINZATO; SILVEIRA, 2004; SANTOS, 2008; MEDEIROS et al., 2013, SOUZA et al., 2019). Além disso, já foram detectadas cepas produtoras de Enterotoxinas (EE) e portadoras de genes de resistência a antimicrobianos em isolados de SNA aumentando, desta forma, sua importância clínica (OLIVEIRA, 1999; BORGES et al., 2008).

2.2.1. *Staphylococcus* spp. como agente causador de infecções

Segundo Capparelli et al. (2011), espécies de *Staphylococcus* spp. desenvolveram uma estratégia bem sucedida de evasão do sistema imunológico, envolvendo o acúmulo de uma impressionante variedade de fatores de virulência. Este gênero pode colonizar vários nichos do corpo e causar doenças potencialmente fatais, como pneumonia, osteomielite, septicemia e endocardite.

Grande parte das espécies do gênero *Staphylococcus* é comensal da pele e mucosa de seres humanos e animais e isto facilita sua disseminação, que pode ocorrer de forma direta ou indireta, associada à existência de portadores assintomáticos. Estima-se que entre 20 a 60% da população humana seja portadora da espécie *S. aureus* considerada a de maior patogenicidade dentro desse gênero (SCHMIDLIN et al., 2010; PIRES et al., 2014).

Em estudo retrospectivo realizado por Wille et al. (2014), na França, foi relatado que 129 dos 4290 pacientes submetidos à cirurgias da coluna vertebral no período de 2008 a 2012 apresentaram infecções pós-cirúrgicas. A investigação identificou *S. aureus* como o agente etiológico de maior frequência, responsável por 40% (52/129) dos casos, fato que demonstra a importância deste microrganismo na etiologia de infecções pós-operatórias. Ainda, segundo os autores, o debridamento das feridas, associado à antibioticoterapia prolongada foi a medida efetiva para resolução de 93% das infecções.

S. aureus também pode desencadear quadros respiratórios como a Embolia Pulmonar Séptica (EPS). Nesses quadros são observados nódulos cavitários bilaterais, taquipneia, febre, edema, dor na região torácica, efusão pleural, entre outros sinais clínicos. A EPS é resultado de infecções causadas por isolados de *S. aureus* multirresistentes que geralmente necessitam de antibioticoterapia prolongada, essa infecção tem sido associada com elevada morbidade e mortalidade. Nesses casos, a escolha do antimicrobiano adequado é imprescindível para evitar o surgimento da doença (WONG, 2002).

Dentre os agravos à saúde causados por *Staphylococcus* spp., destacam-se os de origem alimentar. De acordo com dados oficiais do Ministério da Saúde (MS) do Brasil, dentre os dez agentes etiológicos mais identificados nos surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA's) entre 2009 e 2018, *S. aureus* ocupou a terceira posição o que representa 9,4% (228/2431) dos casos. Ainda, segundo o MS tais DTA's estão relacionadas à ingestão de alimentos ou água contaminados, resultantes de falhas higiênico-sanitárias na manipulação e/ou conservação do alimento (BRASIL, 2019).

Além das infecções em seres humanos, *Staphylococcus* spp. pode desencadear quadros infecciosos em caninos, felinos, equinos, dentre outras espécies de animais, como demonstrado na tabela 1.

Tabela 1. Quadros infecciosos causados por *Staphylococcus* spp. em diferentes espécies animais.

Espécie	Infecção	Agente causador	Referência
Felina	Abscesso pancreático	<i>Staphylococcus aureus</i>	Nemoto et al. (2017)
Canina	Infecção do trato urinário	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	Rubin e Gaunt. (2011)
Canina	Infecção do sistema nervoso central	<i>Staphylococcus intermedius</i>	Oliver et al. (2009)
Equina	Infecção de pele	<i>Staphylococcus sciuri</i>	Beims et al. (2017)
Ovina	Mastite	<i>Staphylococcus aureus</i>	Almeida et al. (2019)
Caprina	Mastite	<i>Staphylococcus aureus</i>	Filipe et al. (2018)
Bovina	Mastite	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> , <i>S. simulans</i> e <i>S. chromogenes</i>	Piessens et al. (2012)

Em animais de produção, a exemplo dos bovinos, algumas espécies de estafilococos são comumente associadas à mastite (LANGONI; DOMINGUES; BALDINI, 2006). Esses microrganismos, geralmente, são causadores de mastite contagiosa caracterizada por alta ocorrência de casos subclínicos, onde não são observadas alterações macroscópicas no leite, glândula mamária e sistêmica no animal (BERGONIER et al., 2003; MURICY, 2003; MOTA et al., 2012). Com isso, há o risco de contaminação de equipamentos e utensílios, além da possibilidade de veiculação desse patógeno por meio do leite e derivados para os humanos, podendo desencadear casos de DTA's (ADAMS e MOSS, 2008).

Outra implicação na saúde pública de *Staphylococcus* spp. causadores de mastites, está associada à presença de cepas resistentes a antimicrobianos,

resultado de vários mecanismos desenvolvidos pelo patógeno, além da capacidade de transferência de alguns desses genes para humanos (LIM et al., 2013).

2.3. Mecanismos de resistência de *Staphylococcus* spp. a antimicrobianos

O uso de antimicrobianos é considerado uma das estratégias terapêuticas de maior sucesso tanto na medicina humana quanto na medicina veterinária. No entanto, tem-se observado uma redução na eficácia dos tratamentos com essas drogas em virtude do número crescente de patógenos resistentes, resultando em taxas elevadas de morbidade e mortalidade, bem como no aumento dos custos com os tratamentos (LIN et al., 2015).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a resistência aos antimicrobianos está entre os principais problemas de Saúde Pública do século XXI. Ainda, segundo a OMS, caso uma ação mundial conjunta não seja realizada, há o risco de retorno à era pré-antibiótica quando um número maior de crianças vinha a óbito decorrente de doenças infecciosas e cirurgias não eram realizadas devido ao risco de infecções (WHO, 2005).

Para que estratégias de controle obtenham êxito é preciso conhecer quais mecanismos são responsáveis pela resistência antimicrobiana. Didaticamente, a origem da resistência pode ser dividida em intrínseca e adquirida. A forma intrínseca advém do fato de que muitos compostos antimicrobianos são moléculas produzidas naturalmente e, como tal, as bactérias que compartilham do mesmo *habitat* apresentam mecanismos para superar a ação dessas moléculas para sobreviver. Já na forma adquirida, de maior interesse clínico, uma população bacteriana que, naturalmente era suscetível ao antimicrobiano, torna-se resistente em virtude de mutações em genes cromossômicos ou devido à aquisição de determinantes genéticos externos de resistência (MUNITA e ARIAS, 2016).

A resistência a antimicrobianos é observada em vários gêneros bacterianos com destaque para as bactérias Gram negativo como *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e a família *Enterobacteriaceae*. As bactérias Gram positivo mais resistentes são do gênero *Enterococcus* e *Staphylococcus aureus* (BOUCHER et al., 2009; LOUREIRO et al., 2016). Problemas clínicos causados por isolados de *Staphylococcus aureus* resistentes aos antimicrobianos são relatados desde a década de 1950 quando foram identificados os primeiros isolados produtores de penicilinas. Desde então novos antimicrobianos têm sido

desenvolvidos e novos genes de resistência descobertos (HAWKEY, 2008). Dentre as estratégias de combate às bactérias resistentes, destaca-se o desenvolvimento de gerações mais avançadas de drogas que possuem novos mecanismos de ação, a exemplo das gerações de cefalosporinas (PEACOCK e PATERSON, 2015), a retenção de receita para aquisição de antimicrobianos em farmácias humanas (ANVISA, 2011) e estudos que visam o desenvolvimento de novos compostos químicos e avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de plantas para produção de fitoterápicos (PEIXOTO et al., 2016; SANCHEZ RAMIREZ et al., 2019).

Dentre os antimicrobianos utilizados no controle de infecções causadas por *Staphylococcus* spp., em todo o mundo, destacam-se para os betalactâmicos. Esses antimicrobianos interferem na síntese de peptídeoglicano, componente da parede celular bacteriana, inibindo as Proteínas de Ligação à Penicilina (PBP). Como resultado dessa inibição há formação das ligações entre as cadeias peptídicas de peptídeoglicano e, conseqüentemente, a lise celular (AZEVEDO, 2014). Entretanto, a eficácia das terapias com antimicrobianos dessa classe, tem decaído em virtude da crescente quantidade de isolados resistentes (TORIMIRO; MOSHOOD e EYIOLAW, 2014).

Atualmente são conhecidos três mecanismos responsáveis pela resistência de *Staphylococcus* spp. aos betalactâmicos. O primeiro é a produção de enzimas que inativam os antimicrobianos, resultando na destruição do anel betalactâmico. O segundo é a modificação no alvo do antimicrobiano, causando diminuição, ou perda total da afinidade entre o antimicrobiano e o seu sítio de ligação. Já o terceiro é a ação de bombas de efluxo, que eliminam os antimicrobianos tanto do citoplasma quanto do periplasma bacterianos (COSTA et al., 2013; KUMAR; MUKHERJEE; VARELA, 2013).

2.3.1. Produção de enzimas

A produção de enzimas decorre da expressão de genes que podem ser encontrados tanto no cromossomo bacteriano quanto em plasmídeos e pode ocorrer de forma constitutiva ou indutiva (CASTELLANOS; MARSHAL; RODRÍGUEZ, 2014). Segundo García-Telloa et al. (2014) são conhecidas mais de 890 enzimas e dentre aquelas produzidas por *Staphylococcus* spp., as betalactamases estão incluídas entre os principais mecanismos de resistência aos betalactâmicos, drogas

frequentemente utilizadas, por exemplo, no tratamento de infecções intramamárias (GARINO JUNIOR et al., 2011).

As betalactamases são enzimas extracelulares que agem sobre o anel betalactâmico, provocando sua hidrólise e, conseqüentemente, sua inativação (GARINO JUNIOR et al., 2011). Essas enzimas são codificadas pelo gene *blaZ*, por meio de plasmídeo ou cromossomo que produz uma penicilinase após exposição de *Staphylococcus* spp. aos antimicrobianos betalactâmicos. Após sua expressão, as betalactamases inativam o medicamento por meio da clivagem do anel betalactâmico. A capacidade hidrolítica das betalactamases depende de alguns fatores como a localização, cinética, quantidade e condições físico-químicas (LIVERMORE, 2000). Além disso, o uso indiscriminado de antimicrobianos ocasiona uma pressão seletiva para o aparecimento dessa resistência (MCDUGAL; THORNSBERRY, 1986; LIVERMORE, 2000; TORIMIRO; MOSHOOD; EYIOLAW, 2014; DIAS et al., 2015).

As betalactamases são divididas em quatro grupos de acordo com suas características funcionais de afinidade a substratos e sensibilidade a ação do ácido clavulânico. No grupo 1 estão as cefalosporinases que não são inibidas pelo ácido clavulônico. O grupo 2, que apresenta a maior quantidade de betalactamases, é formado pelas cefalosporinases e betalactamases de largo espectro que são bloqueadas por inibidores de betalactamase. Já o grupo 3 é formado pelas metalobetalactamases, que hidrolisam penicilinas, cefalosporinas e carbapenemas; no entanto, são pouco inibidas por moléculas de betalactâmicos. O grupo 4 é constituído por penicilinases que não são inibidas pelo ácido clavulânico (BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995). Segundo García-Telloa et al. (2014), a identificação do tipo de betalactamase responsável pela resistência é essencial, pois permite a instituição de medidas de controle e prevenção específicas, reduzindo os riscos de insucesso nos tratamentos.

2.3.2. Sistema de efluxo multidrogas

Sistemas ou bombas de efluxo são proteínas integradas por membranas, envolvidas na extrusão de agentes tóxicos como antibióticos, biocidas e metais tóxicos de dentro das bactérias para o meio ambiente. Eles são codificados no cromossomo ou em plasmídeos e realizam o transporte ativo do antimicrobiano para fora da célula, uma vez que são encontrados em seu citoplasma. Desta forma,

impedem que a droga atinja concentrações inibitórias no interior celular (PROJAN et al., 2005; MICAS, 2008).

O papel fisiológico desses sistemas não está totalmente elucidado, mas sua atividade tem sido relacionada a três mecanismos: eliminação de metabólitos endógenos nocivos à célula, à secreção dos determinantes da virulência e às respostas ao estresse celular, sugerindo que as drogas são “substratos acidentais” desses transportadores (POOLE, 2008). No entanto, a sua capacidade de expulsar antimicrobianos, tanto de origem sintética quanto de origem natural pode acarretar em um grave problema no tratamento de infecções, especialmente as causadas por bactérias do gênero *Staphylococcus*, devido à sua patogenicidade decorrente da produção de vários fatores de virulência (PROJAN et al., 2005).

Em *Staphylococcus* spp. já foram identificados mais de 20 sistemas de efluxo que são classificados em cinco famílias de proteínas de membrana: *The Major Facilitator Superfamily (MFS)*, *The Small Multidrug Resistance (SMR) Family*, *The Multidrug and Toxin Extrusion (MATE) Family*, *The ATP-binding Cassette (ABC) Superfamily*, and *the Resistance-Nodulation-Division (RND) Superfamily*. Dentre essas famílias, a MFS é a mais estudada em virtude da capacidade de conferir multirresistência em *Staphylococcus* spp. e nela estão presentes os sistemas *norA*, *norB*, *norC*, *tet – 38*, *ImrS*, *mdeA*, *sdrM*, *qacA* e *qacB*. Além da MFS, o estudo da família ABC também é de importância para estafilococos e nela estão presentes os sistemas *msrA*, *sav1866*, *abcA*, *vgaA*, *vga(A)LC* e *vgaB* que utilizam a hidrólise de ATP como fonte de energia para seu transporte, diferentemente das famílias *MFS*, *SMR* e *MATE* que utilizam gradiente eletroquímico (TRUONG-BOLDUC; STRAHILEVITZ; HOOPER, 2006; KUMAR; MUKHERJEE; VARELA, 2013; JANG, 2016).

Apesar de serem conhecidos há certo tempo, o estudo dos sistemas de efluxo multidrogas é algo que vem ganhando destaque, pois tanto a produção de enzimas, quanto a modificação do sítio de ação figuravam o centro das pesquisas sobre resistência antimicrobiana. A possibilidade desses sistemas conferirem fenótipos de multirresistência às drogas e que o mesmo sistema pode conferir resistência a antimicrobianos sintéticos e naturais têm modificado essa realidade (COSTA et al., 2013).

2.3.3. Modificação do sítio de ação

O último mecanismo responsável pela resistência de *Staphylococcus* spp. aos betalactâmicos é a modificação no sítio de ação que é mediado pelos Cassetes Cromossomais de *Staphylococcus* (SCCmec). A aquisição dos SCCmec ocorreu no início da década de 1960, sendo considerada um evento determinante na evolução desse gênero bacteriano, pois é responsável pelo surgimento de isolados multirresistentes, principalmente aos betalactâmicos (CRISOSTOMO et al., 2001).

A ação dos betalactâmicos sobre *Staphylococcus* spp. ocorre por meio de ligação com as Proteínas de Ligação à Penicilina (PBP), resultando na lise das células bacterianas. Atualmente são conhecidos 12 tipos de SCCmec todos com exceção do tipo XI, possuem o gene *mecA* que codifica uma PBP denominada de PBP2a/PBP2' e um peptídeoglicano transpeptidase resultando em uma reduzida afinidade aos betalactâmicos (LEE et al., 2018). Tal codificação permite que *Staphylococcus* spp. mantenha sua biossíntese até em concentrações consideradas inibitórias desses antimicrobianos (LIVERMORE, 2000; PATERSON; HARRISON; HOLMES, 2014).

O SCCmec tipo XI é o único portador do gene *mecC* responsável pela codificação da proteína PBP2a_{LGA} que possui mecanismo de ação semelhante ao dos SCCmec portadores do gene *mecA*. No entanto, o nível de resistência depende de alguns fatores como o próprio *mecC* e outros determinantes genéticos presentes no isolado (KIM et al., 2012).

Recentemente, em 2018, na Alemanha foi identificado um isolado de *S. aureus* proveniente de swab nasal e de garganta de um paciente do gênero masculino que não apresentava sinais clínicos de infecção. O crescimento do isolado ocorreu em ágar MRSA, o mesmo apresentava resistência fenotípica a cefoxitina e oxacilina, mas o resultado da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tanto para *mecA* quanto para *mecC* foi negativo assim como para a detecção da proteína PBP2a. Entretanto ao realizar a PCR para o *mecB* o resultado foi positivo, sendo esse o primeiro relato da detecção do gene em *Staphylococcus* spp. pois, acreditava-se que apenas *Micrococcus caseolyticus* era portador de *mecB*. Apesar da descoberta o mecanismo de resistência codificado pelo *mecB* ainda não foi esclarecido (BECKER et al., 2018; LEE et al., 2018).

Os genes *mecA*, *mecC* e o recém identificado *mecB* são responsáveis por conferir resistência à metilina em isolados de *Staphylococcus* spp., que são conhecidos como *Staphylococcus* Resistente à Metilina (MRS), seja a espécie *Staphylococcus aureus* (MRSA) ou *Staphylococcus* Coagulase Negativo Resistente à Metilina (MRSCN) (LIM et al., 2013; PEACOCK; PATERSON, 2015; LEE et al., 2018).

2.4. *Staphylococcus* spp. resistentes à metilina (MRS)

A metilina é um antimicrobiano da classe dos betalactâmicos, lançada comercialmente no início da década de 60. Cerca de um ano após o início de sua comercialização foi identificado o primeiro isolado clínico de MRSA (JEVONS, 1961).

Em 2009, um estudo realizado por García-Alvarez (2009) sobre a epidemiologia da mastite bovina na Inglaterra identificou, em amostras de leite de tanques, uma cepa de *S. aureus* que apresentava características fenotípicas de MRSA (resistência à oxacilina e cefoxitina). Essa cepa foi identificada como *S. aureus* LGA251 e apesar de apresentar perfil fenotípico, foi negativa para o gene *mecA* na técnica de PCR. Posteriormente, essa cepa foi sequenciada e os resultados do genoma demonstraram que possuía um gene homólogo (aproximadamente 60% de identidade) ao *mecA* e com isso recebeu a denominação de *mecA*_{LGA251} (GARCÍA-ÁLVAREZ et al., 2011). Porém, em 2012 o *mecA*_{LGA251} foi renomeado para *mecC*, pois apresenta menos de 90% de homologia com o *mecA* (ITO et al., 2012). Desde a sua primeira descrição, tem aumentado a identificação de MRS portadores do gene *mecC*, principalmente na Europa e até o momento não há relatos de MRS portador de *mecC* no continente americano (PATERSON; HARRISON; HOLMES, 2014; PORRERO et al., 2014; MELO et al., 2018).

Cepas de MRS já foram identificadas em casos de mastite bovina em diversas partes do mundo como Grã-Bretanha, Coreia e Alemanha (FESSLER et al., 2010; LIM et al., 2013; PATERSON et al., 2014). No Brasil, existem poucos relatos na literatura de casos de mastite causadas por MRS, demonstrando a necessidade da realização de estudos que venham a contribuir para a epidemiologia da infecção por esse patógeno no país (GUIMARÃES, 2011; SILVA et al., 2014).

2.5. *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina em casos de mastite bovina

2.5.1. Aspectos epidemiológicos e clínicos

O primeiro relato da infecção de MRS em animais domésticos ocorreu em 1972, na Bélgica, em casos de mastite em vacas leiteiras (DEVRIESE et al., 1972). Desde então, esporadicamente, são relatados casos de mastite por esse patógeno (FEBLER et al., 2010; LIM et al., 2013; PATERSON et al., 2014). A disseminação de MRS no ambiente pecuário, principalmente da espécie *S. aureus* levou a criação do termo LA-MRSA, do inglês *MRSA associated with livestock* que em português poderia ser traduzido como MRSA ligado ao ambiente pecuário (HUBER et al., 2010a).

A meticilina não é um antimicrobiano comumente utilizado no tratamento de mastite, porém já foi reportado que o contato entre seres humanos e animais positivos para MRS e vice-versa pode favorecer a transmissão do patógeno entre as espécies. No estudo realizado por Juhász-Kaszanyitzky et al. (2007) com vacas com mastite subclínica e trabalhadores (veterinários, ordenhadores e assistentes) de fazendas leiteiras na Hungria foi sugerida a transmissão horizontal de isolados de MRSA entre seres humanos e vacas. A possibilidade dessa forma de transmissão surge como um fator a ser considerado na epidemiologia das mastites causadas por MRS que é o caráter ocupacional da infecção (JUHÁSZ-KASZANYITZKY et al., 2007). Este fato foi corroborado pelos resultados obtidos por Wulf et al. (2008) com 272 veterinários de todo o mundo onde foi identificado MRSA em 34 (12,5%) deles. Segundo os autores, os profissionais que têm contato direto com animais apresentam um risco potencial de se tornarem portadores do patógeno.

Além da possibilidade de transmissão entre humanos e animais, o ambiente também pode favorecer a infecção de animais por MRS. Sabe-se que MRS pode sobreviver durante meses no ambiente, desde que existam condições favoráveis para sua manutenção como umidade e temperatura (LIM et al., 2013). No estudo realizado por Lim et al. (2013) foram identificadas cepas de MRS em teteiras, piso, cercas de proteção e do sistema de ventilação de fazendas leiteiras na Coreia. Segundo os autores, os resultados do estudo demonstram a necessidade da adoção

de medidas preventivas quanto à transmissão de MRS entre humanos, animais e ambiente das fazendas.

Nos rebanhos leiteiros, as taxas de infecção podem variar de 0,05 a 47,6% (tabela 2). Sendo a maior taxa já relatada encontrada em animais que apresentam casos de mastite clínica (PU et al., 2014). Nesses casos os animais apresentam um quadro agudo da infecção. Entretanto, a mastite ocasionada por MRS apresenta patogênese homóloga à desencadeada por outros *Staphylococcus* spp. que se caracteriza pela forma subclínica da infecção, com elevação na quantidade de células somáticas (>200.000 céls/mL). (VANDERHAEGHEN et al., 2010; LIM et al., 2013; CHANDRASEKARAN et al., 2014a, 2014b; PU et al., 2014).

Tabela 2. Frequência de *Staphylococcus* Meticilina-resistente (MRS) em casos de mastite bovina no mundo.

País	Microrganismo	Frequência de MRS	Referência
Coreia do Sul	<i>S. aureus</i>	1,3% (12/894)	Lee (2003)
Paquistão	<i>S. aureus</i>	10,3% (8/77)	Farzana et al. (2004)
Turquia	<i>S. aureus</i>	17,5% (18/103)	Turutoglu; Ercelik; Ozturk, 2006)
Alemanha e Suíça	<i>S. aureus</i>	1,5% (2/128)	Monecke et al. (2007)
Coreia do Sul	<i>S. aureus</i> SCN*	2,5% (21/840) 2,4% (19/840)	Moon et al. (2007)
Turquia	<i>S. aureus</i>	22% (13/59)	Ciftci et al. (2009)
Bélgica	<i>S. aureus</i>	9,3% (11/118)	Vanderhaeghen et al. (2010)
Canadá	<i>S. aureus</i>	0,05% (1/1810)	Saini et al. (2012)
Egito	<i>S. aureus</i>	3,1% (3/95)	Kamal et al. (2013)
China	<i>S. aureus</i>	47,6% (49/103)	Pu et al. (2014)
Índia	<i>S. aureus</i>	3,1% (3/95)	Chandrasekaran et al. (2014b)
Bangladesh	<i>S. aureus</i>	20% (29/145)	Hoque et al. (2018)
Argentina	<i>S. aureus</i> SCN*	3,3% (1/30) 6,7% (10/150)	Srednik et al. (2019)
Brasil – Distrito Federal	<i>S. aureus</i>	22,8% (17/75)	Andrade (2012)
Brasil – Rio de Janeiro	SCN*	4% (4/100)	Soares et al. (2012)
Brasil – Paraíba	<i>Staphylococcus</i> spp.	30,4% (14/46)	Matos (2014)
Brasil – São Paulo	SCN*	4,6% (24/518)	Silva et al. (2014b)
Brasil – vários estados	SCN*	5,9% (10/170)	Santos et al. (2016)
Brasil – Rio de Janeiro	SCN*	10,3% (15/145)	Melo et al. (2018)

*SCN = *Staphylococcus* Coagulase Negativo

2.5.2. Técnicas de diagnóstico da mastite causada por MRS

Na mastite causada pelo MRS há predominância dos casos subclínicos. Com isso, a contagem eletrônica de células somáticas (CCS) no leite pode ser utilizada

como técnica de triagem com posterior isolamento e/ou identificação do microrganismo (LIM et al., 2013).

Para o isolamento de MRS, as amostras de leite podem ser cultivadas em vários meios de cultura como o ágar base acrescido de sangue ovino, o ágar MRSA (seletivo para *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina), ágar Muller Hinton e o ágar sal manitol. As condições de crescimento são praticamente as mesmas nesses meios de cultura, com incubação na faixa de 35-37°C por 24/48 horas, sob aerobiose. Antes do plaqueamento pode ser realizado um pré-enriquecimento em meios líquidos como caldo Muller Hinton contendo 6,5% de NaCl e/ou caldo triptona de soja contendo cefoxitina (3,5 mg/L) (KAMAL; BAYOUMI; ABD EL AAL, 2013b; LIM et al., 2013; CHANDRASEKARAN et al., 2014a; VISHNUPRIYA et al., 2014). Após o crescimento das colônias podem ser realizadas provas bioquímicas como teste da catalase, coagulase e fermentação da glicose para diferenciação das espécies de estafilococos (SILVA et al., 1997).

Fenotipicamente, a resistência à meticilina pode ser identificada por meio dos testes de sensibilidade aos antimicrobianos e Concentração Inibitória Mínima (CIM). Em ambos os casos, as drogas de eleição são a cefoxitina e/ou oxacilina (CLSI, 2018). De acordo com Müller et al. (2015), pode-se tentar aumentar a expressão da resistência à meticilina submetendo o microrganismo a uma temperatura de incubação entre 33-35°C por 24 horas e adição de cloreto de sódio ao meio de cultura. Em estudo realizado por Kim et al. (2012) foi observado que cepas portadoras do gene *mecC* apresentam instabilidade a temperatura de 37°C, decorrente de modificações estruturais na PBP2a/PBP2', demonstrando maior capacidade de expressão da resistência a temperaturas entre 25-30°C.

Em nível molecular, é possível identificar MRS utilizando a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) por meio da amplificação dos genes *mecA*, *mecB* e *mecC*. A PCR é a técnica mais utilizada para detecção de MRS e como se baseia na amplificação do DNA, gera resultados confiáveis, diminuindo o risco da identificação de falsos negativos (PATERSON et al., 2012a; CHANDRASEKARAN et al., 2014b; MÜLLER et al., 2015).

Adicionalmente à PCR, existem técnicas de tipagem de MRS como a *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE) e a *Multi-Locus Sequence Typing* (MLST) e, ambas constituem importantes ferramentas em estudos de epidemiologia molecular. Com o emprego dessas técnicas é possível rastrear a origem e analisar a correlação

genética das amostras e tais informações podem ser consideradas para instituir medidas de controle do patógeno nos rebanhos (MCDUGAL et al., 2003; JUHÁSZ-KASZANYITZKY et al., 2007; PATERSON et al., 2012b; LIM et al., 2013).

A PFGE consiste na análise de macrofragmentos de DNA, possibilitando determinar a similaridade ou divergência genética entre isolados bacterianos (MANNU; PABA, 2002; VERNILE et al., 2008). O princípio da técnica é baseado no uso de enzimas de restrição que realizam cortes no DNA durante sua digestão, resultando na formação de fragmentos que são separados por meio da eletroforese, logo após são fotodocumentados e, posteriormente, submetidos à análise computacional para interpretação dos resultados obtidos (KAGKLI et al., 2007; KAHALA et al., 2008; GRÖNTHAL et al., 2017). Essa técnica é considerada o *gold test* para tipagem de MRS, em virtude do seu potencial de diferenciação de isolados, sendo amplamente utilizada em estudos de epidemiologia da disseminação do patógeno (KHAMBATY; BENNETT; SHAH, 1994; MCDUGAL et al., 2003; OSTOJIC, 2008; LIM et al., 2013; HUSSAIN; NAQVI; SHARAZ, 2019).

Em conjunto com a PFGE vem sendo empregada para a tipagem de isolados de MRS a MLST, que permite distinguir se os isolados são de origem humana, ambiental ou animal. Com o emprego dessa técnica é possível inferir a possível fonte de infecção e, a partir dessa informação, estabelecer estratégias para controle e prevenção das mastites (MCDUGAL et al., 2003; CHAKRABORTY et al., 2019). Para realização da MLST é necessário que o isolado seja submetido a uma PCR para determinado gene alvo, em seguida os produtos da reação devem ser submetidos ao sequenciamento genético, alinhados em programas de bioinformática e as sequências são submetidas a bancos de dados. Onde é realizada a comparação entre a submetida e as depositadas, gerando as *Sequence Types* (ST), que são os identificadores da origem do isolado (HUBER et al., 2010b; DE ALMEIDA et al., 2011; WU et al., 2015; SCHMIDT; KOCK; EHLERS, 2017; MAGNA CORÔA LIMA, 2018).

Adicionalmente à PCR e às técnicas de tipagem, existem as plataformas de sequenciamento genético que realizam a decodificação do DNA tanto de MRS quanto de qualquer outro tipo de microrganismo. Tais plataformas são divididas em gerações: a primeira contempla o sequenciamento *Sanger* que decodifica desde genes até genomas e para esse último caso apresenta como desvantagens o elevado custo e tempo (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977; SHEKHAR

PAREEK; SMOZYNSKI; TRETYN, 2011). A segunda geração de sequenciadores é denominada de *Next Generation Sequencing* (NGS) que, quando comparada à primeira geração, apresenta como vantagens: redução de custo e tempo para sequenciamento de genomas e maior quantidade e confiabilidade de dados (SCHUSTER, 2008; SHENDURE; JI, 2008; HENSON; TISCHLER; NING, 2012).

Outro método de detecção de MRSA é a identificação da proteína PBP2a, codificada pelos genes de resistência à meticilina. Para isso existem testes comerciais de aglutinação em látex e Ensaio Imunoenzimático (ELISA) (PATERSON; HARRISON; HOLMES, 2014; MÜLLER et al., 2015).

2.5.3. Profilaxia das infecções por MRS em fazendas leiteiras

As medidas de controle da mastite causada por MRS devem contemplar a identificação dos casos e do patógeno envolvido, segregação dos animais e estudo epidemiológico da fonte de infecção para o rebanho. Inicialmente deve-se realizar a identificação dos animais portadores, para que esses sejam separados do rebanho para tratamento. Por se tratar de uma mastite bacteriana, a antibioticoterapia é o tratamento de eleição; como o MRS confere uma resistência a praticamente todos os betalactâmicos, o teste de suscetibilidade aos antimicrobianos pode fornecer informações de quais drogas podem ou não ser utilizadas (MOON et al., 2007; SCHNITT; TENHAGEN, 2019).

No tratamento de infecções causadas por MRS em ambiente hospitalar utiliza-se a vancomicina, apesar de já terem sido identificadas cepas de *Staphylococcus* spp. resistentes a esse antimicrobiano. Animais cronicamente infectados e/ou que apresentem casos de mastite recorrentes devem ser descartados, por se tratar de uma importante fonte de infecção para o rebanho (RADOSTITS et al. 2000; RABELO et al., 2014; PEACOCK; PATERSON, 2015).

O caráter ocupacional da infecção por MRS deve ser levado em consideração nos inquéritos epidemiológicos de mastite bovina, pois a fonte de infecção para as vacas pode ser um trabalhador (veterinário, ordenhador, técnico agropecuário, entre outros) que tenha contato direto com os animais. Nesse sentido, é essencial a adoção de hábitos higiênicos, além da realização de exames no ato da admissão e periodicamente com esses profissionais (JUHÁSZ-KASZANYITZKY et al., 2007; WULF et al., 2008; LIM et al., 2013). Além disso, equipamentos e utensílios de ordenha, bem como o ambiente de confinamento dos animais devem permanecer

limpos e higienizados, pois também podem ser vias de transmissão tanto para o rebanho quanto para os trabalhadores das fazendas (Lim et al., 2013).

2.5.4. Terapias alternativas ao uso de antimicrobianos

A resistência aos antimicrobianos é considerada um problema mundial, e com isso têm-se estimulado o uso racional dessas drogas seja na medicina humana e/ou veterinária. Ademais, há um aumento das pesquisas com o objetivo de desenvolver alternativas ao uso dos antimicrobianos, a exemplo de polímeros e fitoterápicos (WHO, 2005; PEIXOTO et al., 2016; SANCHEZ RAMIREZ et al., 2019).

No ambiente agropecuário de produção de leite, os antimicrobianos são largamente utilizados no tratamento das mastites (SCHNITT; TENHAGEN, 2019). Com isso, quando se trata do uso de terapias alternativas nesse ambiente a literatura é concentrada na avaliação da atividade antimicrobiana frente às bactérias causadoras desta enfermidade (AMARANTE et al., 2019).

Bacteriófagos, bactérias ácido lácticas, nanopartículas de compostos químicos e extratos ou óleos essenciais de plantas estão entre as alternativas relatadas frente a *Staphylococcus* spp. isolados de casos de mastite bovina (VALENCIA QUINTERO; SERNA COCK; CAMPOS, 2011; ABAD, 2017; DIAS DA COSTA JUNIOR et al., 2018; BERGUENMAIER DE OLANDA et al., 2019; LEITE et al., 2019; SPERANDIO et al., 2019). No estudo realizado por Leite et al. (2019), foi verificada a ação lítica de bacteriófagos isolados do ambiente de fazendas leiteiras frente a *Staphylococcus aureus*, e segundo os autores a fagoterapia tem potencial de utilização em vacas leiteiras. Já as bactérias ácido lácticas podem ser utilizadas tanto no tratamento quanto na prevenção da mastites, em virtude do antagonismo e/ou produção de substâncias com atividade antimicrobiana (VALENCIA QUINTERO; SERNA COCK; CAMPOS, 2011).

Nanopartículas apresentam ampla atividade antimicrobiana em virtude dos diferentes mecanismos de ação que desenvolvem. Dentre esses, pode-se citar a alteração da parede celular e do citoplasma, modificação dos níveis de ATP, da permeabilidade e respiração da membrana celular, além da inibição na replicação bacteriana do DNA, resultando na produção de radicais livres (ABAD, 2017; DIAS DA COSTA JUNIOR et al., 2018). Dentre as nanopartículas que vêm sendo estudadas para possível aplicação como alternativa aos antimicrobianos, têm-se as de PPy que é um polímero obtido por meio da polimerização oxidativa química ou

eletroquímica de soluções de monômeros (Sajesh et al., 2013). Tendo sido relatado seu uso na engenharia e ciências biomédicas (de Oliveira and de Oliveira, 2014; Xue et al., 2014). A atividade antimicrobiana de PPy frente a *Staphylococcus aureus*, bem como a outras bactérias Gram positivo e negativo já foi relatada na literatura (Sayyah et al., 2014; da Silva et al., 2017). Sabe-se que o polímero possui ação bactericida decorrente do colapso da membrana citoplasmática que resulta na morte bacteriana (Varesano et al., 2013; Sanchez Ramirez et al., 2019).

A avaliação da atividade antimicrobiana de plantas concentra o maior número de estudos. De acordo com Silva et al. (2019), plantas medicinais apresentam potencial terapêutico frente às bactérias causadoras de mastites em ruminantes, sendo alternativas à antibioticoterapia. Para Fiordalisi; Honorato; Kuhnen (2019) e Sperandio et al. (2019), a composição química das plantas é determinante para sua atividade antimicrobiana. Neste contexto a *Moringa oleifera* (família *Moringaceae*) que é uma árvore cultivada nas regiões de trópicos e subtropicais em todo o planeta surge como uma alternativa (Pontual et al., 2012). Suas sementes têm sido utilizadas para tratamento e redução da turbidez da água destinada ao consumo humano, além disso suas flores são consumidas e possuem ação terapêutica como hipoglicêmico, tônico e diurético (Moura et al., 2011; Santos et al., 2012). Também há comprovação da sua atividade larvicida frente a *Aedes aegypti* e antiparasitária frente a *Trypanosoma cruzi* (Pontual et al., 2012; 2018). Na literatura há relatos da atividade de *Moringa oleifera* frente a *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* (Viera et al., 2010; Moura et al., 2011; Marrufo et al., 2013; Zaffer et al., 2014; Fayemi et al., 2018; Fouad et al., 2019) achados que indicam a possibilidade do aplicação dessa planta como alternativa ao uso de antimicrobianos.

Apesar dos inúmeros estudos ainda é preciso avançar na investigação e caracterização das frações presentes nesses compostos a fim de desenvolver produtos que possam ser utilizados no tratamento de animais infectados (SILVA et al., 2019).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Identificar cepas de *Staphylococcus* spp. resistentes a metilina em amostras de leite, ambiente e trabalhadores no ambiente agropecuário no estado de Pernambuco.

3.2. Objetivos específicos

- Determinar a frequência de mastite bovina causada por *Staphylococcus* spp. em fazendas leiteiras no estado de Pernambuco.

- Detectar os genes *mecA* e *mecC* responsáveis pela resistência à metilina em cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas de casos de mastite bovina, ambiente e ordenhadores.

- Realizar a tipagem das cepas de *S. aureus* resistentes à metilina por meio de Eletroforese em Gel Pulsante (PFGE).

- Detectar os genes *norA*, *norB*, *norC*, *tet -38*, *lmrS*, *mgrA* e *msrA* de sistemas de efluxo multidrogas *Staphylococcus* spp. isolados de casos de mastite bovina, ambiente e ordenhadores.

- Avaliar a atividade antimicrobiana do extrato aquoso da semente da *Moringa oleifera* e do polipirrol sobre *Staphylococcus* spp. portadores de genes de sistemas de efluxo multidrogas em isolados de mastite bovina, ambiente e ordenhadores.

4. REFERÊNCIAS

- ADAMS M. R., MOSS M. O. 2008. Food Microbiology. Editora The Royal Society of Chemistry. 3ª edição.
- A. GARCÍA-TELLO et al. Betalactamasas de espectro extendido en las infecciones del tracto urinario causadas por enterobacterias: aproximación a su conocimiento y pautas de actuación. **Actas Urológicas Españolas**, v. 38, n. 10, p. 678–684, 2014.
- ABAD, A. C. A. **Caracterização genética e eficácia antibacteriana de nanopartículas de polipirrol frente a *Staphylococcus aureus* isolados de mastite em vacas e cabras no estado de Pernambuco, Brasil**. 2017. 102 Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2017.
- ACOSTA, A. C. et al. Mastites em ruminantes no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 7, p. 565–573, 2016.
- AMARANTE, J. F. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of two extract of propolis against isolates of *Staphylococcus* spp. and multiresistant bacteria. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 39, n. 9, p. 734–743, set. 2019.
- ANDRADE, H. H. DE. **Genotipagem de Cepas de *Staphylococcus aureus* Isolados de Mastites Subclínicas Bovina no Distrito Federal e Entorno**. 2012. UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, 2012.
- ANDRÉ, M. C. D. P. B. et al. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from food handlers, raw bovine milk and Minas Frescal cheese by antibiogram and pulsed-field gel electrophoresis following Smal digestion. **Food Control**, v. 19, n. 2, p. 200–207, fev. 2008. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713507000679>>.
- ANVISA. RESOLUÇÃO-RDC Nº 20, DE 5 DE MAIO DE 2011. **Dispõe sobre o controle de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos, de uso sob prescrição, isoladas ou em associação**. 2011.
- AZEVEDO, S. M. M. **Farmacologia dos Antibióticos Beta-lactâmicos**. [s.l: s.n.].
- BECKER, K. et al. Plasmid-Encoded transferable mecB-mediated methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 24, n. 2, p. 242–248, 2018.
- BEIMS, H. et al. Isolation of *Staphylococcus sciuri* from horse skin infection. **Open Veterinary Journal**, v. 6, n. 3, p. 242, 2017.
- BERGONIER, D. et al. Mastitis of dairy small ruminants. **Veterinary Research**, v. 34, n. 5, p. 689–716, set. 2003.
- BERGUENMAIER DE OLANDA, G. et al. Estabilidade da atividade antibacteriana do extrato de *Pluchea sagittalis* (LAM.) *Cabrera* frente a microrganismos causadores da mastite bovina. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 22, n. 1, p. 21–25, 23 set. 2019.

BORGES, M. de F. et al. Perfil de contaminação por *Staphylococcus* e suas enterotoxinas e monitorização das condições de higiene em uma linha de produção de queijo de coalho. **Ciência Rural**, v. 38, n. 5, p. 1431–1438, 2008.

BOUCHER, H. W. et al. Bad Bugs, No Drugs: No escape! An Update from the Infectious Diseases Society of America. **IDSA Report on Development Pipeline • CID**, v. 48, n. 1, p. 1–12, 2009.

BRAKSTAD, O. G.; AASBAKK, K.; MAELAND, J. A. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the nuc gene. **Journal of clinical microbiology**, v. 30, n. 7, p. 1654–60, jul. 1992.

BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. MINIREVIEW A Functional Classification Scheme for Lactamases and Its Correlation with Molecular Structure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 6, p. 1211–1233, 1995.

CAPPARELLI, R. et al. The *Staphylococcus aureus* peptidoglycan protects mice against the pathogen and eradicates experimentally induced infection. **PLoS ONE**, v. 6, n. 12, 2011.

CASTELLANOS, T. G.; MARSHAL, A. C.; RODRÍGUEZ, D. S. Mecanismos de resistencia a betalactámicos en bacterias gram negativas. **Revista Cubana de Salud Pública**, v. 40, n. 1, p. 0–0, jun. 2014.

CHAKRABORTY, S. et al. Technological interventions and advances in the diagnosis of intramammary infections in animals with emphasis on bovine population –a review. **Veterinary Quarterly**, v. 39, n. 1, p. 76–94, 9 jul. 2019.

CHANDRASEKARAN, D. et al. A study on Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy cows. **Journal of Applied and Natural Science**, v. 6, n. 2, p. 356–361, 2014a.

CHANDRASEKARAN, D. et al. Pattern of antibiotic resistant mastitis in dairy cows. **Veterinary World**, v. 7, n. 6, p. 389–394, jun. 2014b.

CIFTCI, A. et al. Detection of methicillin resistance and slime factor production of *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 254–261, 2009.

CLSI. **PerforCLSI. (2018). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Clinical and Laboratory Standards Institute. Retrieved from www.clsi.org** **mance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing.** [s.l: s.n.]

COSTA, H. N. et al. Mastite subclínica baseada em duas metodologias de análise. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69, n. 3, p. 579–586, 2017.

COSTA, S. S. et al. Multidrug Efflux Pumps in *Staphylococcus aureus*: an Update. **The Open Microbiology Journal**, v. 7, p. 59–71, 2013.

CRISOSTOMO, M. I. et al. The evolution of methicillin resistance in *Staphylococcus*

aureus: Similarity of genetic backgrounds in historically early methicillin-susceptible and -resistant isolates and contemporary epidemic clones. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 17, p. 9865–9870, 14 ago. 2001.

CUNHA, M. D. L. R. S.; SINZATO, Y. K.; SILVEIRA, L. V. A. Comparison of methods for the identification of coagulase-negative staphylococci. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 8, p. 855–860, 2004.

DE ALMEIDA, L. M. et al. Novel sequence types (STs) of *Staphylococcus aureus* isolates causing clinical and subclinical mastitis in flocks of sheep in the northeast of Brazil. **Journal of Dairy Research**, v. 78, n. 3, p. 373–378, 21 ago. 2011.

DEMEU, F. A. et al. Efeito da produtividade diária de leite no impacto econômico da mastite em rebanhos bovinos. **Boletim de Indústria Animal**, v. 73, n. 1, p. 53–61, 2016.

DIAS DA COSTA JUNIOR, S. et al. Silver nanoparticles as a promising therapeutic strategy for infections caused by resistant bacteria in cattle and birds. **Approaches in Poultry, Dairy & Veterinary Sciences**, v. 4, n. 3, p. 2–5, 2018.

EMBRAPA. Anuário do leite 2019. **Agropecuária, Empresa Brasileira de Pesquisa**, p. 104, 2019.

FAO. **Perspectivas dos alimentos - uma análise dos mercados mundiais (leite e produtos lácteos)**. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/011/ai474e/ai474e10.htm>>. Acesso em: 30 ago. 2019.

FARZANA, K. et al. Antibiotic resistance pattern against various isolates of *Staphylococcus aureus* from raw milk samples. **Journal of Research Science**, v. 15, n. 2, p. 145–151, 2004.

FESSLER, A. et al. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from cases of bovine mastitis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 4, p. 619–625, 1 abr. 2010.

FILIPE, J. et al. Pentraxin 3 is up-regulated in epithelial mammary cells during *Staphylococcus aureus* intra-mammary infection in goat. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 59, p. 8–16, 2018.

FIORDALISI, S. D. A. L.; HONORATO, L. A.; KUHNEN, S. Seasonal variation of propolis from southern Brazil: **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 56, n. 1, p. e149146, 5 jul. 2019.

GARCÍA-ÁLVAREZ, L. et al. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel mecA homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. **Articles Lancet Infect Dis**, v. 11, p. 595–603, 2011.

GARINO JUNIOR, F. et al. Suscetibilidade a antimicrobianos e produção de betalactamase em amostras de *Staphylococcus* isolados de mastite caprina no semiárido paraibano. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 78, n. 1, p. 103–107, 2011.

GRÖNTHAL, T. et al. Antimicrobial resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* and the molecular epidemiology of methicillin-resistant *S. pseudintermedius* in small animals in Finland. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 4, p. 1021–1030, 2017.

GUIMARÃES, F. D. F. **Perfil de sensibilidade microbiana, pesquisa de gene *mecA* de resistência à meticilina e detecção molecular de genes codificadores de enterotoxinas, em espécies de estafilococos coagulase positiva e negativa, isolados de mastites bovinas.** 2011. Universidade Estadual Paulista- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2011.

HAWKEY, P. M. The growing burden of antimicrobial resistance. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 62 Suppl 1, p. 1–9, 2008.

HENSON, J.; TISCHLER, G.; NING, Z. Next-generation sequencing and large genome assemblies. **Pharmacogenomics**, v. 13, n. 8, p. 901–915, 2012.

HOQUE, M. N. et al. Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* strains in bovine mastitis milk in Bangladesh. **International Journal of Veterinary Science and Medicine**, v. 6, n. 1, p. 53–60, 3 jun. 2018.

HUBER, H. et al. Prevalence and characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in humans in contact with farm animals, in livestock, and in food of animal origin, Switzerland, 2009. **Euro Surveill**, v. 15, n. 16, p. 1–4, 2010a.

HUBER, H. et al. Prevalence and characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in humans in contact with farm animals, in livestock, and in food of animal origin, Switzerland, 2009. **Eurosurveillance**, v. 15, n. 16, p. 7–10, 2010b.

HUSSAIN, M. S.; NAQVI, A.; SHARAZ, M. Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA); **The Professional Medical Journal**, v. 26, n. 01, p. 1–14, 2019.

INTRAKAMHAENG, M. et al. Incidence of enterotoxin-producing MRSA in bovine mastitis cases, bulk milk tanks and processing plants in Thailand. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 11, n. 5, p. 655–661, 2012.

ITO, T. et al. Guidelines for Reporting Novel *mecA* Gene Homologues . **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 10, p. 4997–4999, 2012.

JAMROZY, D. M. et al. Comparative genotypic and phenotypic characterisation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 isolated from animals and humans. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, 2012.

JANG, S. Multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus* and their clinical implications. **Journal of Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 1–8, 2016. Disponível em: <<http://www.membranetransport.org>>.

JEVONS, M. P. "Celbenin "-Resistant Staphylococci. **British Medical Association**, v. 1, p. 124–125, 1961.

JUHÁSZ-KASZANYITZKY, É. et al. MRSA transmission between cows and humans.

Emerging Infectious Diseases, v. 13, n. 4, p. 630–632, 2007.

KAGKLI, D. M. et al. *Enterococcus* and *Lactobacillus* contamination of raw milk in a farm dairy environment. **International Journal of Food Microbiology**, v. 114, n. 2, p. 243–251, 2007.

KAHALA, M. et al. Characterization of starter lactic acid bacteria from the Finnish fermented milk product viili. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, n. 6, p. 1929–1938, 2008.

KAMAL, R. M.; BAYOUMI, M. A.; ABD EL AAL, S. F. MRSA detection in raw milk, some dairy products and hands of dairy workers in Egypt, a mini-survey. **Food Control**, v. 33, n. 1, p. 49–53, set. 2013a.

KAMAL, R. M.; BAYOUMI, M. A.; ABD EL AAL, S. F. A. MRSA detection in raw milk, some dairy products and hands of dairy workers in Egypt, a mini-survey. **Food Control**, v. 33, n. 1, p. 49–53, 2013b.

KHAMBATY, F. M.; BENNETT, R. W.; SHAH, D. B. Application of pulsed-field gel electrophoresis to the epidemiological characterization of *Staphylococcus intermedius* implicated in a food-related outbreak. **Epidemiology & Infection**, v. 113, n. 1, p. 75–81, 1994.

KIBEBEW, K. 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, C. et al. Properties of a novel PBP2A protein homolog from *Staphylococcus aureus* strain LGA251 and its contribution to the β -lactam-resistant phenotype. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 44, p. 36854–36863, 2012.

KREWER, C. da C. et al. Resistance to antimicrobials and biofilm formation in *Staphylococcus* spp. isolated from bovine mastitis in the Northeast of Brazil. **Tropical animal health production**, v. 47, p. 511–518, 2015.

KUANG, Y. et al. Characterization of bacterial population of raw milk from bovine mastitis by culture-independent PCR-DGGE method. **Biochemical Engineering Journal**, v. 45, p. 76–81, 2009.

KUMAR, S.; MUKHERJEE, M. M.; VARELA, M. F. Modulation of bacterial multidrug resistance efflux pumps of the major facilitator superfamily. **International Journal of Bacteriology**, v. 2013, p. 1–15, 2013.

LAMERS, R. P. et al. Phylogenetic relationships among *Staphylococcus* species and refinement of cluster groups based on multilocus data. **BMC Evolutionary Biology**, v. 12, n. 1, 2012.

LANGONI, H.; DOMINGUES, P. F.; BALDINI, S. Mastite caprina : seus agentes e sensibilidade frente a antimicrobianos Goat mastitis : theirs agents and susceptibility face to the antimicrobial. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 13, n. 1, p. 51–54, 2006.

LEE, A. S. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Nature Reviews**

Disease Primers, v. 4, n. 1, p. 18033, jun. 2018.

LEE, J. Occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from cattle and chicken, and analyses of their *mecA*, *mecR1* and *mecI* genes. **Veterinary Microbiology**, v. 114, n. 1–2, p. 155–159, 16 abr. 2006.

LEE, J. H. Methicillin (Oxacillin)-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Major Food Animals and Their Potential Transmission to Humans. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 11, p. 6489–6494, 2003.

LEE, S. H. I. et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates in milk and the milking environment from small-scale dairy farms of São Paulo, Brazil, using pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 12, p. 7377–7383, 2012.

LEITE, J. A. et al. Lytic bacteriophages as a potential alternative to control *Staphylococcus aureus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 54, p. 9, 2019.

LIM, S.-K. et al. Transmission and persistence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in milk, environment, and workers in dairy cattle farms. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 10, n. 8, p. 731–736, 2013.

LIN, J. et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Frontiers in microbiology**, v. 6, n. 1, p. 1–3, 2015.

LIU, P. et al. Effect of *bla* regulators on the susceptible phenotype and phenotypic conversion for oxacillin-susceptible *mecA*-positive staphylococcal isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 8, p. 2105–2112, ago. 2016.

LIVERMORE, D. M. Antibiotic resistance in staphylococci. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 16, p. 3–10, nov. 2000.

LOUREIRO, R. J. et al. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**, v. 34, n. 1, p. 77–84, 2016.

MAGNA CORÔA LIMA. **Caprinos leiteiros da zona da mata de minas gerais: propriedades, levantamento e caracterização das bactérias nos diferentes tipos de mastite e fatores de risco**. 2018. (tese) Universidade Federal de Viçosa, 2018.

MANNU, L.; PABA, A. Genetic diversity of lactococci and enterococci isolated from home-made Pecorino Sardo ewes' milk cheese. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, n. 1, p. 55–62, 2002.

MARTINEAU, F. et al. Correlation between the resistance genotype determined by multiplex pcr assays and the antibiotic susceptibility patterns. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 44, n. 2, p. 231–238, 2000.

MATOS, R. A. T. **Resistência à meticilina em estafilococos coagulase positivos e negativos causadores de infecções em animais de companhia e animais de produção**. 2014. (dissertação) Universidade Federal de Campina Grande, 2014.

- MCDUGAL, L. K. et al. Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the united states: establishing a national database. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 11, p. 5113–5120, 2003.
- MCDUGAL, L. K.; THORNSBERRY, C. The role of β -lactamase in staphylococcal resistance to penicillinase-resistant penicillins and cephalosporins. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 23, n. 5, p. 832–839, 1986.
- MCKINNEY, T. K. et al. Transcription of the gene mediating methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* (*mecA*) is corepressed but not coinduced by cognate *mecA* and beta-lactamase regulators. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 23, p. 6862–6868, 1 dez. 2001.
- MEDEIROS, E. S. et al. Bubaline mastitis etiology in Northeast of Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 6, p. 1891–1894, 2013.
- MEDVEĐOVÁ, A.; VALÍK, L.; STUDENIČOVÁ, A. The effect of temperature and water activity on the growth of *Staphylococcus aureus*. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 27, n. 2, 2009.
- MELO, D. 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, n. 2, p. 368–374, mar. 2018.
- MESQUITA, A. A. et al. Contagem bacteriana total e contagem de células somáticas como indicadores de perdas de produção de leite. **Pubvet**, v. 12, n. 6, p. 1–8, 2018.
- MICAS, A. F. D. **Avaliação da atividade bactericida e bacteriostática da violaceína**. 2008. Universidade Estadual de Campinas, 2008.
- MONECKE, S. et al. Microarray based study on virulence-associated genes and resistance determinants of *Staphylococcus aureus* isolates from cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 125, n. 1–2, p. 128–140, 2007.
- MOON, J.-S. et al. Phenotypic and genetic antibiogram of methicillin-resistant staphylococci isolated from bovine mastitis in korea. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 3, p. 1176–1185, mar. 2007.
- MOTA, R. A. et al. Participação dos *Staphylococcus* spp na etiologia das mastites em bovinos leiteiros no estado de Pernambuco (Brasil). **Ciencia Animal Brasileira**, v. 13, n. 1, p. 124–130, 2012.
- MÜLLER, R. et al. Identification of anti-PBP2a antibodies in patients colonized and infected by methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **UNOPAR Cient., Ciência biol. saude**, v. 17, n. 4, p. 227–232, 2015.
- MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of antibiotic resistance. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 2, p. 1–37, 1 abr. 2016.
- MURICY, R. F. **Ocorrência de mastite subclínica em caprinos e qualidade higiênico-sanitária do leite produzido em propriedades associadas à**

cooperativa languiru, Teutônia -RS. 2003. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003.

NAKAGAWA, S. et al. Gene sequences and specific detection for Panton-Valentine leukocidin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 328, n. 4, p. 995–1002, mar. 2005.

NEMOTO, Y. et al. Pancreatic Abscess in a cat due to *Staphylococcus aureus* infection. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 79, n. 7, p. 1146–1150, 2017.

NEVES, M. C. et al. Detecção de genes de resistência antimicrobiana em cromossomos e plasmídeos de *Staphylococcus* spp. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 74, n. 3, p. 207–213, 2007.

OLIVEIRA, D. C.; DE LENCASTRE, H. Methicillin-resistance in *Staphylococcus aureus* is not affected by the overexpression in trans of the *mecA* gene repressor: a surprising observation. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, p. 232-287, 2011.

OLIVER, J. A. C. et al. Central nervous system infection with *Staphylococcus intermedius* secondary to retrobulbar abscessation in a dog. **Veterinary Ophthalmology**, v. 12, n. 5, p. 333–337, 2009.

OSTOJIĆ, M. Epidemiologic genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). **Bosnian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 8, n. 3, p. 260–265, 2008.

PALES, A. P. et al. A importância da contagem de células somáticas e contagem bacteriana total para a melhoria da qualidade do leite no Brasil. **Revista Eletrônica Faculdade Montes Belos**, v. 1, n. 2, p. 162–173, 2005.

PATERSON, G. K. et al. The newly described *mecA* homologue, *mecALGA251*, is present in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from a diverse range of host species. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 12, p. 2809–2813, 2012a.

PATERSON, G. K. et al. First detection of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 in bulk tank milk in the United Kingdom, January to July 2012. **Eurosurveillance**, v. 17, n. 50, p. 1–3, 2012b.

PATERSON, G. K. et al. Prevalence and properties of *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in bovine bulk tank milk in great britain. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 3, p. 598–602, 2014.

PATERSON, G. K.; HARRISON, E. M.; HOLMES, M. A. The emergence of *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Trends in Microbiology**, v. 22, n. 1, p. 42–47, 2014.

PEACOCK, S. J.; PATERSON, G. K. Mechanisms of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Annual Review of Biochemistry**, v. 84, n. 1, p. 577–601, 2015.

PEIXOTO, R. D. M. et al. Antibacterial potential of native plants from the caatinga

biome against *Staphylococcus* spp. isolates from small ruminants with mastitis. **Revista Caatinga**, v. 29, n. 3, p. 758–763, set. 2016.

PEIXOTO, R. D. M.; MOTA, R. A.; COSTA, M. M. da. Mastite em pequenos ruminantes no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 9, p. 754–762, set. 2010.

PENN, C. et al. Wound infections caused by inducible methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 1, n. 2, p. 79–83, jun. 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jgar.2013.03.009>>.

PIESSENS, V. et al. Intra-species diversity and epidemiology varies among coagulase-negative *Staphylococcus* species causing bovine intramammary infections. **Veterinary Microbiology**, v. 155, n. 1, p. 62–71, 2012.

PIRES, F. V. et al. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in Botucatu, Brazil: A population-based survey. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. 1–8, 2014.

PLETINCKX, L. J. et al. Evidence of possible methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 spread between pigs and other animals and people residing on the same farm. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 109, n. 3–4, p. 293–303, 2013.

POOLE, K. Bacterial Multidrug Efflux Pumps Serve Other Functions. **Microbe**, v. 3, n. 4, p. 179–185, 2008.

PORRERO, M. C. et al. Detection of *mecC*-Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in river water: A potential role for water in the environmental dissemination. **Environmental Microbiology Reports**, v. 6, n. 6, p. 705–708, 2014.

PROJAN, S. J. et al. *MgrA* Is a Multiple Regulator of Two New Efflux Pumps in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 7, p. 2395–2405, 2005.

PU, W. et al. High incidence of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA) associated with bovine mastitis in China. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. e88134, 11 fev. 2014a.

PU, W. X. et al. High incidence of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA) associated with bovine mastitis in China. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, 2014b.

RABELO, M. A. et al. The occurrence and dissemination of methicillin and vancomycin-resistant *Staphylococcus* in samples from patients and health professionals of a university hospital in Recife, state of Pernambuco, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 4, p. 437–446, 2014.

RAIA JUNIOR, R. B. **Influência Da Mastite Na Ocorrência De Resíduos De Antimicrobianos No Leite**. 2001. Universidade de São Paulo, 2001.

RAYMUNDO, N. K. L.; BERSOT, L. dos S.; OSAKI, S. C. Consumer profile and problems associated with uninspected raw milk consumption in western Paraná. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 84, n. 0, p. 1–8, 1 fev. 2018.

- RIBOT, E. M. et al. Standardization of Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocols for the Subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 3, n. 1, p. 59–67, mar. 2006.
- ROLLIN, B. Ethics, science, and antimicrobial resistance. **Journal of Agricultural and Environmental Ethics**, v. 14, p. 29–37, 2001.
- RUBIN, J. E.; GAUNT, M. C. Urinary tract infection caused by methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in a dog. **Canadian Veterinary Journal**, v. 52, n. 2, p. 169–172, 2011.
- SAINI, V. et al. Antimicrobial resistance profiles of common mastitis pathogens on Canadian dairy farms. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 8, p. 4319–4332, ago. 2012.
- SANCHEZ RAMIREZ, D. O. et al. Antibacterial properties of polypyrrole-treated fabrics by ultrasound deposition. **Materials Science and Engineering**, v. 102, n. April, p. 164–170, set. 2019.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 12, p. 5463–5467, 1977.
- SANTOS, A. S. et al. High Frequency of beta-lactam resistance among *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Northeast of Brazil. **International Journal of Bacteriology & Parasitology**, v. 2018, n. 02, p. 6–11, 2018.
- SANTOS, F. F. dos et al. Presence of *mecA*-positive multidrug-resistant *Staphylococcus epidermidis* in bovine milk samples in Brazil. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 2, p. 1374–1382, 2016.
- SCHMIDLIN, M. et al. Contaminations of laboratory surfaces with *Staphylococcus aureus* are affected by the carrier status of laboratory staff. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 4, p. 1284–1293, 2010.
- SCHMIDT, T.; KOCK, M. M.; EHLERS, M. M. Molecular Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Mastitis and Close Human Contacts in South African Dairy Herds: Genetic Diversity and Inter-Species Host Transmission. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 511, 6 abr. 2017.
- SCHNITT, A.; TENHAGEN, B.-A. Risk Factors for the Occurrence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Dairy Herds: An Update. **Foodborne Pathogens and Disease**, 2019.
- SCHUSTER, S. C. Next-generation sequencing transforms today's biology. **Nature Methods**, v. 5, n. 1, p. 16–18, 19 jan. 2008.
- SHEKHAR PAREEK, C.; SMOCZYNSKI, R.; TRETYN, A. Sequencing technologies and genome sequencing. **Journal of Applied Genetics**, v. 52, p. 413–435, 2011.
- SHENDURE, J.; JI, H. Next-generation DNA sequencing. **Nature biotechnology**, v.

26, n. 10, p. 1135–1145, 2008.

SILVA, I. F. da et al. Antimicrobial activity of ethanolic extracts from *Commiphora leptophloeos* (MART.) against *Staphylococcus* spp. isolated from cases of mastitis in ruminants. **Ciência Animal Brasileira**, v. 20, p. 1–14, 2019.

SILVA, N. C. C. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of lineage ST398 as cause of mastitis in cows. **Letters in Applied Microbiology**, v. 59, n. 6, p. 665–669, 2014a.

SILVA, N. C. C. et al. Characterization of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci in milk from cows with mastitis in Brazil. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 106, n. 2, p. 227–233, 10 ago. 2014b.

SOARES, L. 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, n. 8, p. 692–696, 2012.

SOUZA, F. N. et al. Patógenos envolvidos na etiologia da mastite: o que há de novo e o que precisamos fazer? **Anais VIII Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite**, p. 31-40, 2019.

SPERANDIO, J. et al. Atividade antimicrobiana e citotoxicidade *in vitro* do óleo essencial de *Tagetes minuta* L. visando à aplicação no controle da mastite bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 71, n. 4, p. 1251–1259, ago. 2019.

SREDNIK, M. E. et al. First isolation of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis in Argentina. **Veterinary and Animal Science**, v. 7, 1 jun. 2019.

TENOVER, F. C. et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 9, p. 2233–9, set. 1995. D

TORIMIRO, N.; MOSHOOD, A. A.; EYIOLAW, S. A. Analysis of Beta-lactamase production and antibiotics resistance in *Staphylococcus aureus* strains. **Journal of Infectious Diseases and Immunity**, v. 5, n. 3, p. 24–28, 2014.

TRUONG-BOLDUC, Q. C. et al. *MgrA* is a multiple regulator of two new efflux pumps in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 7, p. 2395–2405, 1 abr. 2005.

TRUONG-BOLDUC, Q. C.; STRAHILEVITZ, J.; HOOPER, D. C. *NorC*, a new efflux pump regulated by *MgrA* of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 3, p. 1104–1107, 2006.

TRUONG-BOLDUC, Q. C.; ZHANG, X.; HOOPER, D. C. Characterization of *NorR* protein, a multifunctional regulator of *norA* expression in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 10, p. 3127–3138, 2003.

TURUTOGLU, H.; ERCELİK, S.; OZTURK, D. Antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci isolated from bovine

mastitis. **Bull Vet Inst Pulawy**, v. 50, p. 41–45, 2006.

VALENCIA QUINTERO, L.; SERNA COCK, L.; CAMPOS, R. Lactic acid bacteria with antimicrobial activity against pathogenic agent causing of bovine mastitis. **Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial: BSAA**, v. 9, n. 1, p. 97–104, 2011.

VAN LOO, I. et al. Emergence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* of Animal Origin in Humans. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 12, p. 1834–1839, dez. 2007.

VANDERHAEGHEN, W. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 associated with clinical and subclinical mastitis in Belgian cows. **Veterinary Microbiology**, v. 144, n. 1–2, p. 166–171, jul. 2010.

VERNILE, A. et al. Genotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from traditional Pecorino Siciliano cheese. **Dairy Science and Technology**, v. 88, n. 6, p. 619–629, 2008.

VISCIANO, P. et al. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dairy cow farms. **Food Control**, v. 46, p. 532–538, dez. 2014.

VISHNUPRIYA, S. et al. Methicillin resistant staphylococci associated with bovine mastitis and their zoonotic importance. **Veterinary World**, v. 7, n. 6, p. 422–427, 2014.

WHO Policy Perspectives on Medicines Containing antimicrobial resistance, 2005.

WILLE, H. et al. Communications orales libres COL 08-Infections ostéo-articulaires Infection post-arthrodèse rachidienne: étude descriptive d'une cohorte de 129 patients. **Médecine et maladies infectieuses**, v. 44, p. 15–16, 2014.

WONG, K. S. Clinical and radiographic spectrum of septic pulmonary embolism. **Archives of Disease in Childhood**, v. 87, n. 4, p. 312–315, 2002.

WU, Z. et al. Novel type XII Staphylococcal cassette chromosome mec harboring a new cassette chromosome recombinase, CcrC2. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 12, p. 7597–7601, dez. 2015.

WULF, M. W. H. et al. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among veterinarians: An international study. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, n. 1, p. 29–34, 2008.

5. ARTIGO 1

Mastite bovina causada por *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina: revisão de literatura

(Artigo publicado no periódico Pesquisa Veterinária Brasileira)



Artigo de Revisão

Mastite bovina causada por *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina: revisão de literatura¹

José Givanildo Silva^{2*}, Adrienne M. Alcântara² e Rinaldo A. Mota²

ABSTRACT.- Silva J.G., Alcantara A.M. & Mota R.A. 2018. [**Bovine mastitis caused by *Staphylococcus* spp. Methicillin-resistant: literature review.**] Mastite bovina causada por *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina: revisão de literatura. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 38(2):223-228. Laboratório de Doenças Infectocontagiosas dos Animais Domésticos, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, Recife, PE 52171-900, Brazil. E-mail: givanildojgs@gmail.com

The most related microorganism in cases of bovine mastitis are *Staphylococcus* spp. Some strains of these microorganisms have shown virulence factors like antibiotic resistance genes, such as the resistance to methicillin, which represents a public health problem. This literature review aims to compile data related to bovine mastitis caused by *Staphylococcus* spp. Methicillin-resistant (MRS). Despite this antimicrobial not be commonly used in the treatment of mastitis, the frequency of cases of infection of the mammary gland caused by MRS has ranged from 1.34 to 47.6%. It is believed that the contact of humans with animals positive for MRS and vice versa favors the transmission of this pathogen among species, contributing to the variation in infection rates. MRS detection can be performed by phenotypic tests, molecular tests or serological tests and control measures must be taken such as the identification of cases, animal segregation, epidemiological study of the infection source of herd and the constant cleanliness and hygiene of the confined environment, equipment and milking utensils. Mastitis cases caused by this pathogen are of great relevance to public health because the ingestion of contaminated and/or derived from milk may trigger the transfer of MRS for human. Thus, a constant warning is required on the epidemiological surveillance in dairy farms.

INDEX TERMS: Mastitis, cattle, *Staphylococcus* spp., methicillin, pathogenic microorganism, antimicrobial resistance, epidemiology, bacterioses.

RESUMO.- *Staphylococcus* spp. são os micro-organismos mais relacionados a casos de mastite bovina. Algumas cepas destes micro-organismos têm apresentado fatores de virulência como genes de resistência a antimicrobianos com destaque para a resistência à meticilina que é um problema de saúde pública. Esta revisão de literatura tem o objetivo de compilar dados sobre a mastite bovina causada por *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina (MRS). Apesar desse antimicrobiano não ser comumente utilizado no tratamento das mastites,

a frequência de casos de infecção da glândula mamária causada por MRS tem variado entre 1,34 a 47,6%. Acredita-se que o contato dos humanos com animais positivos para MRS e vice-versa favoreça a transmissão deste patógeno entre as espécies, contribuindo para a variação nas taxas de infecção. A detecção de MRS pode ser realizada por meio de provas fenotípicas, moleculares ou sorológicas e as medidas de controle devem contemplar a identificação dos casos, segregação dos animais, estudo epidemiológico da fonte de infecção do rebanho, além da constante limpeza e higienização do ambiente de confinamento, equipamentos e utensílios de ordenha. Casos de mastite ocasionados por esse patógeno assumem relevância para a saúde pública, pois a ingestão de leite e/ou derivados contaminados podem desencadear a transferência de MRS para seres humanos. Com isso, é necessário um alerta constante quanto à vigilância epidemiológica em fazendas leiteiras

¹ Recebido em 4 de setembro de 2016.

Aceito para publicação em 31 de janeiro de 2017.

² Laboratório de Doenças Infectocontagiosas dos Animais Domésticos, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, Recife, PE 52171-900, Brasil. *Autor para correspondência: givanildojgs@gmail.com

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Mastite bovina, *Staphylococcus* spp., meticilina, Micro-organismo patogênico, resistência a antimicrobianos, epidemiologia, bacterioses.

INTRODUÇÃO

Bactérias do gênero *Staphylococcus* são encontradas naturalmente nas mucosas do trato respiratório, urogenital e digestivo de seres humanos e animais. Já foram descritas mais de 30 espécies de *Staphylococcus* spp., sendo que algumas são frequentemente associadas a uma ampla variedade de infecções de caráter oportunista (Quinn et al. 1999).

Dentre as espécies de estafilococos, *Staphylococcus aureus* é considerado um importante patógeno transmitido por alimentos e causador de doenças transmitidas entre seres humanos e animais, incluindo infecções da glândula mamária, também conhecidas como mastites (Lee et al. 2012). Segundo Omoe et al. (2005), *S. aureus* é a espécie mais frequentemente associada a casos e surtos de intoxicação alimentar, devido à capacidade de algumas cepas produzirem vários tipos de enterotoxinas (EE).

Além da intoxicação estafilocócica, outra grande questão que preocupa os profissionais de saúde é a resistência aos antimicrobianos apresentada por algumas cepas de *Staphylococcus* spp. No caso específico das mastites bacterianas, o principal tratamento de eleição é a antibioticoterapia. Porém, o uso elevado de antimicrobianos ou a sua utilização de forma indiscriminada aumenta o risco de seus resíduos no leite. Isso contribui para a contaminação do ambiente, da cadeia alimentar e com o surgimento de cepas resistentes a drogas de importância para a saúde humana, a exemplo de *Staphylococcus* spp., resistente à meticilina (MRS) (Raia Junior 2001, Rollin 2001, Tetzner 2005). Uma vez que pode ocorrer a transmissão cruzada interespecífica de linhagens resistentes pelo consumo de alimentos de origem animal, evidencia-se um risco para a saúde dos consumidores (Stöhr & Wegener 2001, Guimarães 2011).

Dentre as resistências a antimicrobianos observadas em estafilococos, à meticilina é uma das mais preocupantes em termos de saúde pública, pois cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) são comumente identificadas como causadoras de infecções hospitalares, até mesmo nas unidades de terapia intensiva (UTI). Além disso, algumas delas também podem produzir enterotoxinas, comprometendo ainda mais a saúde dos pacientes (Intrakamha et al. 2012, Rabelo et al. 2014).

Perante o exposto, objetivou-se compilar dados a respeito da mastite bovina causada por *Staphylococcus* spp. resistente à meticilina (MRS).

REVISÃO DE LITERATURA

Staphylococcus spp.

O gênero *Staphylococcus* é caracterizado em testes morfológicos como cocos que se coram como positivo no teste de Gram, com diâmetro de 0,5 a 1,5µm, sem motilidade, oxidase negativo e não formadores de esporos. Além disso, várias espécies são anaeróbias facultativas e produtores de catalase. Existem mais de 30 espécies de *Staphylococcus* spp. e, grande parte é comensal da pele e mucosas de seres

humanos e animais, sendo encontrada nas mucosas do trato respiratório, urogenital e digestivo (Quinn et al. 1999).

Staphylococcus spp., são típicos micro-organismos mesófilos, apresentando crescimento na faixa de 7°C a 48°C, sendo a temperatura de 37°C considerada ideal para seu desenvolvimento. Além disso, são tolerantes à concentração de 5-7% de NaCl e à redução da atividade de água (A_w) (Adams & Moss 2008).

Tradicionalmente os estafilococos são divididos em duas categorias: *Staphylococcus* coagulase negativo, que geralmente compõem a microbiota natural dos seres humanos e animais, e positivo que apresentam maior potencial patogênico, tendo como principal representante *Staphylococcus aureus* (Hirsh & Zee 1999, Neves et al. 2007). Essa classificação baseia-se na capacidade do micro-organismo coagular o plasma, sendo considerado um importante fator de patogenicidade dos estafilococos.

Contudo, tem crescido o interesse no estudo de *Staphylococcus* coagulase negativo (SCN) visto que, tais micro-organismos têm sido relacionados como agentes causadores de infecções, a exemplo das mastites, em seres humanos e animais (Cunha et al. 2004, Santos 2008, Medeiros et al., 2013). Além disso, já foram detectadas cepas produtoras de EE e portadoras de genes de resistência a antimicrobianos em isolados de SCN aumentando, dessa forma, sua importância clínica (Oliveira 1999, Borges et al. 2008).

Espécies de estafilococos são comumente relacionados como causadoras de mastite em animais de produção, a exemplo dos bovinos (Langoni et al. 2006). Esses micro-organismos, geralmente, são causadores de mastite contagiosa caracterizada por uma alta ocorrência de casos subclínicos, onde não são observadas alterações macroscópicas no leite, glândula mamária e sistêmica no animal (Bergonier et al. 2003, Muricy 2003, Mota et al. 2012). Com isso, há o risco de contaminação de equipamentos e utensílios, além da possibilidade de veiculação desse patógeno através de leite e derivados para seres humanos, podendo desencadear casos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) (Adams & Moss 2008).

Outra implicação na saúde pública de *Staphylococcus* spp. causadores de mastites, diz respeito à presença de cepas resistentes a antimicrobianos e a capacidade da transferência dos genes de resistência a seres humanos, a exemplo da meticilina.

Apesar da meticilina não ser geralmente utilizada no tratamento de mastites, cepas de MRS têm sido identificadas em fazendas leiteiras (Moon et al. 2007, Feßler et al. 2010; Lim et al. 2013, Paterson et al. 2014a). A transmissão horizontal de MRS entre bovinos leiteiros e trabalhadores das fazendas já foi relatada (Juhász-Kaszanyitzky et al. 2007), sugerindo que o contato entre seres humanos e animais e vice-versa pode favorecer a transmissão de tais cepas (Lim et al. 2013). Além disso, a resistência a meticilina confere uma resistência virtual a praticamente todos os β-lactâmicos, exceto às cefalosporinas de última geração, fato que dificulta o tratamento em casos de infecções (Peacock & Paterson 2015).

***Staphylococcus* spp. resistentes à metilina (MRS)**

A metilina é um antimicrobiano da classe dos betalactâmicos, lançada comercialmente no início da década de 60. Cerca de um ano após o início de sua comercialização foi identificado o primeiro isolado clínico de MRSA (Jevons 1961). A partir de então, relatos da identificação de amostras de MRS tornaram-se frequentes.

A resistência de *Staphylococcus* spp. à betalactâmicos, a exemplo da metilina, ocorre pela produção de betalactamase ou pela modificação no sítio de ação dos betalactâmicos.

A betalactamase é uma enzima extracelular que age sobre o anel betalactâmico, provocando sua hidrólise e, conseqüente, inativação (Garino Junior et al. 2011). Essa enzima é codificada pelo gene *blaZ*, por meio de plasmídeo ou cromossomo, que produz uma penicilinase após exposição de *Staphylococcus* spp. a antimicrobianos betalactâmicos. Após sua expressão, a betalactamase inativa o medicamento através da clivagem do anel betalactâmico. A capacidade hidrolítica da betalactamase depende de alguns fatores como sua localização, cinética, quantidade e condições físico-químicas (Livermore 2000). Além disso, o uso indiscriminado de antimicrobianos gera uma pressão seletiva para o aparecimento dessa resistência (McDougal & Thornsberry 1986, Livermore 2000, Torimiro et al. 2013, Dias et al. 2015).

A modificação no sítio de ação dos betalactâmicos é um mecanismo de resistência mediado pelos *Staphylococcus* Cassete Cromossomo (SCCmec), que são elementos genéticos móveis. Esse é o mecanismo de resistência observado nas amostras de MRS. Os betalactâmicos agem através de ligação com as proteínas de ligação à penicilina (PBP), resultando na lise das células bacterianas. O SCCmec possui o gene *mecA* que codifica uma PBP semelhante a PBP2a/PBP2' que possui reduzida afinidade aos betalactâmicos, permitindo que os *Staphylococcus* spp. mantenham sua biossíntese até em concentração consideradas inibitórias desses antimicrobianos (Livermore 2000, Paterson et al. 2014a).

Em 2009 um estudo realizado por Garcia-Alvarez (2009) sobre a epidemiologia da mastite bovina na Inglaterra identificou, em amostras de leite de tanques, uma cepa de *S. aureus* que apresentava características fenotípicas de MRSA (resistência a oxacilina e ceftioxina). Essa cepa foi identificada como *S. aureus* LGA251 e apesar de apresentar perfil fenotípico, foi negativa para o gene *mecA* pela técnica de PCR. Posteriormente, essa cepa foi sequenciada e os resultados do genoma demonstraram que ela possuía um gene homólogo (aproximadamente 69% de identidade) ao *mecA*, com isso recebeu a denominação de *mecA*_{LGA251} (Garcia-Alvarez et al. 2011). Porém, em 2012 o *mecA*_{LGA251} foi renomeado para *mecC*, pois apresenta menos de 90% de homologia com o *mecA* (Ito et al. 2012). Desde a sua primeira descrição, têm aumentado a identificação de MRS portadores do gene *mecC*, principalmente na Europa, entretanto, até o presente momento não há relatos de MRS portador de *mecC* no continente americano (Paterson et al. 2014a, Concepción Porrero et al. 2014).

Cepas de MRS já foram identificadas em casos de mastite bovina em diversas partes do mundo como Grã-Bretanha, Coréia e Alemanha (Feßler et al. 2010, Lim et al. 2013, Paterson et al. 2014a). No Brasil, existem poucos estudos que identificaram casos de mastite causados por MRS, demonstrando a necessidade da realização de estudos que venham a contribuir para a epidemiologia da infecção por esse patógeno no país (Guimarães 2011, Silva et al. 2014).

***Staphylococcus* spp., resistente à metilina em casos de mastite bovina**

Aspectos epidemiológicos e clínicos. O primeiro relato da infecção de MRS em animais domésticos ocorreu em 1972, na Bélgica, e tratava-se de casos de mastite em vacas leiteiras (Devriese et al. 1972). Desde então, esporadicamente, são relatados casos de mastite ocasionados por esse agente etiológico (Feßler et al. 2010, Lim et al. 2013, Paterson et al. 2014a). A disseminação de MRS no ambiente pecuário, principalmente da espécie *S. aureus* levou a criação do termo LA-MRSA, do inglês *MRSA associated with livestock* que em português poderia ser traduzido como MRSA ligado ao ambiente pecuário (Huber et al. 2010).

A metilina não é um antimicrobiano comumente utilizado no tratamento de mastites, porém já foi reportado que o contato entre seres humanos com animais positivos para MRS e vice-versa pode favorecer a transmissão do patógeno entre as espécies. No estudo realizado por Juhász-Kaszanyitzky et al. (2007) com vacas acometidas por mastite subclínica e trabalhadores (veterinários, ordenhadores e assistentes) de fazendas leiteiras na Hungria foi sugerida a transmissão horizontal de isolados de MRSA entre seres humanos e vacas. A possibilidade dessa forma de transmissão do patógeno surge como um fator a ser considerado na epidemiologia das mastites causadas por MRS que é o caráter ocupacional da infecção. Fato corroborado pelos resultados obtidos no estudo realizado por Wulf et al. (2008) com 272 veterinários de todo o mundo em que foi identificado MRSA em 34 (12,5%) profissionais, segundo os autores profissionais que têm contato direto com animais apresentam um risco potencial de tornarem-se portadores do patógeno.

Além da possibilidade de transmissão entre seres humanos e animais, o ambiente também pode ser uma das fontes de infecção de MRS para os animais. Sabe-se que o MRS pode sobreviver durante meses no ambiente, desde que existam condições favoráveis a sua manutenção, como umidade e temperatura. Em estudo realizado por Lim et al. (2013), foram isoladas cepas de MRS de tetras, piso, cercas de proteção e do sistema de ventilação de fazendas leiteiras na Coréia. Segundo os autores, os resultados do estudo demonstram a necessidade da adoção de medidas preventivas quanto à transmissão de MRS entre humanos, animais e ambiente das fazendas.

Nos rebanhos leiteiros as taxas de infecção podem variar de 1,34 a 47,6% (Quadro 1). A mastite ocasionada por MRS apresenta curso clínico homólogo à desencadeada por outros *Staphylococcus* spp. que se caracteriza pela forma subclínica da infecção, com elevação na quantidade de células somáticas (>200.000 céls/mL). Entretanto há relatos da manifestação clínica da doença, ocasionada por MRS, nesses casos os animais apresentam um quadro agudo da infecção, onde são observadas alterações macroscópicas no leite, no tecido mamário e sistêmicas no animal (Chandrasekaran et al. 2014a, 2014b, Pu et al. 2014, Lim et al. 2013, Vanderhaeghen et al. 2010).

Técnicas de diagnóstico da mastite causada por MRS.

Como mencionado anteriormente, na mastite desencadeada pelo MRS há predominância de casos subclínicos. Com isso, a contagem eletrônica de células somáticas (CCS) no leite pode ser utilizada como técnica de triagem com posterior isolamento e/ou identificação do micro-organismo. Amostras

Quadro 1. Frequência de *Staphylococcus* Meticilina-resistente (MRS) em casos de mastite bovina

Local	Micro-organismo	Frequência de MRS	Referência
Coreia do Sul	<i>S. aureus</i>	1,34% (12/894)	Lee (2003)
Alemanha e Suíça	<i>S. aureus</i>	1,56% (2/128)	Monecke et al. (2007)
Coreia do Sul	<i>S. aureus</i>	2,5% (21/840)	Moon et al. (2007)
	SCN*	2,4% (19/840)	
Egito	<i>S. aureus</i>	3,15% (3/95)	Kamal et al. (2013)
Índia	<i>S. aureus</i>	3,15% (3/95)	Chandrasekaran et al. (2014b)
Bélgica	<i>S. aureus</i>	9,3% (11/118)	Vanderhaeghen et al. (2010)
Paquistão	<i>S. aureus</i>	10,38% (8/77)	Farzana et al. (2004)
Turquia	<i>S. aureus</i>	17,5% (18/103)	Turutoglu et al. (2006)
Brasil – Distrito Federal	<i>S. aureus</i>	22,8% (17/75)	Andrade (2012)
Brasil – Paraíba	<i>Staphylococcus</i> spp.	30,43% (14/46)	Matos (2014)
China	<i>S. aureus</i>	47,6% (49/103)	Pu et al. (2014)

*SCN = *Staphylococcus* Coagulase Negativo.

de leite com CCS superior a 200.000 células/mL podem ser submetidas a pesquisa de MRS (Lim et al. 2013).

Para o isolamento de MRS as amostras de leite podem ser plaqueadas em vários meios de culturas como o ágar base acrescido de sangue ovino, o ágar MRSA (seletivo para *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina), ágar Muller Hinton e o ágar sal manitol. As condições de crescimento são praticamente as mesmas nesses meios de cultura, incubação na faixa de 35-37°C por 24/48 horas, sob aerobiose. Antes do plaqueamento pode ser realizado um pré-enriquecimento em meios líquidos como caldo Muller Hinton contendo 6,5% de NaCl e/ou caldo triptona de soja contendo cefoxitina (3,5mg/L) (Kamal et al. 2013, Lim et al. 2013, Chandrasekaran et al. 2014b, Vishnupriya et al. 2014). Após o crescimento das colônias podem ser realizadas provas bioquímicas como teste da catalase, coagulase e fermentação da glicose para diferenciação das espécies de estafilococos (Silva et al. 1997). Fenotipicamente a resistência a meticilina pode ser identificada por meio dos testes de suscetibilidade aos antimicrobianos e concentração inibitória mínima (CIM), em ambos as drogas de eleição são a cefoxitina e/ou oxacilina (CLSI 2008). De acordo com Muller (2009), pode-se tentar aumentar a expressão da resistência à meticilina submetendo o micro-organismo a uma temperatura de incubação entre 33-35°C por 24 horas e com a adição de cloreto de sódio ao meio de cultura onde será realizado o crescimento microbiano.

A nível molecular é possível identificar MRS utilizando a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) por meio da amplificação dos genes *mecA* e *mecC*. A PCR atualmente é a técnica de maior utilização para detecção de MRS, pois como baseia-se na amplificação de DNA gera resultados confiáveis, diminuindo o risco da identificação de falsos negativos (Muller 2009, Paterson et al. 2012a, Chandrasekaran et al. 2014a). Adicionalmente à PCR, existem técnicas como a *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE) e a *Multi-Locus Sequence typing* (MLST) que são importantes ferramentas em estudos de epidemiologia molecular. A partir do emprego dessas técnicas é possível realizar a tipagem das amostras de MRS, rastrear sua origem e analisar a correlação genética das amostras, tais informações podem ser consideradas para a instituição de medidas de controle do patógeno nos rebanhos (MCDougal et al. 2003, Juhász-Kaszanyitzky et al. 2007, Paterson et al. 2012b, Lim et al. 2013).

Outro método de detecção de MRSA é a identificação da proteína PBP2a, codificada pelos genes de resistência a meticilina. Para isso existem testes comerciais de aglutinação em látex e Elisa (Muller 2009, Paterson et al. 2014b).

Controle e prevenção. As medidas de controle da mastite causada pelo MRS contemplam identificação dos casos e do patógeno, segregação dos animais e estudo epidemiológico da fonte de infecção para o rebanho.

Inicialmente deve-se realizar a identificação dos animais portadores, para que os mesmos sejam separados do rebanho para tratamento. Por se tratar de uma mastite bacteriana, a antibioticoterapia é o tratamento de eleição, como o MRS confere uma resistência a praticamente todos os betalactâmicos, o teste de suscetibilidade aos antimicrobianos pode fornecer informações de quais drogas podem ou não ser utilizadas. No tratamento de infecções causadas por MRS em ambiente hospitalar utiliza-se a vancomicina, apesar de já terem sido identificadas cepas de *Staphylococcus* spp. resistentes a esse antimicrobiano. Animais cronicamente infectados e/ou que apresentem casos de mastite recorrentes devem ser descartados, por se tratar de uma importante fonte de infecção para o rebanho (Radostits et al. 2000, Rabelo et al. 2014, Peacock & Paterson 2015).

O caráter ocupacional da infecção por MRS deve ser levado em consideração nos inquéritos epidemiológicos de mastite bovina, pois a fonte de infecção para as vacas pode ser um trabalhador (veterinário, ordenhador, técnico agropecuário, entre outros) que tenha contato direto com os animais. Nesse sentido, é essencial a adoção de hábitos higiênicos, além da realização de exames no ato da admissão e periodicamente com esses profissionais (Juhász-Kaszanyitzky et al. 2007, Wulf et al. 2008, Lim et al. 2013).

Além disso, equipamentos e utensílios de ordenha, bem como o ambiente de confinamento dos animais devem permanecer limpos e higienizados, pois também podem ser fontes de infecção tanto para o rebanho quanto para os trabalhadores das fazendas (Lim et al. 2013).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A emergência de MRS em todo o mundo tem preocupado os profissionais de saúde humana e animal. Nesse contexto, casos de mastite ocasionados por esse patógeno assumem

relevância para a saúde pública, pois a ingestão de leite e/ou derivados contaminados podem desencadear a transferência de genes de resistência para seres humanos.

Em relação às fazendas, esse patógeno causa prejuízos de ordem econômica devido à queda na produção e qualidade do leite e descarte de animais bem como perdas de ordem sanitária, por se tratar de um patógeno contagioso.

Com isso, é necessário um alerta constante quanto à introdução de animais no rebanho, controle e tratamento dos casos de mastite, saúde dos funcionários e limpeza do ambiente das fazendas leiteiras.

REFERÊNCIAS

- Adams M.R. & Moss M.O. 2008. Food Microbiology. 3rd ed. Royal Society of Chemistry, UK.
- Andrade H.H. 2012. Genotipagem de cepas de *Staphylococcus aureus* isolados de mastites subclínicas bovina no Distrito Federal e Entorno. Dissertação de Mestrado em Saúde Animal, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília.
- Bergonier D., De Crémoux R., Rupp R., Lagriffoul G. & Berthelot X. 2003. Mastitis of dairy small ruminants. *Vet. Res.* 34(5):689-716. PMID:14556701. <http://dx.doi.org/10.1051/vetres:2003030>.
- Borges M.F., Nassu R.T., Pereira J.L., Andrade A.P.C. & Kuaye A.Y. 2008. Perfil de contaminação por *Staphylococcus* e suas enterotoxinas e monitorização das condições de higiene em uma linha de produção de queijo de coalho. *Ciência Rural.* 38(5):1431-1438. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782008000500037>.
- Chandrasekaran D., Venkatesan P., Tirumurugaan K.G., Nambi A.P., Thirunavukkarasu P.S., Kumanan K. & Vairamuthu S. 2014a. A study on methicillin resistant *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy cattle. *J. Appl. Nat. Sci.* 6(2):356-361.
- Chandrasekaran D., Venkatesan P., Tirumurugaan K.G., Nambi A.P., Thirunavukkarasu P.S., Kumanan K., Vairamuthu S. & Ramesh S. 2014b. Pattern of antibiotic resistant mastitis in dairy cows. *Vet. World* 7(6):389-394. <http://dx.doi.org/10.14202/vetworld.2014.389-394>.
- CLSI 2008. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 18th Supplement (M100-S18). Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Wayne, PA.
- Concepción Porrero M., Harrison E.M., Fernández-Garayzábal J.F., Paterson G.K., Díez-Guerrier A., Holmes M.A. & Domínguez L. 2014. Detection of *mecC*-Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in river water: a potential role for water in the environmental dissemination. *Environ. Microb. Rep.* 6(6):705-708. PMID:25756123. <http://dx.doi.org/10.1111/1758-2229.12191>.
- Cunha M.L., Sinzato Y.I. & Silveira L.V.A. 2004. Comparison of methods for the identification of coagulase negative *Staphylococci*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 99(8):855-860. PMID:15761602. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762004000800012>.
- Devriese L.A., Van Damme L.R. & Fameree L. 1972. Methicillin (cloxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis cases. *Zentralbl. Veterinärmed. B* 19(7):598-605. PMID:4486473. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0450.1972.tb00439.x>.
- Dias A.P.M., Pinheiro M.G. & Alves F.A. 2015. Características epidemiológicas e fatores de virulência em *Staphylococcus aureus*. *Revta Acta Sci. Tech.* 3(1):9-20.
- Farzana K., Shah S.N.H. & Jabeen F. 2004. Antibiotic resistance pattern against various isolates of *Staphylococcus aureus* from raw milk samples. *J. Res. Sci.* 15:145-152.
- Feßler A., Scott C., Kadlec K., Ehrlich R., Monecke S. & Schwarz S. 2010. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from cases of bovine mastitis. *J. Antimicrob. Chemother.* 65(4):619-625. PMID:20164198. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkq021>.
- García-Álvarez L. 2009. Assessment of the role of cattle movements and other risk contacts on the spread of *Staphylococcus aureus* strain types between UK dairy farms. PhD Thesis, University of Cambridge, UK.
- García-Álvarez L., Holden M.T., Lindsay H., Webb C.R., Brown D.F., Curran M.D., Walpole E., Brooks K., Pickard D.J., Teale C., Parkhill J., Bentley S.D., Edwards G.F., Girvan E.K., Kearns A.M., Pichon B., Hill R.L., Larsen A.R., Skov R.L., Peacock S.J., Maskell D.J. & Holmes M.A. 2011. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *Lancet. Infect. Dis.* 11(8):595-603. PMID:21641281. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(11\)70126-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70126-8).
- Garino Junior F., Camboim E.K.A., Neves P.B., Sá A.V.V. & Almeida A.P. 2011. Suscetibilidade a antimicrobianos e produção de betalactamase em amostras de *Staphylococcus* isolados de mastite caprina no semiárido paraibano. *Arqs Inst. Biológico, São Paulo* 78(1):103-107.
- Guimarães F.F. 2011. Perfil de sensibilidade microbiana, pesquisa de gene *mecA* de resistência à metilina e detecção molecular de genes codificadores de enterotoxinas, em espécies de estafilococos coagulase positiva e negativa, isolados de mastites bovinas. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho".
- Hirsh D.C. & Zee Y.C. 1999. *Veterinary Microbiology*. Blackwell Science, p.115-117.
- Huber H., Koller S., Giezendanner N., Stephan R. & Zweifel C. 2010. Prevalence and characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in humans in contact with farm animals, livestock, and in food animal origin, Switzerland, 2009. *Euro Surveill.* 15(16):19542. PMID:20430001.
- Intrakamha M., Komutarin T., Pimpukdee K. & Aengwanich W. 2012. Incidence of enterotoxin-producing MRSA in bovine mastitis cases, bulk milk tanks and processing plants in Thailand. *J. Anim. Vet. Adv.* 11(5):655-661. <http://dx.doi.org/10.3923/javaa.2012.655.661>.
- Ito T., Hiramatsu K., Tomasz A., de Lencastre H., Perreten V., Holden M.T., Coleman D.C., Goering R., Giffard P.M., Skov R.L., Zhang K., Westh H., O'Brien F., Tenover F.C., Oliveira D.C., Boyle-Vavra S., Laurent F., Kearns A.M., Kreiswirth B., Ko K.S., Grundmann H., Sollid J.E., John Junior J.F., Daum R., Soderquist B. & Buist G., and the International Working Group on the Classification of *Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC)* 2012. Guidelines for Reporting Novel *mecA* Gene Homologues. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56(10):4997-4999. PMID:22869575. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01199-12>.
- Jevons M.P. 1961. "Celbenin"-resistant *Staphylococci*. *Brit. Med. J.* 1(5219):124-125. <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.1.5219.124-a>.
- Juhász-Kaszanyitzky É., Jánosi S., Somogyi P., Dán Á., Van Bloois L.G., Van Duijkeren E. & Wagenaar J.A. 2007. MRSA transmission between cows and humans. *Emerg. Infect. Dis.* 13(4):630-632. PMID:17553285. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1304.060833>.
- Kamal R.M., Bayoumi M.A. & Abd el Aal S. 2013. MRSA detection in raw milk, some dairy products and hands of dairy workers in Egypt, a mini-survey. *Food Control* 33(1):49-53. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.02.017>.
- Langoni H., Domingues P.F. & Baldini S. 2006. Mastite caprina: seus agentes e sensibilidade frente a antimicrobianos. *Revta Bras. Ciênc. Vet.* 13(1):51-54.
- Lee J.H. 2003. Methicillin (oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(11):6489-6494. PMID:14602604. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.69.11.6489-6494.2003>.

- Lee S.H.I., Camargo C.H., Gonçalves J.L., Cruz A.G., Sartori B.T., Machado M.B. & Oliveira C.F.A. 2012. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates in milk and the milking environment from small-scale dairy farms of São Paulo, Brazil, using pulsed-field gel electrophoresis. *J. Dairy Sci.* 95(12):7377-7383. PMID:23040016. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2012-5733>.
- Lim S.K., Nam H., Jang G., Lee H., Jung S. & Kim T. 2013. Transmission and persistence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in milk, environment and workers in dairy cattle farms. *Foodborne Pathog. Dis.* 10(8):731-736. PMID:23746358. <http://dx.doi.org/10.1089/fpd.2012.1436>.
- Livermore D.M. 2000. Antibiotic resistance in *staphylococci*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 16(supl. 1):3-10. PMID:11137402. [http://dx.doi.org/10.1016/S0924-8579\(00\)00299-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0924-8579(00)00299-5).
- Matos R.A.T. 2014. Resistência à metilina em estafilococos coagulase positivos e negativos causadores de infecções em animais de companhia e animais de produção. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande, PB.
- McDougal L.K. & Thornsberry C. 1986. The role of beta-lactamase in staphylococcal resistance to penicillinase-resistant penicillins and cephalosporins. *J. Clin. Microbiol.* 23(5):832-839. PMID:3011847.
- McDougal L.K., Steward C.D., Killgore G.E., Chaitram J.M., McAllister S.K. & Tenover F.C. 2003. Pulsed-Field Gel Electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a National Database. *J. Clin. Microbiol.* 41(11):5113-5120. PMID:14605147. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.41.11.5113-5120.2003>.
- Medeiros E.S., Freitas M.F.L., Pinheiro Júnior J.W., Saukas T.N., Krewer C.C., Santos A.S., Costa M.M. & Mota R.A. 2013. Bubaline mastitis etiology in Northeast of Brazil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 65(6):1891-1894. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352013000600043>.
- Monecke S., Kuhnert P., Hotzel H., Slickers P. & Ehrlich R. 2007. Microarray based study on virulence-associated genes and resistance determinants of *Staphylococcus aureus* isolates from cattle. *Vet. Microbiol.* 125(1-2):128-140. PMID:17614219. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.05.016>.
- Moon J.S., Lee A.R., Kang H.M., Lee E.S., Kim M.N., Paik Y.H., Park Y.H., Joo Y.S. & Koo H.C. 2007. Phenotypic and genetic antibiogram of methicillin-resistant staphylococci isolated from bovine mastitis in Korea. *J. Dairy Sci.* 90(3):1176-1185. PMID:17297092. [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(07\)71604-1](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)71604-1).
- Mota R.A., Medeiros E.S., Santos M.V., Pinheiro Junior J.W., Moura A.P.B.L. & Coutinho L.C.A. 2012. Participação dos *Staphylococcus* spp na etiologia das mastites em bovinos leiteiros no estado de Pernambuco (Brasil). *Ciênc. Anim. Bras.* 13(1):124-130.
- Muller R. 2009. Pesquisa de anticorpos anti-pbp2a em pacientes colonizados por *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina (MRSA). Dissertação de Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.
- Muricy R.F. 2003. Ocorrência de mastite subclínica em caprinos e qualidade higiênico-sanitária do leite produzido em propriedades associadas à Cooperativa Languirú, Teutônia, RS. Dissertação de Mestrado em Ciência Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Neves M.C., Rossi Junior O.D., Alves E.C.C. & Lemos M.V.F. 2007. Detecção de genes da resistência antimicrobiana em cromossomos e plasmídeos de *Staphylococcus* spp. *Arqs Inst. Biológico, São Paulo* 74(3):2007-2013.
- Oliveira A.M. 1999. Investigação do comportamento de estafilococos enterotoxigênicos coagulase-negativos em alimentos. Tese de Doutorado em Ciências de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.
- Omoe K., Hu D.L., Takahashi-Omoe H., Nakane A. & Shinagawa K. 2005. Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates. *FEMS Microbiol. Lett.* 246(2):191-198. PMID:15899405. <http://dx.doi.org/10.1016/j.femsle.2005.04.007>.
- Paterson G.K., Harrison E.M. & Holmes M.A. 2014a. The emergence of mecC methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* 22(1):42-47. PMID:24331435. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2013.11.003>.
- Paterson G.K., Morgan F.J.E., Harrison E.M., Peacock S.J., Parkhill J., Zadoks R.N. & Holmes M.A. 2014b. Prevalence and properties of mecC methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in bovine bulk tank milk in Great Britain. *J. Antimicrob. Chemother.* 69(3):598-602. PMID:24155057. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkt417>.
- Paterson G.K., Larsen A.R., Robb A., Edwards G.E., Pennycott T.W., Foster G., Mot D., Hermans K., Baert K., Peacock S.J., Parkhill J., Zadoks R.N. & Holmes M.A. 2012a. The newly described mecA homologue, mecALGA251, is present in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from a diverse range of host species. *J. Antimicrob. Chemother.* 67(12):2809-2813. PMID:22941897. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dks329>.
- Paterson G.K., Larsen J., Harrison E.M., Larsen A.R., Morgan F.J., Peacock S.J., Parkhill J., Zadoks R.N. & Holmes M.A. 2012b. First detection of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 in bulk tank milk in the United Kingdom, January to July 2012. *Euro Surveill.* 17(50):20337. PMID:23241232.
- Peacock S.J. & Paterson G.K. 2015. Mechanisms of MRSA resistance. *Annual review biochem.* 84.
- Pu W., Su Y., Li J., Li C., Yang Z., Deng H. & Ni C. 2014. High incidence of oxacillin-susceptible *meca*-positive *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA) associated with bovine mastitis in China. *Plos One* 9(2):e 88134. PMID:24523877. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0088134>.
- Quinn P.J., Markey B.K., Carter M.E., Donnelly W.J. & Leonard F.C. 1999. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. Blackwell Science.
- Rabelo M.A., Bezerra Neto A.M., Loibman S.O., da Costa Lima J.L., Ferreira E.L., Leal N.C. & Maciel M.A.V. 2014. The occurrence and dissemination of methicillin and vancomycin-resistant *Staphylococcus* in samples from patients and health professionals of a university hospital in Recife, State of Pernambuco, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 47(4):437-446. PMID:25229283. <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0071-2014>.
- Radostits O.M., Gay C.C., Blood D.C. & Hinchcliff K.W. 2000. *Clínica Veterinária*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Raia Junior R.B. 2001. Influência da mastite na ocorrência de resíduos antimicrobianos no leite. Dissertação de Mestrado em Farmácia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.
- Rollin B. 2001. Ethics, science, and antimicrobial resistance. *J. Agric. Environ. Ethics* 14(1):29-37. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1011315022587>.
- Santos H.C. 2008. Mastite clínica em ovelhas da raça Santa Inês no semi-árido da Paraíba. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária de Ruminantes e Equídeos, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, PB.
- Silva N., Junqueira V.C.A. & Silveira N.F.A. 1997. *Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos*. Varela Editora, São Paulo.
- Silva N.C., Guimarães F.F., Manzi M.P., Fernandes Júnior AF, Gómez-Sanz E., Gómez P., Langoni H., Rall V.L. & Torres C. 2014. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of lineage ST398 as cause of mastitis in cows. *Let. Appl. Microbiol.* 59(6):665-669. PMID:25236329. <http://dx.doi.org/10.1111/lam.12329>.
- Stöhr K. & Wegener H.C. 2001. Non-human antibiotic use and resistance. *Drugs Resist. Updates* 3:2007-2009.
- Tetzner T.A.D. 2005. Prevalência de resíduos de antibióticos em amostras de leite cru na região de Triângulo Mineiro, MG. *Revta Hig. Alim.* 19(130):69-72.
- Torimiro N., Moshood A.A. & Eyiolawi S.A. 2013. Analysis of Beta-lactamase production and antibiotics resistance in *Staphylococcus aureus* strains. *J. Infect. Dis. Immun.* 5(3):24-28. <http://dx.doi.org/10.5897/JIDI2013.0118>.
- Turutoglu H., Ercelik S. & Ozturk D. 2006. Antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis. *Bull. Vet. Res. Inst. Pul.* 50:41-45.
- Vanderhaeghen W., Cerpentier T., Adriaenssens C., Vicca J., Hermans K. & Butaye P. 2010. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 associated with clinical and subclinical mastitis in Belgian cows. *Vet. Microbiol.* 144(1-2):166-171. PMID:20092969. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.12.044>.
- Vishnupriya S., Antony P.X., Mukhopadhyay H.K., Pillai R.M., Thanislass J., Vivek Srinivas V.M. & Sumanth Kumar R. 2014. Methicillin resistant staphylococci associated with bovine mastitis and their zoonotic importance. *Vet World* 7(6):422-427. <http://dx.doi.org/10.14202/vetworld.2014.422-427>.
- Wulf M.W., Sørum M., Van Nes A., Skov R., Melchers W.J., Klaassen C.H. & Voss A. 2008. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among veterinarians: an international study. *Clin. Microbiol. Infect.* 14(1):29-34. PMID:17986212. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01873.x>.

6. ARTIGO 2

**Methicillin-Resistant *Staphylococcus* spp. in Milk, Milkers, Milking Environment,
and the Circulation of Different MRSA Clones at Dairy Cows Farms in Brazil**

(Artigo submetido ao periódico Preventive Veterinary Medicine)

Methicillin-Resistant *Staphylococcus* spp. in Milk, Milkers, Milking Environment, and the Circulation of Different MRSA Clones at Dairy Cows Farms in Brazil

José Givanildo da Silva^{a*}, Anderson Carlos Camargo^b, Renata Pimentel Bandeira de Melo^a, Breno Bezerra Aragão^a, Junior Mário Baltazar de Oliveira^a, Maria José de Sena^a, Luís Augusto Nero^b, Rinaldo Aparecido Mota^a

^aLaboratório de Doenças Infectocontagiosas dos Animais Domésticos, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CP 52171-900 Recife, Pernambuco, Brazil.

^bLaboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal, Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Campus UFV, Centro, 36570 900, Viçosa, MG, Brazil.

*Corresponding author. Tel.: +55 81 3320 6427/6425. E-mail address: givanildojgs@gmail.com.

Abstract

This study reports the occurrence of *mecA* positive *Staphylococcus* spp. and the circulation of different Methicillin Resistant *S. aureus* (MRSA) clones in dairy cow farms in Pernambuco state, Brazil. 335 samples of cow milk, 15 samples of nasal and hand swabs from milkers, 14 teat cup swabs, and 9 milking buckets swabs were analysed. Initially, the samples were subjected to microbiological analysis to detect *Staphylococcus* spp. and then to molecular assays to identify *S. aureus* and *mecA* positive isolates. MRSA genotyping was performed by Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE). *mecA* was detected in 6/335 (1.78%) of milk isolates, 5/15 (33.3%), and 5/15 (33.2%) of nasal and hand swab isolates, and 4/14 (28.5%) of the teat cup isolates. PFGE allowed the characterization of eight pulsotypes (I-VIII), grouped in three larger clusters. All MRSA isolates recovered from milkers and milking environment (farms B, C, D) exhibited different genetic profile while isolates obtained from milk (farms A, E) had the same or shared a very similar profile. This study identified the occurrence and spread of MRSA at dairy environment of farms from Northeastern Brazil, and the existence of distinct clonal complexes.

Keywords: Multidrug resistance, genetic correlation, One Health.

1. Introduction

Mastitis is a plurietiological and multifactorial disease that is caused mainly by bacteria of the genus *Staphylococcus*. These bacteria are often associated with a wide variety of opportunistic infections in humans and animals (Wong et al., 2002; Wille et al., 2014).

Another concern related to mastitis caused by *Staphylococcus* spp. is the emergence of antimicrobial resistant strains as well as the ability to transfer some resistance genes to humans, such as strains of Methicillin Resistant *Staphylococcus* (MRS) (LIM et al., 2013). Emergence of MRS strains results from modifications in the sites of antimicrobial action in the *Staphylococcus* Chromosome Cassettes (SCCmec), which result in multiresistant isolates, especially to beta-lactams (CRISOSTOMO et al., 2001). Twelve types of SCCmec that harbor *mecA* and/or *mecC* are now known; both these genes encode penicillin binding proteins (PBP) that result in a decreased affinity for this class of antimicrobials (KIM et al., 2012; LEE et al., 2018). *mecB* has recently been identified in *Staphylococcus aureus*; however, its mechanism of action has not been fully described (BECKER et al., 2018).

MRS strains have been identified in cases of bovine mastitis in various parts of the world such as Great Britain, Korea, and Germany (FESSLER et al., 2010; LIM et al., 2013; PATERSON et al., 2014). Contact between humans and animals positive for MRS and vice versa, may also favor pathogen transmission between species, and the environment may be a source of infection for both (JUHÁSZ-KASZANYITZKY et al., 2007). In Brazil, few studies have identified cases of mastitis caused by MRS (Andrade, 2012; Matos, 2014; Melo et al., 2018; Santos et al., 2016; Soares et al., 2012). However, no study has evaluated and detected the presence of MRS isolates in cases of mastitis, workers, and the milking environment, and a possible genetic correlation between MRS isolates from various sources in the agricultural environment. This demonstrates the need to conduct research that contributes to the epidemiology of infection with this pathogen in Brazil.

This study aimed to detect the presence and distribution of *mecA* in *Staphylococcus* spp. in the dairy production environment at farm level in Brazil. The genetic correlation between MRS isolates in the agricultural environment was also studied.

2. Material and methods

2.1. Ethics Committee

This study was approved by the Animal Use Ethics Committee of the Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, Brazil (license number 106/2017) and the Research Ethics Committee of the Universidade de Pernambuco (UPE), Recife, Brazil (CAAE number: 88030518.0.0000.5207).

2.2. Sample collection

Five dairy farms (A, B, C, D and E) located in different regions of the state of Pernambuco, Northeastern Brazil, were included in the present study. Milk samples collected from 676 udder quarters were subjected to the California Mastitis Tests (CMT) and those that were equal to or greater than one cross (+) (319 samples) or found positive in the routine strip cup test (16 samples) were selected for microbiological testing. Also, samples from dairy environment (mechanical milking equipment and milking buckets) and milkers (hands and nasal cavities) were obtained by using swabs and subjected to microbiological analysis. Of the five farms studied, two used mechanical milking; in these farms, swabs were collected from the teat sets (forming pools of each equipment). In the three farms that performed manual milking, swabs were collected from the milking buckets. The hygiene practices adopted during milking were also visually evaluated.

A total of 15 samples of milk and hand swabs from milkers, 14 samples from teat taps and nine samples of milking buckets were obtained. The distribution by farm of the collected samples is described in table 1. All samples were transported under refrigeration to the laboratory, where microbiological and molecular analyses were performed.

Table 1. Distribution by dairy farm of samples collected.

Dairy farms	Milk	Milkers		Environment	
		Hands	Nasal	Teat cup	Milking buckets
A	37	3	3	-	2
B	4	2	2	-	2
C	116	3	3	4	-
D	104	4	4	-	5
E	74	3	3	10	-
Total	335	15	15	14	9

2.3. Isolation and preliminary identification of *Staphylococcus* spp.

Isolation of *Staphylococcus* spp. was performed by direct plating of all samples on 5% sheep blood agar, followed by incubation at 37°C for 24-48 h. Then, isolated colonies were subjected to Gram staining technique to check morphology, catalase test, coagulase, and mannitol fermentation (Carter, 1998). Subsequently, the isolates were transferred to BHI broth (Difco Laboratories Inc., Detroit, USA), incubated overnight and frozen at -80°C in the presence of 20% glycerol. The isolates were subsequently recovered on blood agar and submitted to molecular techniques for proper identification and characterization and determination of oxacillin minimum inhibitory concentration.

2.4. DNA extraction and PCR reactions

The genomic DNA of all isolates identified in preliminary tests as *Staphylococcus* spp. was extracted (Fan et al., 1995). The DNA obtained was quantified using a spectrophotometer with 260 nm absorbance readings. The identification of *S. aureus* was performed by PCR targeting *nuc*, whereas detection of MRS was performed by targeting *mecA* (**Table 2**). Reactions for both genes contained a final volume of 12.5 µL, consisting of 100 ng of isolated DNA, 0.5 µL of each primer (10 pmol), 6.25 µL of Go Taq Green Master Mix (Promega Corporation, Madison, USA), and 2.5 µL of ultrapure Milli-q water. The PCR products were subjected to 2% agarose gel electrophoresis for 60 minutes at 100 V. At the end of the run, BlueGreen-stained gels (LGC biotechnology) were visualized under ultraviolet light and imaged. *S. aureus* N315 strain was used as a positive control in all PCR reactions.

Table 2. Genes, oligonucleotide sequences and size of amplified fragments.

Gene	Primer	Sequence	Fragment Size (pb)	References
<i>nuc</i>	1	GCGATTGATGGTGATACGGTI	270	Brakstad et al. (1992)
	2	AGCCAAGCCTTGACGA ACTAAAGC		
<i>mecA</i>	2W	TGGTATGTGGAAGTTAGATTGGGAT	155	Nakagawa et al. (2005)
	2X	CTAATCTCATATGTGTTCTGTATTGGC		

2.5. Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

mecA harboring isolates were subjected to a broth microdilution assay to assess their resistance to methicillin, according to the protocol described by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2018). Oxacillin was used as a

reference antimicrobial at concentrations of 16, 8, 4 (cut-off), 2, 1, and 0.5 µg/mL and the *S. aureus* N315 strain was used as a positive control.

For inoculum preparation, *mecA* harboring isolates were plated in non-selective solid medium (Mueller Hinton Agar, SIGMA-ALDRICH) and incubated at 37 °C for 24h. Isolated colonies were suspended in 0.9% saline until turbidity equivalent to 0.5 McFarland standard; This suspension contains approximately 1×10^8 CFU/mL. Subsequently, the bacterial suspension was inoculated into Mueller Hinton broth (SIGMA-ALDRICH). Samples were processed in triplicate and a volume of 100µL was distributed to each well of a 96-well microplate. Plate microdilutions were incubated at 35 °C for 24h and OD readings at 620 nm were taken on the Elisa microplate reader (Multiskan Go Thermo Scientific). MIC was defined as the lowest concentration of solution that inhibited more than 75% of bacterial growth (CLSI, 2018).

2.6. MRSA PFGE Genotyping

All *S. aureus* isolates carrying the *mecA* gene were subjected to DNA macro-restriction analysis according to the methodology described by André et al. (2008), with some modifications. After reactivation in BHI broth (Difco Laboratories Inc., Detroit, Estados Unidos) at 37°C for 16-18 h, 200 µL of the cultures were transferred to 2.0 mL tubes and centrifuged at 14,000 rpm/4 min. Then, the supernatant was discarded and the pellet was resuspended in 150 µL of Cell Suspenser Buffer solution (10 mM Tris-HCL, pH 7.2; 20 mM NaCl and 50 mM EDTA). For cell lysis, 7 µL of lysostaphin (1 mg/mL), and 7 µL of lysozyme (10 mg/mL) were added. Plugs were made by adding 150 µL of 2% low melting agarose, transferred to 2.0-mL tubes containing 1 mL of lysis buffer (10 mM Tris-HCL, pH 7.2; 50 mM NaCl; 50 mM EDTA, 0.2% deoxycholate, and 0.5% sarcosyl) and incubated for 1 h at 37 °C. After this period, the lysis buffer was removed and 500 µL of proteinase K solution (2 mg/mL; 250 mM EDTA, pH 9.0, and 1% sarcosyl) was added, then the tubes were incubated at 50°C for 30 min. After incubation, the proteinase K solution was removed and 1.4 mL wash buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.6; 1 mM EDTA) was added and the tubes were incubated again at 50 °C for 30 min. After incubation, three successive 30 min washes were performed with the wash buffer.

Digestion with restriction enzymes was performed after 1/5 of the plugs were cut and transferred to tubes containing 150 µL of 1x TE buffer, where 30 U of *Sma*I (Promega Corporation, Madison, WI, USA) restriction enzyme was added. The

reaction was performed overnight at 25 °C and plugs were transferred to 1% agarose gel wells. Electrophoresis was performed with CHEF-DR III System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Electrophoresis was performed following the following parameters: 5-40 s for 21 h, at an angle of 120°, 6 V/cm, in 0.5 x TBE buffer maintained at 14 °C. *Salmonella enterica* serotype Braenderup H9812 (CDC) digested with 20 IU of *XbaI* (Promega Corporation®, Madison, WI, USA) was used as a marker (RIBOT et al., 2006). The obtained gels were developed in an immersion bath with intercalating UniSafe Dye (Uniscience, Brazil) and were visualized with a transilluminator under ultraviolet light and imaged for further analysis. Images were analyzed using BioNumerics v.6.6.4 software (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). A dendrogram was obtained by the Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) grouping, using the Dice similarity coefficient and the 5% tolerance and optimization degree (TENOVER et al., 1995).

3. Results and discussion

Staphylococcus spp. is considered the main causative agent of mastitis in dairy herds. High infection rates and persistence of *Staphylococcus* are mainly associated with inadequate management, lack of teat hygiene (before and after milking), diagnostic routine (subclinical and chronic forms of disease), and absence of dry cow therapy (MOON et al., 2007; FESSLER et al., 2010; HOQUE et al., 2018). All these improper management practices were observed at the farms participating in this study during sampling, which may have contributed to the obtained results. In some cases, control measures to improve milking hygiene are not effective in preventing new infections with *Staphylococcus* spp., especially that of *S. aureus*, indicating the complexity of the problem and the possibility of other transmission routes such as hands and milkers nostrils, and the milking environment (VISCIANO et al., 2014).

The results of isolation, molecular identification of *Staphylococcus* spp. and *mecA* samples from milk, milkers, and milking utensils are shown in **Table 3**. The frequency of MRS mastitis cases was 1.78% (6/335), and of this total, most cases were caused by MRSA with 47.6% of MRS bovine mastitis cases (SAINI et al., 2012; PU et al., 2014b). Methicillin is not an antimicrobial used in the treatment of Intramammary Infections (IMI) in cows. However, MRS is a generic term that corresponds to a virtual resistance against practically all β -lactams, except the last

generation cephalosporins; when MRS identification occurs, the isolate is considered multiresistant (PEACOCK; PATERSON, 2015).

Table 3. Isolation, molecular identification of *Staphylococcus* spp. and *mecA* samples from milk, milkers, and milking utensils

Sample	n ¹	Isolation of <i>Staphylococcus</i> spp. ²	Molecular identification of <i>Staphylococcus</i> spp. ³		Molecular identification of methicillin resistance ⁵	
			<i>S. aureus</i>	Sna ⁴	MRSA ⁶	MRSNA ⁷
Mastitic milk	335	115/335 (34,3%)	43/115 (37,4 %)	72/115 (62,6 %)	5/335 (1,49%)	1/335 (0,29%)
Milkers hand swab	15	12/ 15 (80%)	8/12 (66,6%)	4/12 (33,3%)	3/15 (20%)	2/15 (13,3%)
Milkers nasal swab	15	13/15 (86,6%)	2/13 (15,3%)	11/13 (84,7%)	1/15 (6,6%)	4/15 (26,6%)
Teat cup swab	14	14/14 (100%)	4/14 (28,5%)	10/14 (71,5%)	1/14 (7,1%)	3/14 (21,4%)
Milking bucket swab	9	8/9 (88,8%)	7/8 (87,5%)	1/8 (12,5%)	0/9 (0%)	0/9 (0%)

¹Samples collected. ²Based on phenotypical characteristics. ³Based on PCR for *nuc*. ⁴ *Staphylococcus non-aureus*. ⁵Based on PCR for *mecA*.

⁶MRSA - Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA); ⁷MRSNA - Methicillin Resistant *Staphylococcus non-aureus* (MRSNA).

Antimicrobial resistant bacteria are considered one of the major public health concerns worldwide. IMI is the most common cause of antimicrobial use in dairy herds, so bovine milk is considered as potential source of MRS. This lowers the effectiveness of current treatments and the ability to control infectious diseases in animals and humans (LEE, 2006; CHANDRASEKARAN et al., 2014b), mainly due to the close relationship established in dairy farms between different animal species and humans (KAMAL; BAYOUMI; ABD EL AAL, 2013b; SILVA et al., 2014a; RAYMUNDO; BERSOT; OSAKI, 2018).

The results presented in this study are in addition to others performed in other regions of the country that have identified cases of bovine mastitis due to MRSA and MRS and should serve as a warning to animal health authorities regarding the improvement of programs for the control and rational use of antimicrobials in veterinary medicine (Andrade, 2012; Soares et al., 2012; Matos, 2014; Silva et al., 2014; Santos et al., 2016; Melo et al., 2018;). High or indiscriminate use of antimicrobial contributes to the selection and persistence of MRS strains and, consequently, their spread throughout the agricultural environment (RAIA JUNIOR, 2001; ROLLIN, 2001). One of the strategies to verify MRS spread in this environment is to collect samples from animals and other sources such as workers and the environment (JAMROZY et al., 2012; LIM et al., 2013).

In this study, MRS was identified in the nostrils and hands of milkers and in environmental samples (teat cups). With respect to samples from milkers, a high percentage of MRSA was detected in the nostrils, whereas MRSNA was the most identified in the hands. Identification of MRS in humans has been reported frequently, especially in cases of nosocomial infection, which has generated considerable concern among public health professionals (RABELO et al., 2014). As in this study, there are also reports of microorganisms identification in dairy farm workers in other countries. Some authors suggest that people who work or live in close contact with cows are at higher risk of being colonized and infected with MRSA (VAN LOO et al., 2007; LIM et al., 2013). However humans can also serve as a source of infection for the environment and animals if they are already infected (JUHÁSZ-KASZANYITZKY et al., 2007). Thus there is a need to monitor microorganisms at the interface of dairy cows and humans (SCHMIDT; KOCK; EHLERS, 2017).

Detection of MRS in environmental samples (teat cups), which are associated with milking, indicate a possible circulation between cows' isolates and the environment or humans and the environment, as these utensils are handled by the milkers (LIM et al., 2013). Sample collection from teat cups was performed immediately after milking according to the method proposed by Pletinckx et al. (2013). Detection of MRS in these utensils soon after milking indicates that these may be a source of transmission and a good indicator of the presence of MRS in dairy farms.

At MIC all MRS isolates were sensitive at the cut-off point for oxacillin (4 µg/mL) as determined by CLSI (2018). These results may indicate the existence of susceptible oxacillin *mecA* positive (OS-MRS) isolates. Divergence between genotypic and phenotypic resistance has been reported in the literature (KAMAL; BAYOUMI; ABD EL AAL, 2013b; PU et al., 2014a). Phenotypic tests may have limitations due to the occurrence of heteroresistance, where only certain subsets of bacterial cells express the resistant phenotype, and generate false negatives (PENN et al., 2013). Furthermore, regulatory systems such as *mecI-mecR1* and *bla*, present in some strains carrying the *mecA* gene, may control the oxacillin resistance phenotype (MCKINNEY et al., 2001). According to Liu et al. (2016), the higher the expression of *bla* regulators, the lower is the expression of *mecA*, and, consequently, the isolates have phenotypic sensitivity. Oliveira and de Lencastre (2011) suggested that other unidentified determinants are involved in the transcriptional control of *mecA* and that elucidating the nature of these determinants is relevant for a complete understanding of the molecular mechanisms controlling the phenotypic expression of resistance, and that this may contribute to the development of new therapeutic strategies.

Molecular characterization results of MRSA isolates using PFGE technique is shown in figure 1.

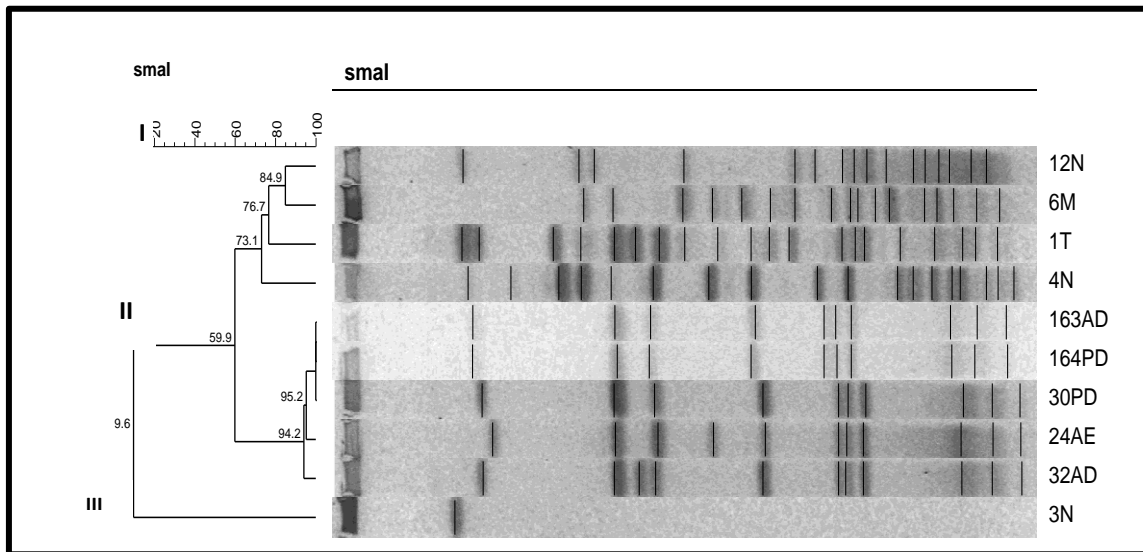


Figure 1. Dendrogram of PFGE profiles generated from the *UPGMA/Dice* (*Bionumerics, Applied Maths*) for 10 MRSA isolates. Legends: I - III - identified clusters; M- Hand; N- Nasal; T – Teat cup; AE- Right anterior teat; PD – Right rear teat; AD – Right anterior teat; smaI – Restriction enzyme.

The genetic profiles of 10 MRSA isolates identified in the present study were revealed by PFGE after macrorestriction performed with the enzyme *SmaI*. The isolates were grouped into eight pulsotypes (I-VIII) within three clusters (1, 2 and 3). Cluster 1 grouped four MRSA isolates (4N, 6M, 12N and 1T), which shared at least 68.8% similarity. Interesting, only MRSA isolates recovered from human and teat cup (from dairy farms B, C, and D) were grouped in this cluster (**Table 4**).

Table 4. Genetic profiles of MRSA isolates obtained from dairy farms in the state of Pernambuco, Brazil.

Cluster	Pulsotype	Isolates	Origin	Farm
1	I	4N	Nasal swabs	B
	II	6M	Hand swabs	C
	III	12N	Nasal swabs	D
	IV	1T	Teat cup	C
2	V	163AD	Milk	E
	V	164PD	Milk	E
	V	30PD	Milk	A
	VI	24AE	Milk	A
	VII	32AD	Milk	A
3	VIII	3N	Nasal swabs	B

Cluster 2 grouped five MRSA isolates (163AD, 164PD, 30PD, 24AE, and 32AD) recovered from milk samples at farms A and E. It was possible to detect a greater genetic similarity (93.6%) between them. The 163AD, 164PD, and 30PD isolates shared the same genetic profile (pulsotype V), although they originated from farms far away (over 200 km), indicating that genetically similar MRSA strains are widespread in different regions of Pernambuco state, Brazil. The 3N isolate was not digested, and therefore, it was not possible to determine its genetic correlation with other MRS, which was grouped separately in cluster 3.

Identification of isolates with similar genetic profiles in different dairy farms indicates that some strains are disseminated in this region, and may be endemic MRSA clonal profiles (SANTOS et al., 2016).

Here we shown isolates obtained from milk, even from distant farms, sharing high genetic similarity, suggesting that clonal complexes adapted to colonize the mammary glands of animals are disseminated in the state of Pernambuco, Brazil. at least one MRSA isolate was identified in each on farm included in the study.

The present study describes the existence of MRS in milk samples, milkers, and milking utensils in dairy cow farms in Brazil, and creates

awareness among the One Health authorities regarding the importance of implementing Methicillin Resistant *Staphylococcus* spp. dissemination control programs. It also serves as a reference for conducting other studies related to the epidemiology of multiresistant bacteria in the country.

4. Conclusion

This study identified the distribution and dissemination of MRS in the dairy environment of northeastern Brazil and the presence of distinct clonal complex MRSA complexes.

Declaration of Competing Interest

None.

Acknowledgments

To the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for granting research grants to the first author.

References

- Andrade, H.H. DE, 2012. Genotipagem de cepas de *Staphylococcus aureus* Isolados de Mastites Subclínicas Bovina no Distrito Federal e Entorno. UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA.
- André, M.C.D.P.B., Campos, M.R.H., Borges, L.J., Kipnis, A., Pimenta, F.C., Serafini, Á.B., 2008. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from food handlers, raw bovine milk and Minas Frescal cheese by antibiogram and pulsed-field gel electrophoresis following Smal digestion. Food Control 19, 200–207. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.03.010>
- Becker, K., Alen, S. Van, Idelevich, E.A., Schleimer, N., Seggewiß, J., Mellmann, A., Kaspar, U., Peters, G., 2018. Plasmid-Encoded Transferable mecB -Mediated Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. Emerg. Infect. Dis. 24, 242–248. <https://doi.org/10.3201/eid2402.171074>
- Brakstad, O. G.; Aasbakk, K.; Maeland, J. A., 1992. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the nuc gene. Journal of clinical microbiology 30, p. 1654–1660.

- CARTER, G. R. 1988. Fundamentos de bacteriologia e micologia veterinária. Editora Roca, p.197-198.
- Chandrasekaran, D., Venkatesan, P., Tirumurugaan, K.G., Nambi, A.P., Thirunavukkarasu, P.S., Kumanan, K., Vairamuthu, S., Ramesh, S., 2014. Pattern of antibiotic resistant mastitis in dairy cows. *Vet. World* 7, 389–394. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2014.389-394>
- CLSI, 2018. PerforCLSI. (2018). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Clinical and Laboratory Standards Institute. Retrieved from www.clsi.org mance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing., Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing.
- Crisostomo, M.I., Westh, H., Tomasz, A., Chung, M., Oliveira, D.C., de Lencastre, H., 2001. The evolution of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: Similarity of genetic backgrounds in historically early methicillin-susceptible and -resistant isolates and contemporary epidemic clones. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 9865–9870. <https://doi.org/10.1073/pnas.161272898>
- Fan, H. H., S. H. Kleven, and M. W. Jackwood. 1995. Application of polymerase chain reaction with arbitrary primers to strain identification of *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Dis.* 39:729–735
- Fessler, A., Scott, C., Kadlec, K., Ehricht, R., Monecke, S., Schwarz, S., 2010. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from cases of bovine mastitis. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 619–625. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq021>
- Hoque, M.N., Das, Z.C., Rahman, A.N.M.A., Haider, M.G., Islam, M.A., 2018. Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* strains in bovine mastitis milk in Bangladesh. *Int. J. Vet. Sci. Med.* 6, 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2018.03.008>
- Jamrozny, D.M., Fielder, M.D., Butaye, P., Coldham, N.G., 2012. Comparative genotypic and phenotypic characterisation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 isolated from animals and humans. *PLoS One* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040458>
- Juhász-Kaszanyitzky, É., Jánosi, S., Somogyi, P., Dán, Á., Van Der Graaf-van Bloois, L., Van Duijkeren, E., Wagenaar, J.A., 2007. MRSA transmission

- between cows and humans. *Emerg. Infect. Dis.* 13, 630–632.
<https://doi.org/10.3201/eid1304.060833>
- Kamal, R.M., Bayoumi, M.A., Abd El Aal, S.F.A., 2013. MRSA detection in raw milk, some dairy products and hands of dairy workers in Egypt, a mini-survey. *Food Control* 33, 49–53.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.02.017>
- Kim, C., Milheiriço, C., Gardete, S., Holmes, M.A., Holden, M.T.G., de Lencastre, H., Tomasz, A., 2012. Properties of a Novel PBP2A Protein Homolog from *Staphylococcus aureus* Strain LGA251 and Its Contribution to the β -Lactam-resistant Phenotype. *J. Biol. Chem.* 287, 36854–36863.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.395962>
- Lee, A.S., de Lencastre, H., Garau, J., Kluytmans, J., Malhotra-Kumar, S., Peschel, A., Harbarth, S., 2018. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat. Rev. Dis. Prim.* 4, 18033. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.33>
- LEE, J., 2006. Occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from cattle and chicken, and analyses of their *mecA*, *mecR1* and *mecI* genes. *Vet. Microbiol.* 114, 155–159.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.10.024>
- Lim, S.-K., Nam, H.-M., Jang, G.-C., Lee, H.-S., Jung, S.-C., Kim, T.-S., 2013. Transmission and Persistence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Milk, Environment, and Workers in Dairy Cattle Farms . *Foodborne Pathog. Dis.* 10, 731–736.
<https://doi.org/10.1089/fpd.2012.1436>
- Liu, P., Xue, H., Wu, Z., Ma, J., Zhao, X., 2016. Effect of bla regulators on the susceptible phenotype and phenotypic conversion for oxacillin-susceptible *mecA* -positive staphylococcal isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* 71, 2105–2112. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw123>
- MATOS, R.A.T., 2014. Resistência à metilina em estafilococos coagulase positivos e negativos causadores de infecções em animais de companhia e animais de produção. Universidade Federal de Campina Grande.
- McKinney, T.K., Sharma, V.K., Craig, W.A., Archer, G.L., 2001. Transcription of the Gene Mediating Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus* (*mecA*) Is Corepressed but Not Coinduced by Cognate *mecA* and beta -Lactamase Regulators. *J. Bacteriol.* 183, 6862–6868.

- <https://doi.org/10.1128/JB.183.23.6862-6868.2001>
- Melo, D.A., Motta, C.C., Rojas, A.C.C.M., Soares, B.S., Coelho, I.S., Coelho, S.M.O., Souza, M.M.S., 2018. Characterization of Coagulase-Negative Staphylococci and pheno-genotypic beta lactam resistance evaluation in samples from bovine Intramammary infection. *Arq. Bras. Med. Veterinária e Zootec.* 70, 368–374. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-9209>
- Moon, J.-S., Lee, A.-R., Kang, H.-M., Lee, E.-S., Kim, M.-N., Paik, Y.H., Park, Y.H., Joo, Y.-S., Koo, H.C., 2007. Phenotypic and Genetic Antibigram of Methicillin-Resistant Staphylococci Isolated from Bovine Mastitis in Korea. *J. Dairy Sci.* 90, 1176–1185. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(07\)71604-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)71604-1)
- Nakagawa, S., Taneike, I., Mimura, D., Iwakura, N., Nakayama, T., Emura, T., Kitatsuji, M., Fujimoto, A., Yamamoto, T., 2005. Gene sequences and specific detection for Pantone-Valentine leukocidin. *Biochem Biophys Res Commun*, 328, 995–1002. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.01.054>
- Oliveira, D.C., de Lencastre, H., 2011. Methicillin-Resistance in *Staphylococcus aureus* Is Not Affected by the Overexpression in Trans of the *mecA* Gene Repressor: A Surprising Observation. *PLoS One* 6, e23287. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023287>
- Paterson, G.K., Morgan, F.J.E., Harrison, E.M., Peacock, S.J., Parkhill, J., Zadoks, R.N., Holmes, M.A., 2014. Prevalence and properties of *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in bovine bulk tank milk in great britain. *J. Antimicrob. Chemother.* 69, 598–602. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt417>
- Peacock, S.J., Paterson, G.K., 2015. Mechanisms of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Annu. Rev. Biochem.* 84, 577–601. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-034516>
- Penn, C., Moddrell, C., Tickler, I.A., Henthorne, M.A., Kehrl, M., Goering, R. V., Tenover, F.C., 2013. Wound infections caused by inducible methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 1, 79–83. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2013.03.009>
- Pletinckx, L.J., Verheghe, M., Crombé, F., Dewulf, J., De Bleecker, Y., Rasschaert, G., Butaye, P., Goddeeris, B.M., De Man, I., 2013. Evidence of possible methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 spread

- between pigs and other animals and people residing on the same farm. *Prev. Vet. Med.* 109, 293–303. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2012.10.019>
- Pu, W., Su, Y., Li, J., Li, C., Yang, Z., Deng, H., Ni, C., 2014. High Incidence of Oxacillin-Susceptible *mecA*-Positive *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA) Associated with Bovine Mastitis in China. *PLoS One* 9, e88134. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088134>
- Pu, W.X., Su, Y., Li, J.X., Li, C.H., Yang, Z.Q., Deng, H.P., Ni, C.X., 2014. High incidence of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA) associated with bovine mastitis in China. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088134>
- Rabelo, M.A., Neto, A.M.B., Loibman, S.O., da Costa Lima, J.L., Ferreira, E.L., Leal, N.C., Maciel, M.A.V., 2014. The occurrence and dissemination of methicillin and vancomycin-resistant *Staphylococcus* in samples from patients and health professionals of a university hospital in Recife, State of Pernambuco, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 47, 437–446. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0071-2014>
- Raia Junior, R.B., 2001. Influência Da Mastite Na Ocorrência De Resíduos De Antimicrobianos No Leite. UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO.
- Raymundo, N.K.L., Bersot, L. dos S., Osaki, S.C., 2018. Consumer profile and problems associated with uninspected raw milk consumption in western Paraná. *Arq. Inst. Biol. (Sao. Paulo)*. 84, 1–8. <https://doi.org/10.1590/1808-1657000872016>
- Ribot, E.M., Fair, M.A., Gautom, R., Cameron, D.N., Hunter, S.B., Swaminathan, B., Barrett, T.J., 2006. Standardization of Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocols for the Subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathog. Dis.* 3, 59–67. <https://doi.org/10.1089/fpd.2006.3.59>
- Rollin, B., 2001. Ethics, science, and antimicrobial resistance. *J. of Agricultural Environ. Ethics* 14, 29–37. <https://doi.org/10.1023/A:1011315022587>
- Saini, V., McClure, J.T., Léger, D., Keefe, G.P., Scholl, D.T., Morck, D.W., Barkema, H.W., 2012. Antimicrobial resistance profiles of common mastitis pathogens on Canadian dairy farms. *J. Dairy Sci.* 95, 4319–4332. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5373>

- Santos, F.F. dos, Mendonça, L.C., Reis, D.R. de L., Guimarães, A. de S., Lange, C.C., Ribeiro, J.B., Machado, M.A., Brito, M.A.V.P., 2016. Presence of *mecA*-positive multidrug-resistant *Staphylococcus epidermidis* in bovine milk samples in Brazil. *J. Dairy Sci.* 99, 1374–1382. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9931>
- Schmidt, T., Kock, M.M., Ehlers, M.M., 2017. Molecular Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Mastitis and Close Human Contacts in South African Dairy Herds: Genetic Diversity and Inter-Species Host Transmission. *Front. Microbiol.* 8, 511. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00511>
- Silva, Nathalia C C, Guimarães, F.F., de P. Manzi, M., Gómez-Sanz, E., Gómez, P., Araújo-Júnior, J.P., Langoni, H., Rall, V.L.M., Torres, C., 2014. Characterization of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci in milk from cows with mastitis in Brazil. *Antonie Van Leeuwenhoek* 106, 227–233. <https://doi.org/10.1007/s10482-014-0185-5>
- Silva, N. C.C., Guimarães, F.F., Manzi, M.P., Júnior, A.F., Gómez-Sanz, E., Gómez, P., Langoni, H., Rall, V.L.M., Torres, C., 2014. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of lineage ST398 as cause of mastitis in cows. *Lett. Appl. Microbiol.* 59, 665–669. <https://doi.org/10.1111/lam.12329>
- Soares, L.C., Pereira, I.A., Pribul, B.R., Oliva, M.S., Coelho, S.M.O., Souza, M.M.S., 2012. Antimicrobial resistance and detection of *mecA* and *blaZ* genes in coagulase-negative *Staphylococcus* isolated from bovine mastitis. *Pesqui. Vet. Bras.* 32, 692–696.
- Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R. V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H., Swaminathan, B., 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33, 2233–9.
- van Loo, I., Huijsdens, X., Tiemersma, E., de Neeling, A., van de Sande-Bruinsma, N., Beaujean, D., Voss, A., Kluytmans, J., 2007. Emergence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* of Animal Origin in Humans. *Emerg. Infect. Dis.* 13, 1834–1839. <https://doi.org/10.3201/eid1312.070384>
- Visciano, P., Pomilio, F., Tofalo, R., Sacchini, L., Saletti, M.A., Tieri, E., Schirone, M., Suzzi, G., 2014. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dairy cow farms. *Food Control* 46, 532–538.

<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.06.022>

- Wille, H., Desclaux, A., Dutronc, H., Dauchy, F.-A., Wirth, G., Vital, J.-M., Dupon, M., 2014. Communications orales libres COL 08-Infections ostéo-articulaires Infection post-arthrodèse rachidienne : étude descriptive d'une cohorte de 129 patients. *Médecine Mal. Infect.* 44, 15–16.
- Wong, K.S., 2002. Clinical and radiographic spectrum of septic pulmonary embolism. *Arch. Dis. Child.* 87, 312–315. <https://doi.org/10.1136/adc.87.4.312>

7. ARTIGO 3

Occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harboring the *mecA* variant *mecC* in dairy herds in Northeastern Brazil

(Artigo submetido ao periódico Veterinary Microbiology)

Occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harboring the *mecA* variant *mecC* in dairy herds in Northeastern Brazil

José Givanildo da Silva^{a*}, Larissa Maranhão Dias^b, Priscylla Carvalho Vasconcelos^b, Núbia Michelle Vieira da Silva^b, Raylson Pereira de Oliveira^a, Maria José de Sena^a, Celso José Bruno de Oliveira^b, Rinaldo Aparecido Mota^a

^aLaboratório de Doenças Infectocontagiosas dos Animais Domésticos, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CP 52171-900, Recife, Pernambuco, Brazil.

^bLaboratório de Análise de Produtos de Origem Animal, Departamento de Zootecnia, Centro de Ciências Agrárias, Campus II, Universidade Federal da Paraíba, Rodovia PB 078, km 12, CP 58397-000, Areia, Paraíba, Brazil.

*Corresponding author. Tel.: +55 81 3320 6427/6425. E-mail address: givanildojgs@gmail.com.

Abstract

This study reports the occurrence of *mecC*-mediated, beta-lactam resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), in bovine dairy herds in Northeastern Brazil. Three *mecC*-harboring MRSA isolates were cultured from 335 samples (0.9%), including raw milk samples (n = 297), nasal and hand palm swabs from milkers (n = 15), teat cup swabs (n = 14), and milking bucket swabs (n = 9). 64 *S. aureus* isolates were obtained from conventional culture. *mecC*-harboring MRSA confirmation was performed by PCR targeting *nuc* and *mecC*. Three positive *mecC*-harboring MRSA isolates originated from milk, palm hand swabs, and milking bucket swabs, which were genotyped by RW3A-PCR; undistinguishable genotypic patterns were obtained. One of the isolates had its whole genome sequenced in a high throughput sequencer (Illumina Miseq). After bioinformatic procedures for quality filtering and trimming, genome assembly and annotation, the *mecC*-positive isolate was identified to have the sequence type of ST126 (spa type t605) MRSA, harboring the plasmid gene *rep24b*. Besides the *pbp2-a* variant gene, other antimicrobial-resistant determinants encoding for efflux pump systems (*arlR*, *mepR*, *LmrS*, *norA* and *mgrA*) and antibiotic inactivation enzymes (PC1 beta-lactamase (*blaZ*) and

FosB) were also detected. Virulence genes associated with exoenzyme (*aur*, *spIA*, *spIB*, and *spIE*), toxin (*hlgA*, *hlgB*, *hlgC*, *lukD*, and *lukE*), and enterotoxin (*sea*) production were also detected. To the best of our knowledge, this is the first report confirming the occurrence of *mecC*-harboring MRSA in Brazilian livestock. Considering the implications of these pathogens in public health and global food trade, further epidemiological investigations and surveillance are warranted.

Key words: mastitis, multidrug resistance, bacterial genome, virulence factors.

Introduction

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is a common cause of nosocomial infection and represents a major public health concern. In addition, some strains can produce enterotoxins, further compromising patient health (Rabelo et al., 2014).

In the agricultural environment, there is an additional concern about the presence of these bacteria, as horizontal transmission of the pathogen between cattle and workers has been reported and associated with occupational infections (Lim et al., 2013).

The appearance of MRSA strains is the result of the modification of the action site that is mediated by the *Staphylococcus* chromosomal cassettes (SCCmec). It is estimated that the acquisition of SCCmec occurred in the early 1960s and this acquisition is considered a determining event in the evolution of this bacterial genus, as it results in multidrug-resistant isolates, mainly beta-lactam (Crisostomo et al., 2001).

The action of beta-lactams on *Staphylococcus* spp. occurs through binding with Penicillin-Binding Proteins (PBP), resulting in the lysis of bacterial cells. Currently, twelve types of SCCmec are known, and all of them with the exception of type XI, have *mecA* that encodes a PBP called PBP2a, resulting in a reduced affinity for this class of antimicrobials (Lee et al., 2018). Such encoding allows *Staphylococcus* spp. to maintain its biosynthesis, even at concentrations considered to be inhibitory to these drugs (Paterson et al., 2014).

SCCmec type XI is the only carrier of *mecC* responsible for encoding the PBP2aLGA protein, which has a mechanism of action similar to that of SCCmec carriers of *mecA*. However, the level of resistance depends on some factors such as *mecC* itself and other genetic determinants present in the isolate (Kim et al., 2012).

The first description of *mecC* was made by García-Álvarez et al. (2011) in a study on the epidemiology of bovine mastitis in England. A strain of *S. aureus* was identified which had phenotypic characteristics of MRSA and was named *S. aureus* LGA251. This strain had a phenotypic resistance profile, but it tested negative for *mecA* in PCR, and the results of the genome showed that it had a gene homologous to *mecA* (approximately 60% identical), receiving the name *mecALGA251* (García-Álvarez et al., 2011). Since its first description, the identification of *mecC*-harboring MRSA has increased, mainly in Europe; so far, there are no reports of *mecC*-harboring MRSA in the American continent (Paterson et al., 2014).

The aim of this study was to report the first confirmed *mecC*-harboring MRSA from bovine origin in Brazil and perform genomic epidemiological analysis by means of whole genome sequencing (WGS).

Material and methods

Study design and microbial isolation

This study was approved by the Animal Use Ethics Committee of the Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, Brazil (license number 106/2017) and the Research Ethics Committee of the Universidade de Pernambuco (UPE), Recife, Brazil (CAAE number: 88030518.0.0000.5207).

The study was carried out in a bovine dairy herd in Pernambuco state, Northeastern Brazil. Samples from raw milk ($n = 335$), palm hands ($n = 15$), and nasal ($n = 15$) swabs from milkers, teat cup swabs ($n = 14$) and milking bucket swabs ($n = 9$) were collected. Microbial isolation was performed in standard 5% sheep blood agar, followed by incubation at 37°C for 24/48 h. After this period, initial microbial identification was performed by means of Gram staining, catalase, coagulase, oxidase and mannitol fermentation (Carter, 1998).

Determination of minimum inhibitory concentration (MIC)

Isolates were subjected to a broth microdilution assay to assess their resistance to methicillin, according to the protocol described by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2018). Oxacillin was used as a reference antimicrobial at concentrations of 16, 8, 4 (cut-off), 2, 1, and 0.5 µg/mL and the *S. aureus* LGA251 strain was used as a positive control.

DNA extraction and PCR reactions

The genomic DNA of all *Staphylococcus* isolates were extracted as previously described by Fan; Kleven and Jackwood (1995) and quantified using a spectrophotometer.

S. aureus was identified by PCR targeting *nuc* using the protocol described by Brakstad et al. (1992), while the PCR assay targeting *mecC* was performed according to Paterson et al. (2012a). Detailed information on the primers used in the PCR assays are shown in **Table 1**. PCR reactions were performed in a final volume of 12.5 µL, consisting of 100 ng of DNA template, 0.5 µL of each primer at 10 pmol, 6.25 µL of Taq DNA polymerase (Go Taq Green Master Mix, Promega Corporation, Madison, USA) and 2.5 µL of ultrapure Milli-q water. The PCR reaction products were submitted to a 2% agarose gel electrophoresis for 60 minutes at 100 V and stained (BlueGreen, LGC Biotechnology, São Paulo, Brazil) for visualization under ultraviolet light. *S. aureus* LGA251 was used as a positive control in all PCR reactions.

Table 1. Target genes, primer sequences, and estimated amplicon sizes

Target gene	Primer sequences		Amplicon size (pb)
<i>nuc</i>	F	GCGATTGATGGTGATACGGTI	270
	R	AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC	
<i>mecC</i>	F	CATTAATCAGAGCGAGGC	188
	R	TGGCTGAACCCATTTTTGAT	

Genotypic confirmation Genotyping of *mecC*-harboring MRSA isolates by REP-PCR

The positive isolates for *mecC* were submitted to repetitive element palindromic-polymerase chain reaction (Rep-PCR) for genotyping using the primer RW3A (TCGCTCAAACAACGACACC). Rep-PCR was performed according to the methodology described by Van Der Zee et al. (1999). After the reactions, the products were submitted to electrophoresis in a 2% agarose gel for 60 minutes at 100 V. At the end of the run, the gels were stained with BlueGreen (LGC Biotechnology) and visualized under ultraviolet light and photo-documented, to assess the genotypic profile. The similarity dendrogram was produced with a commercial package (BioNumerics, Applied Maths, version 7.1) based on the Jaccard index using UPGMA algorithm (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages) with a 1% tolerance program based on Jaccard.

Whole genome sequencing (WGS)

All *mecC*-positive isolates showed the same clonal profile in genotyping and we chose one of these isolates for the complete genome sequencing. DNA extraction was performed with the DNA soil power kit (MOBIL®), following the manufacturer's protocol. Genomic DNA was subjected to fluorometric quantification in Qubit (LifeTechnologies, Carlsbad, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. DNA libraries were prepared using the Nextera XT library preparation kit (Illumina, San Diego, CA, USA). Fragment sizes were evaluated using a capillary electrophoresis system (Fragment Analyzer, Agilent, Germany) and samples sequenced on MiSeq equipment (Illumina, Carlsbad, CA, USA) using a v3 cartridge (2 × 300 cycles in pairs).

Genome assembly, annotation and bioinformatics

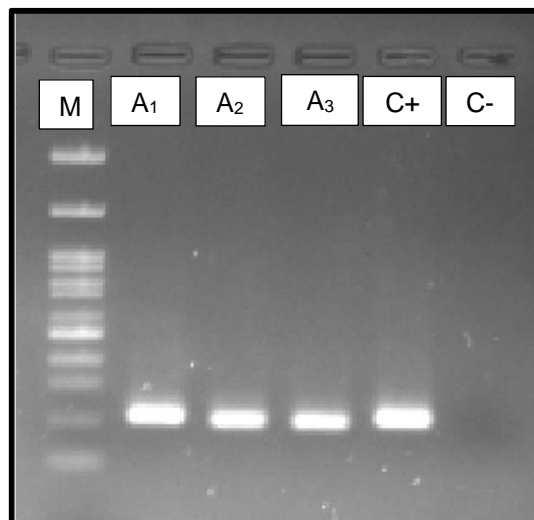
The readings generated were visualized in FastQC version 0.11.8 (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>) to evaluate the need to perform a quality filter or cut in the genome. The removal of strings with a Phred quality score of less than 20, using the Trimmomatic-0.38 software was performed. For reassembly, SPAdes v 1.3.1 was used.

The generated contigs were submitted to automatic annotation by RAST. In addition, virulence (Joensen et al., 2014) and resistance genes (Zankari et al., 2012), resistance mechanisms (Jia et al., 2017), the presence of plasmids (Carattoli et al., 2014), Multilocus Sequence Typing (MLST) (Larsen et al., 2012) and MRSA.

Results

Overall, 162 *Staphylococcus* spp. were identified: 115 in milk, 12 in nasal swabs, 13 in hand swabs, 14 in liners, and 8 in milking buckets). *nuc* was identified in 64 (39.5%) *S. aureus* isolates (43 in milk, 8 in nasal swabs, 2 in hand swabs, 4 in liners, and 7 in milking pails). *mecC* was detected in 3/64 (4.68%) *S. aureus* isolates (**Figure 1**), and the distribution by source is shown in Table 2.

Figure 1. Amplification of *mecC* fragments in *S. aureus* isolated from cow's milk with mastitis, milkers and milking utensils.



Legends: **Column M:** 100 pb molecular weight marker; **Column C-:** Negative control; **Column C+:** Positive control; **Columns A1 to A3:** Samples with positive results.

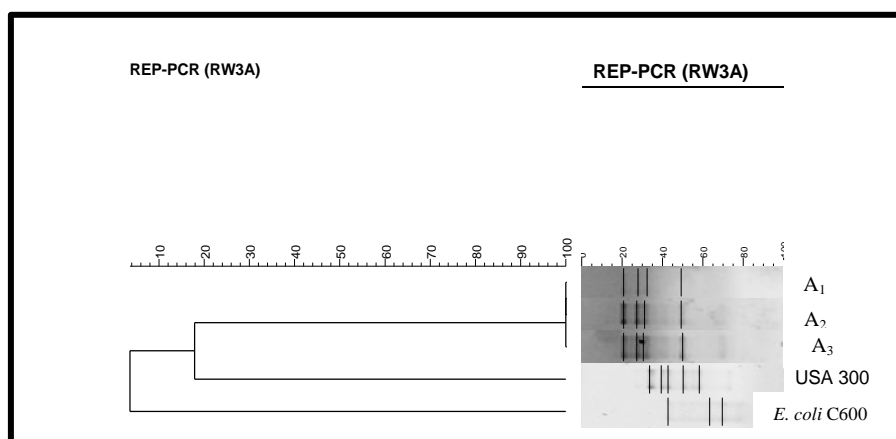
Table 2. Frequency of *Staphylococcus aureus mecC* positive in milk, milkers and Milking buckets in dairy farms in Northeast Brazil.

Sample	MRSA ¹
Milk	1/43 (2.3%)
Milkers hands swab	1/2 (50 %)
Milking buckets	1/7 (14.3%)

¹MRSA - Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

At MIC, all *mecC*-harboring MRSA isolates were resistant at the cut-off point to oxacillin (4 µg/mL) as determined by CLSI (2018). The rep-PCR identified the same clonal profile shared by the three isolates of *S. aureus* with *mecC*. Figure 2 shows the Dendrogram of the Rep-PCR profiles generated from the UPGMA algorithm.

Figure 2. Dendrogram of Rep-PCR profiles generated from the UPGMA algorithm (*Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages*).



Legends: **A1 to A3:** Samples tested, **USA 300:** Reference strain of *Staphylococcus aureus*; ***E. coli* C600:** Reference strain of *Escherichia coli* C600.

The sequencing generated 2795108 reads, with 417.7x of coverage. After assembly, 47 contigs with N50 of 644499 were obtained and through automatic annotation. The main structural elements of the genome were identified as CDs (2706), rRNAs (10) and rRNAs (59). In addition, *mecC* annotated with the product name penicillin binding protein 2 (PBP2a) was identified through the Uniprot database.

Table 3 indicates a summary of the genes present in the genome of the investigated strain based on *in silico* prediction, allowing its identification as *S.*

aureus ST 126 and spa type t605. In addition, the *rep24b* plasmidial gene was detected. Among the resistance mechanisms, genes related to the multidrug efflux system (*arlR*, *mepR*, *lmrS*, *norA*, and *mgrA*) and to the antibiotic inactivation (PC1 beta-lactamase (*blaZ*) and *FosB*) were identified.

Regarding virulence determinants, genes producing exoenzymes (*aur*, *splA*, *splB* and *splE*) and toxins (*hlgA*, *hlgB*, *hlgC*, *lukD* and *lukE*) were identified.

In addition, nine proteins (*femA*, B, C and D, *FmtA*, *HmrB*, *LytH*, *FmtB* and *HmrA*) related to methicillin resistance were identified.

Table 3. Genomic and epidemiological features of the *mecC* *Staphylococcus aureus* strain

Features	<i>Staphylococcus aureus</i>	Genes
Genome size (Mb)	2.7	
CDS's	2706	
rRNA's	10	
tRNA's	59	
MLST (ST/CG) ¹	126	
spaType	t605	
Plasmids ²	<i>rep24b</i>	
Resistome		
Virulence genes ³	Beta-lactam	<i>blaZ</i>
	Exoenzyme genes	<i>aur</i> , <i>splA</i> , <i>splB</i> and <i>splE</i>
	Toxin genes	<i>hlgA</i> , <i>hlgB</i> , <i>hlgC</i> , <i>lukD</i> and <i>lukE</i>
Resistance mechanisms ⁴ and SNP models	Enterotoxin gene	<i>sea</i>
	Antimicrobial resistance based on homology	
	Multidrug efflux	<i>arlR</i> , <i>mepR</i> , <i>lmrS</i> , <i>norA</i> and <i>mgrA</i>
	Antibiotic inactivation	PC1 beta-lactamase (<i>blaZ</i>), <i>FosB</i>

¹ MLST 2.0 (Multi-Locus Sequence Typing), ² PlasmidFinder, ³ VirulenceFinder; ResFinder, ⁴ CARD.

Discussion

Since its discovery by García-Álvarez et al. (2011), the identification of *mecC*-harboring MRSA has increased, mainly in Europe. To date, there are no reports of the detection of *mecC* in Brazil. This result is quite worrying, as it

demonstrates the circulation of multi-resistant bacteria in the agricultural environment from different sources (milk, milkers, and milking tools). Horizontal transmission of the pathogen between cattle and workers has been reported, suggesting that contact between humans and animals may favor the transmission of MRSA strains (Lim et al., 2013).

The Rep-PCR results revealed that the isolates showed an indistinguishable genotype pattern, suggesting that the identified *mecC*-harboring MRSA strains have clonal origin. The presence in milk samples suggests that there is breast colonization by the bacteria, since the sequence type 126 is associated with ruminants, with frequent identification in samples of raw milk (Dittmann et al., 2017). It has also been identified in cases of bovine mastitis in Brazil, however in these studies the isolates did not have *mecC* (Rocha et al., 2019). Thus, it can be inferred that the strain found in this study is of animal origin and, possibly, disseminated to milkers and milking tools.

In addition, spaType t605 has also been identified in *S. aureus*, causing bovine mastitis. Strains with ST126 and t605 complexes have already been associated with persistence and transmission of the pathogen in dairy herds (Aires-De-Sousa et al., 2007), a fact that may explain the identification of *S. aureus* ST126 in different sources (milk, milkers, and milking tools) in this study.

The genome analysis of the *S. aureus* ST126 strain also identified the presence of the rep24b plasmid gene. Some strains of MRSA have shown genes from the family replication initiating genes (rep) and, according to Lozano et al. (2012), there is a direct relationship between the number of rep and the high capacity to capture plasmids of MRSA strains. The rep24b type has already been identified in *S. aureus* from human clinical samples. However, its detection in strains of animal origin is not frequent (Xie et al., 2019). This result may indicate an atypical genetic profile of the circulating strain in this region.

The exoenzymes present in the strain *S. aureus* ST126 aureolysin (aur) and serine proteases (splA, splB and splE) have been identified in *Staphylococcus* spp. of cattle (Naushad et al., 2019). Basically, they act by neutralizing the immune system, damaging the host's tissue and degrading complex macromolecules that are used as nutrients by the pathogen (Arnosti, 2011). The detection of these four genes demonstrates a virulent profile of the

strain isolated in this study, which can hamper *mecC* - MRSA control measures in Brazil.

hlgA, *hlgB*, *hlgC*, *lukD* and *lukE* encode the alpha, beta, delta, gamma hemolysin and leukocidin toxins, Luk ED (Dinges et al., 2000). In our study, they were present in a strain isolated from different sources (milk, milkers, and milking tools), corroborating with the literature that reports the presence of this gene in *S. aureus* isolated from milk and farm environment (da Costa et al., 2014). These toxins have a determining role in triggering staphylococcal infections, in addition to being considered important virulence factors (Hoseini Alfatemi et al., 2014). The combination of these factors associated with the host's immune system results in the ability of *S. aureus* to cause intramammary infections with varying degrees of impairment, from increases in somatic cell counts to mild to severe clinical signs (da Costa et al., 2014).

Enterotoxins comprise another important type of virulence factor of *Staphylococcus* spp. and they are frequently identified in MRSA (Rabelo et al., 2014). It was possible to identify, in the sequenced strain, *sea* that encodes enterotoxin A, which is considered one of the classic enterotoxins, owing to its participation in several cases of staphylococcal poisoning (Holzer et al., 1995). This finding is interesting because, although it has already been reported, the identification of *sea* in strains of *S. aureus* of bovine origin, as identified in this study, is not common, as this gene is generally related to strains of human origin (Mahato et al., 2017). The presence of *sea* in the sequenced strain represents a serious risk to public health, because if it is expressed and enterotoxin A is ingested, it may trigger acute gastroenteritis in humans (Le Loir et al., 2003).

The genome analysis of the *S. aureus* ST126 strain revealed the presence of *norA*, *arlR*, *mgrA*, *mepR*, and *lmrS* from multi-drug efflux systems. *norA* is responsible for resistance to quinolones and its expression is regulated by *arlR* and *mgrA*. The first acts on mechanisms involved in the adhesion, autolytic, and proteolytic activity of *S. aureus* and the second is considered a negative regulator of *norA*, being able to reduce its transcription by 2 to 3 times (Phillips-Jones and Harding, 2018). *mepR* is also a regulator of quinolone efflux systems in *S. aureus*, acting specifically on the expression of *mepA*, which is considered a transcriptional repressor that has self-regulatory activity (Jang,

2016). *ImrS* belongs to Major Facilitator Superfamily (MFS), as well as *norA* and also confer resistance to quinolones (Phillips-Jones and Harding, 2018). The results confirm that this strain has molecular mechanisms of resistance to quinolones. If these genes are expressed, antimicrobial multi-resistant phenotypes can be observed (Costa et al., 2013).

In addition to the virulence factors mentioned above, two mechanisms of inactivation of antimicrobials were also found, PC1 beta-lactamase, which inactivates beta-lactams and FosB, responsible for inactivating fosfomycin (Song et al., 2019). The detection of more of these mechanisms helps to characterize the profile of the strain, demonstrating the range of antimicrobials to which it is resistant.

The chromosome coding sequence annotation analysis identified the proteins femA, B, C, and D as well as FmtA, FmtB, HmrA HmrB and LytH. FemA and B proteins form glycine interpeptide bridges; femC and D act as a glutamine synthetase repressor and producer of phosphoglucosamine mutase EC 5.4.2.10, respectively; FmtA affects cell wall cross-linking and amidation; FmtB is involved in the biosynthesis of methicillin resistance; HmrA, is involved in the amidohydrolase of the M40 family; HmrB produces the acyl carrier protein; LytH, produces N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase, domain EC 3.5.1.28. All are related to methicillin resistance and have already been identified in MRSA strains (Boissy et al., 2011).

Conclusions

This study describes the occurrence of a strain of *mecC*-harboring MRSA in the agricultural environment in Brazil. Genome analysis of this strain allowed its characterization and the identification of several virulence factors. It is important to carry out further studies for the detection and monitoring of *mecC*-harboring MRSA in Brazil to understand the epidemiology of antimicrobial-resistant strains in the country.

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Acknowledgements

To the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for granting research grants to the first author.

References

- Aires-De-Sousa, M., Parente, C.E.S.R., Vieira-Da-Motta, O., Bonna, I.C.F., Silva, D.A., De Lencastre, H., 2007. Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolates from Buffalo, Bovine, Ovine, and Caprine Milk Samples Collected in Rio de Janeiro State, Brazil. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 3845–3849. doi:10.1128/AEM.00019-07
- Arnosti, C., 2011. Microbial Extracellular Enzymes and the Marine Carbon Cycle. *Ann. Rev. Mar. Sci.* 3, 401–425. doi:10.1146/annurev-marine-120709-142731
- Boissy, R., Ahmed, A., Janto, B., Earl, J., Hall, B.G., Hogg, J.S., Pusch, G.D., Hiller, L.N., Powell, E., Hayes, J., Yu, S., Kathju, S., Stoodley, P., Post, J.C., Ehrlich, G.D., Hu, F.Z., 2011. Comparative supragenomic analyses among the pathogens *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae* Using a modification of the finite supragenome model. *BMC Genomics* 12, 187. doi:10.1186/1471-2164-12-187
- Brakstad, O.G., Aasbakk, K., Maeland, J.A., 1992. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the nuc gene. *J. Clin. Microbiol.* 30, 1654–60.
- Carattoli, A., Zankari, E., Garcíá-Fernández, A., Larsen, M.V., Lund, O., Villa, L., Aarestrup, F.M., Hasman, H., 2014. In Silico detection and typing of plasmids using plasmidfinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 3895–3903. doi:10.1128/AAC.02412-14
- Carter, G. R. 1988. Fundamentos de bacteriologia e micologia veterinária. Editora Roca, p.197-198.
- CLSI, 2018. PerforCLSI. (2018). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Clinical and Laboratory Standards Institute. Retrieved

- from www.clsi.org Mance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing.,
Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing.
- Costa, S.S., Viveiros, M., Amaral, L., Couto, I., 2013. Multidrug Efflux Pumps in *Staphylococcus aureus*: an Update. *The Open Microb J.*, 7, 59-71.
- Crisostomo, M.I., Westh, H., Tomasz, A., Chung, M., Oliveira, D.C., de Lencastre, H., 2001. The evolution of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: Similarity of genetic backgrounds in historically early methicillin-susceptible and -resistant isolates and contemporary epidemic clones. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 9865–9870. doi:10.1073/pnas.161272898
- da Costa, L., Rajala-Schultz, P., Hoet, A., Seo, K., Fogt, K., Moon, B., 2014. Genetic relatedness and virulence factors of bovine *Staphylococcus aureus* isolated from teat skin and milk. *J. Dairy Sci.* 97, 6907–6916. doi:10.3168/jds.2014-7972
- Dinges, M.M., Orwin, P.M., Schlievert, P.M., 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Rev.* 13, 16–34. doi:10.1128/CMR.13.1.16
- Dittmann, K.K., Chaul, L.T., Lee, S.H.I., Corassin, C.H., de Oliveira, C.A.F., De Martinis, E.C.P., Alves, V.F., Gram, L., Oxaran, V., 2017. *Staphylococcus aureus* in some Brazilian dairy industries: Changes of contamination and diversity. *Front. Microbiol.* 8, 1–12. doi:10.3389/fmicb.2017.02049
- García-Álvarez, L, Lindsay, H, Webb, C R, Maskell, D J, Holmes VetMB, M.A., Brooks, K, Pickard, D J, Parkhill, J, Bentley, S D, J Brown, D F, Curran, M D, Kearns, A M, Pichon, B, Holmes, M.A., García-Álvarez, Laura, G Holden, M.T., Lindsay, Heather, Webb, Cerian R, J Brown, Derek F, Curran, Martin D, Walpole, E., Brooks, Karen, Pickard, Derek J, Teale, C., Parkhill, Julian, Bentley, Stephen D, Edwards, G.F., Kirsty Girvan, E., Kearns, Angela M, Pichon, Bruno, R Hill, R.L., Rhod Larsen, A., Skov, R.L., Peacock, S.J., Maskell, Duncan J, 2011. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *Artic. Lancet Infect Dis* 11, 595–603. doi:10.1016/S1473
- Holzer, Ursula, Bethge, Wolfgang, Krull Johannes Ihle, F., Handgretinger Ralph Reisfeld, R.A., Dohlsten, Mikael, Kalland Dietrich Niethammer, T., Dannecker, G.E., Holzer, U, Bethge, W, Krull, F., Ihle, J., Handgretinger

- Niethammer -G E Dannecker Z, R.D., Dohlsten -T Kalland Pharmacia, M., Dohlsten, M, Kalland, T., Reisfeld, R.A., 1995. Superantigen-staphylococcal-enterotoxin.A-dependent and antibody-targeted lysis of GD2-positive neuroblastoma cells. *Cancer Immunol Immunother* 41, 129–136.
- Hoseini Alfatemi, S.M., Motamedifar, M., Hadi, N., Sedigh Ebrahim Saraie, H., 2014. Analysis of Virulence Genes Among Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Strains. *Jundishapur J. Microbiol.* 7, 1–10. doi:10.5812/jjm.10741
- Jang, S., 2016. Multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus* and their clinical implications. *J. Microbiol.* 54, 1–8. doi:10.1007/s12275-016-5159-z
- Jia, B., Raphenya, A.R., Alcock, B., Waglechner, N., Guo, P., Tsang, K.K., Lago, B.A., Dave, B.M., Pereira, S., Sharma, A.N., Doshi, S., Courtot, M., Lo, R., Williams, L.E., Frye, J.G., Elsayegh, T., Sardar, D., Westman, E.L., Pawlowski, A.C., Johnson, T.A., Brinkman, F.S.L., Wright, G.D., McArthur, A.G., 2017. CARD 2017: Expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Res.* 45, D566–D573. doi:10.1093/nar/gkw1004
- Joensen, K.G., Scheutz, F., Lund, O., Hasman, H., Kaas, R.S., Nielsen, E.M., Aarestrup, F.M., 2014. Real-time whole-genome sequencing for routine typing, surveillance, and outbreak detection of verotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 52, 1501–1510. doi:10.1128/JCM.03617-13
- Kim, C., Milheiriço, C., Gardete, S., Holmes, M.A., Holden, M.T.G., de Lencastre, H., Tomasz, A., 2012. Properties of a Novel PBP2A Protein Homolog from *Staphylococcus aureus* Strain LGA251 and Its Contribution to the β -Lactam-resistant Phenotype. *J. Biol. Chem.* 287, 36854–36863. doi:10.1074/jbc.M112.395962
- Larsen, M. V, Cosentino, S., Rasmussen, S., Friis, C., Hasman, H., Lykke, R., Jelsbak, L., Sicheritz-Pontén, T., Ussery, D.W., Aarestrup, F.M., Lund, O., 2012. Multilocus Sequence Typing of Total-Genome-Sequenced Bacteria. doi:10.1128/JCM.06094-11
- Le Loir, Y., Baron, F., Gautier, M., 2003. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet. Mol. Res.* 2, 63–76.
- Lee, A.S., de Lencastre, H., Garau, J., Kluytmans, J., Malhotra-Kumar, S., Peschel, A., Harbarth, S., 2018. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

- Nat. Rev. Dis. Prim. 4, 18033. doi:10.1038/nrdp.2018.33
- Lim, S.-K., Nam, H.-M., Jang, G.-C., Lee, H.-S., Jung, S.-C., Kim, T.-S., 2013. Transmission and Persistence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Milk, Environment, and Workers in Dairy Cattle Farms . Foodborne Pathog. Dis. 10, 731–736. doi:10.1089/fpd.2012.14367
- Mahato, S., Mistry, H.U., Chakraborty, S., Sharma, P., Saravanan, R., Bhandari, V., 2017. Identification of Variable Traits among the Methicillin Resistant and Sensitive Coagulase Negative Staphylococci in Milk Samples from Mastitic Cows in India. Front. Microbiol. 8, 1446. doi:10.3389/fmicb.2017.01446
- Naushad, C., Naqvi, S.A., Nobrega, S.A., Luby, D., Kastelic, C.P., Barkema, J.P., Buck, D., 2019. Comprehensive virulence gene Profiling of Bovine Non- aureus Staphylococci Based on Whole-Genome Sequencing Data. mSystems,4, 98–116. doi:10.1128/mSystems.00098-18
- Paterson, G.K., Larsen, A.R., Robb, A., Edwards, G.E., Pennycott, T.W., Foster, G., Mot, D., Hermans, K., Baert, K., Peacock, S.J., Parkhill, J., Zadoks, R.N., Holmes, M.A., 2012. The newly described *mecA* homologue, *mecALGA251*, is present in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from a diverse range of host species. J. Antimicrob. Chemother. 67, 2809–2813. doi:10.1093/jac/dks329
- Paterson, G.K., Morgan, F.J.E., Harrison, E.M., Peacock, S.J., Parkhill, J., Zadoks, R.N., Holmes, M.A., 2014. Prevalence and properties of *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in bovine bulk tank milk in great britain. J. Antimicrob. Chemother. 69, 598–602. doi:10.1093/jac/dkt417
- Phillips-Jones, M.K., Harding, S.E., 2018. Antimicrobial resistance (AMR) nanomachines-mechanisms for fluoroquinolone and glycopeptide recognition, efflux and/or deactivation. Biophysical Reviews. 10, 347-362. doi:10.1007/s12551-018-0404-9
- Rabelo, M.A., Neto, A.M.B., Loibman, S.O., da Costa Lima, J.L., Ferreira, E.L., Leal, N.C., Maciel, M.A.V., 2014. The occurrence and dissemination of methicillin and vancomycin-resistant *Staphylococcus* in samples from patients and health professionals of a university hospital in Recife, State of Pernambuco, Brazil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 47, 437–446.

- doi:10.1590/0037-8682-0071-2014
- Rocha, L.S., Silva, D.M., Silva, M.P., Vidigal, P.M.P., Silva, J.C.F., Guerra, S.T., Ribeiro, M.G., Mendes, T.A. de O., Ribon, A. de O.B., 2019. Comparative genomics of *Staphylococcus aureus* associated with subclinical and clinical bovine mastitis. PLoS One 14, e0220804. doi:10.1371/journal.pone.0220804
- Song, Z., Wang, X., Zhou, X., Jiang, S., Li, Y., Ahmad, O., Qi, L., Li, P., Li, J., 2019. Taxonomic Distribution of FosB in Human-Microbiota and Activity Comparison of Fosfomycin Resistance. Front. Microbiol. 10, 1–10. doi:10.3389/fmicb.2019.00200
- Truong-Bolduc, Q.C., Zhang, X., Hooper, D.C., 2003. Characterization of NorR Protein, a Multifunctional Regulator of norA Expression in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. 185, 3127–3138. doi:10.1128/JB.185.10.3127-3138.2003
- Van Der Zee, A., Verbakel, H., Van Zon, J.C., Frenay, I., Van Belkum, A., Peeters, M., Buiting, A., Bergmans, A., 1999. Molecular genotyping of *Staphylococcus aureus* strains: Comparison of repetitive element sequence-based PCR with various typing methods and isolation of a novel epidemicity marker. J. Clin. Microbiol. 37, 342–349.
- Xie, G., Cheng, Q., Daligault, H., Davenport, K., Gleasner, C., Jacobs, L., Kubicek-Sutherland, J., LeCuyer, T., Otieno, V., Raballah, E., Mukundan, H., Perkins, D.J., McMahon, B., Doggett, N., 2019. Genome Sequences of a *Staphylococcus aureus* Clinical Isolate, Strain SMA0034-04 (UGA22), from Siaya County Referral Hospital in Siaya, Kenya. Microbiol. Resour. Announc. 8, 4–6. doi:10.1128/MRA.01627-18
- Zankari, E., Hasman, H., Cosentino, S., Vestergaard, M., Rasmussen, S., Lund, O., Aarestrup, F.M., Larsen, M.V., 2012. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. J. Antimicrob. Chemother. 67, 2640–2644. doi:10.1093/jac/dks261

8. ARTIGO 4

Antimicrobial activity of polypyrrole nanoparticles and aqueous extract of *Moringa oleifera* against *Staphylococcus* spp. carriers of multi-drug efflux system genes

(Artigo formatado para o periódico Journal of Dairy Science)

Antimicrobial activity of polypyrrole nanoparticles and aqueous extract of *Moringa oleifera* against *Staphylococcus* spp. carriers of multi-drug efflux system genes

José Givanildo da Silva^{a*}, Mariana de Barros^b, Nataly Diniz de Lima Santos^c, Patrícia Maria Gudes Paiva^c, Thiago Henrique Napoleão^c, Maria José de Sena^a, Maria Aparecida Scatamburlo Moreira^b, Rinaldo Aparecido Mota^a

^aLaboratório de Doenças Infectocontagiosas dos Animais Domésticos, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CP 52171-900, Recife, Pernambuco, Brazil.

^bLaboratório de Doenças Bacterianas, Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Campus UFV, Centro, CP 36570-900, Viçosa, MG, Brazil.

^cLaboratório de Bioquímica de Proteínas, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Professor Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, CP 50670-901, Recife, Pernambuco, Brazil.

*Corresponding author. Tel.: +55 81 3320 6427/6425. E-mail address: givanildojgs@gmail.com.

ABSTRACT

Antimicrobial resistance has forced researchers to identify relevant genetic components and develop alternatives to the use of affected drugs. The aims of this study were to identify genes of the multi-drug efflux system and to evaluate the antimicrobial activities of polypyrrole nanoparticles (PPy-NPs) and aqueous extract of *Moringa oleifera* against *Staphylococcus* spp. isolated from dairy farms in Northeast Brazil. Initially, 162 *Staphylococcus* spp. isolates were subjected to *in vitro* antimicrobial sensitivity tests. Of these, 35 presented antimicrobial multi-drug resistance phenotypes. These 35 isolates were then referred for the detection of *norA*, *norB*, *norC*, *msrA*, *mgrA*, *tet-38*, and *ImrS* genes, all of which feature in multi-drug efflux systems. In the isolates carrying the genes, the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) of PPy-NPs and *Moringa oleifera* aqueous extract were determined. In the molecular analysis of the 35 isolates *norA*,

norC, *tet-38*, and *msrA* genes were detected and for the other genes (*norB*, *lmrS* and *mgrA*) there was no amplification. In MIC and MBC, antimicrobial activity was verified of PPy-NPs and aqueous extract *Moringa oleifera* in *Staphylococcus* spp. carrying multi-drug efflux system genes. MIC and MBC for PPy-NPs and aqueous *Moringa oleifera* extract were verified. Therefore are multi-drug efflux system genes are present in *Staphylococcus* spp. from the agricultural environment in the state of Pernambuco. Aqueous extract of *Moringa oleifera* and PPy-NPs both showed bactericidal activity against the *Staphylococcus* isolates tested.

Keywords: resistance, antimicrobials, mastitis, agricultural environment, alternative therapies.

INTRODUCTION

Staphylococcus spp. Is the highest cause of contagious mastitis in bovine species, with antibiotic therapy the main form of treatment. However, the indiscriminate use of antimicrobials has encouraged the emergence of multi-drug-resistant isolates (Lin et al., 2015).

Mechanisms of *Staphylococcus* spp. resistance include, enzyme production, the modification of the drug target and multi-drug efflux systems (Costa et al., 2013; Kumar et al., 2013). Multi-drug efflux systems comprise of cytoplasmic proteins that are involved in the extrusion of toxic agents from inside the bacteria to the external environment. They are encoded in chromosomes or plasmids and perform active transport of the antimicrobial agent out of the cell (Projan et al., 2005; Micas, 2008). In this way, they prevent the drug from reaching inhibitory concentrations inside the cell. In *Staphylococcus* spp., more than 20 efflux systems classified into five families of membrane proteins have already been identified: the major facilitator superfamily (MFS), the small multidrug resistance family, the multidrug and toxin extrusion family, the ATP-binding cassette (ABC) superfamily, and the resistance-nodulation-division superfamily (Truong-Bolduc et al., 2006; Kumar et al., 2013; Jang, 2016).

The activity of the multi-drug efflux systems is related to three mechanisms: elimination of endogenous metabolites harmful to the cell, secretion of virulence determinants, and responses to cellular stress (Poole, 2008). As such, the drugs can be defined as "accidental substrates" of these transporters. However, the ability of multi-drug efflux systems to expel antimicrobials, both synthetic and natural, presents problems when treating infections, especially those caused by the highly pathogenic *Staphylococcus* spp (Projan et al., 2005).

The emergence of antimicrobial resistance has stimulated research into possible alternatives for the affected drugs, such as polymers and herbal medicines (Peixoto et al., 2016; Sanchez Ramirez et al., 2019).

The objective of this study was to detect multi-drug efflux system genes in *Staphylococcus aureus* and *S. non-aureus* spp. in bovine mastitis, milkers, and in the milking environment. The second objective was to evaluate the antimicrobial activity of polypyrrole nanoparticles (PPy-NPs) and aqueous extract of *Moringa oleifera* seed against these *Staphylococcus* spp.

MATERIAL AND METHODS

Ethics committee.

This study was approved by the Animal Use Ethics Committee of the Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brazil (license number 106/2017) and by the Research Ethics Committee of the Universidade de Pernambuco, Recife, Brazil (CAAE number: 88030518.0.0000.5207).

Staphylococcus spp. isolates

Five dairy farms (A, B, C, D and E) located in different regions state of Pernambuco, Northeastern Brazil, were included in the present study. Milk samples collected from 676 udder quarters were subjected to the California Mastitis Tests (CMT) and those that were equal to or greater than one cross (+) (319 samples) or found positive in the routine strip cup test (16 samples) were selected for microbiological testing. Also, samples from dairy environment (mechanical milking equipment and milking buckets) and milkers (hands and nasal cavities) were obtained by using swabs and subjected to microbiological

analysis. Of the five farms studied, two used mechanical milking; in these farms, swabs were collected from the teat sets (forming pools of each equipment). In the three farms that performed manual milking, swabs were collected from the buckets used for milking. The hygiene practices adopted during a milking were also visually evaluated.

A total of 15 samples of milk and hand swabs from milkers, 14 samples from teat taps and nine samples of milking buckets were obtained. The distribution by farm of the collected samples is described in table 1. All samples were transported under refrigeration to the laboratory, where microbiological and molecular analyses were performed.

2.3. Isolation and preliminary identification of *Staphylococcus* spp.

Isolation of *Staphylococcus* spp. was performed by direct plating of all samples on manitol salt agar, followed by incubation at 37°C for 24-48 h. Then, isolated colonies were subjected to Gram staining technique to check morphology, catalase test, coagulase, and sugar fermentation (Carter, 1998).

Susceptibility to antimicrobials

Staphylococcus spp. underwent *in vitro* antimicrobial sensitivity tests using the disk diffusion technique on Mueller-Hinton agar (CLSI, 2018). The following antibiotic-impregnated discs were used: oxacillin (1 µg), cefoxitin (30 µg), sulfamethoxazole (25 µg) + trimethoprim (25 µg), penicillin G (10 U), neomycin (30 µg), tetracycline (30 µg), gentamycin (10 µg), and vancomycin (30 µg). After 24 h incubation at 37 °C, the diameters of the inhibition zones were interpreted according to guidelines established by the manufacturer.

Molecular analysis

Isolates of *S. aureus* and *S. non-aureus* that showed resistance to at least two drugs were selected for molecular analysis. Genomic DNA was extracted by thermal extraction as described by Fan, Kleven, and Jackwood (1995). The DNA obtained was quantified using a spectrophotometer with readings at 260 nm absorbance.

Detection of the nuc gene to identify S. aureus

To identify *S. aureus*, all isolates underwent amplification of the *nuc* gene region according to Brakstad et al. (1992).

Detection of efflux system genes in S. aureus and S. non-aureus

For detection of *norA*, *norB*, *norC*, *msrA*, *mgrA*, *tet-38*, and *lmrS* genes, all *Staphylococcus* spp. underwent PCR following the methodologies described in table 1.

The reactions for all genes contained a final volume of 12.5µL arranged as follows: 100ng of isolated DNA, 0.5µL of each primer at 10pmol (table 1), 6.25 µL of Go Taq Green Master Mix (Promega Corporation, Madison, USA), and 2.5µL of Milli-Q ultrapure water. To check the amplification, 10µL of each reaction was submitted to electrophoresis in 2% agarose gel stained with BlueGreen, for 60 min at 100 V. Gels were then visualized under ultraviolet light and photo-documented.

As a positive control, *S. aureus* strains 5EUFV and SE21D from the Laboratory of Bacterial Diseases of the Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brazil, were also used in the PCR reactions.

Table 1. Genes, oligonucleotide sequences and size of amplified fragments.

Gene	Sequence	Fragment Size (pb)	References
<i>lmrS</i>	TAAAGTTGAATTAACAAC GCGGATCCTTAAAATTC	180	(FLOYD et al. (2010)
<i>norA</i>	TGCAATTTTCATATGATCAATCCC AGATTGCAATTCATGCTAAATATT	150	(TRUONG-BOLDUC; ZHANG; HOOPER, 2003)
<i>norB</i>	ATAAGGTAAGATAACTAGCA ATCTCTATTTGCCTCCCTATA	150	(TRUONG-BOLDUC; STRAHILEVITZ; HOOPER, 2006)
<i>norC</i>	ATAAATACCTGAAGCAACGCCAAC AAATGGTTCTAAGCGACCAA	200	(TRUONG-BOLDUC; STRAHILEVITZ; HOOPER, 2006)
<i>Tet-38</i>	TTCAGTTTGGTTATAGACAA CGTAGAAATAAATCCACCTG	200	(TRUONG-BOLDUC et al., 2005)
<i>mgrA</i>	CGAATTCATTCATGATT AAAGTTGATTGTTTATTAA	200	(TRUONG-BOLDUC et al., 2005)
<i>msrA</i>	TCCAATCATTGCACAAAATC AATCCCTCTATTTGGTGGT	890	(MARTINEAU et al., 2000)

PCR products were purified after amplification and were submitted to sequenced bidirectionally using the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing

kit (Applied Biosystems, USA). After complete editing, contigs were submitted to BLAST of the GenBank database through the NCBI website in order to identify species.

Determination of the minimum inhibitory concentration

The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of PPy-NPs in water and *Moringa oleifera* aqueous extract were determined using the broth microdilution methodology following recommendations of the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2018).

For PPy, 1.08 g of sodium dodecyl sulfate was solubilized in 100 mL Milli-Q water, and then added to 500 μ L of pyrrole (0.483 g). The resulting suspension was kept under intense stirring for 45 min. Following this, an aqueous suspension (50 mL) of ammonium persulfate (0.256 g) was slowly added dropwise and stirred for further 35 min. The resulting suspension of PPy-NPs with a concentration of 2 mg/mL of solute was maintained at 4 °C for 24 h.

PPy-NPs in water (Kang et al., 2005) (2 mg/mL) was diluted 1:2 with Mueller-Hinton broth (Mueller-Hinton Broth (MGB) SIGMA-ALDRICH) that had been inoculated with the isolates. The concentrations of PPy-NPs tested were 2 mg/mL, 1 mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.250 mg/mL, 0.125 mg/mL, and 0.062 mg/mL. The microdilutions were incubated on plates kept at 35 °C for 20 h. DO readings were performed at 600 nm using the ELISA microplate reader (Multiskan Go Thermo Scientific) for two time points (0 h and 20 h). MIC was defined as the lowest concentration of PPy-NPs in water that inhibited more than 75% of the bacterial growth. MBC was defined as the minimum concentration that resulted in inactivation of 99% of bacterial cells. MBC was determined using the plate-plating method with Mueller-Hinton agar, not observing visible bacterial growth.

Moringa oleifera seeds were collected at Recife (Pernambuco, Brazil), powdered using a blender, and stored at -20 °C. A voucher specimen is deposited under number 73,345 at the herbarium *Dárdano de Andrade Lima* from the *Instituto Agrônômico de Pernambuco* (Recife). The plant collection was authorized (no. 38690) by the *Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade* (ICMBio) from the Brazilian Ministry of Environment.

The extract was prepared by homogenization of seed flour (10 g) with distilled water (100 mL) for 16 h at 4 °C using a magnetic stirrer. The mixture was filtered through a gauze and centrifuged (3000 × g, 15 min). The supernatant corresponded to the extract. Protein concentration was determined according to Lowry et al. (1951), using a standard curve of bovine serum albumin (31.25–500 µg/mL). The extract was evaluated for hemagglutinating activity as described in the next section.

The presence of lectins was monitored through the HA assay, which evaluates the functionality of the carbohydrate-binding sites of these proteins. The assay was performed in 96-well microtiter plates (Kartell S.P.A., Italy) according to Paiva and Coelho (1992), using a suspension (2.5%, v/v) in 0.15 M NaCl of rabbit erythrocytes treated with glutaraldehyde (Bing et al., 1967). The erythrocytes were collected after approval by the Ethics Committee on Animal Use of the *Universidade Federal de Pernambuco* (process 23076.033782/2015-70). Finally, HA was quantified as the reciprocal of the highest dilution of sample that promoted full agglutination of erythrocytes. Specific hemagglutinating activity was defined as the ratio between HA and protein concentration (mg/mL).

Aqueous *Moringa oleifera* seed extract was used at initial concentrations of 6.1 mg/mL, 3.05 mg/mL, 1.525 mg/mL, 0.7625 mg/mL, 0.3812 mg/mL, and 0.1906 mg/mL. The conditions for incubation, reading, and determination of MIC and MBC are as described in the previous paragraph.

To prepare the inoculum, *S. aureus* isolates were cultured in plates with a non-selective solid medium (Mueller-Hinton Agar, Sigma-Aldrich) and incubated at 37 °C for 24 h. The isolated colonies were suspended in 0.9% saline solution until reaching turbidity equivalent to the 0.5 McFarland standard; (approximately 1×10^8 CFU/mL; equivalent to an optical density of 0.08-0.13 at 625 nm). Subsequently, MGB was inoculated with the bacterial suspension at a final bacterial concentration of approximately 5×10^5 CFU/mL. The samples were processed in triplicate, with 100 µL deposited in each well of a 96-well microplate. *S. aureus* N315 and *S. epidermidis* ATCC 12228 strains were used as controls.

RESULTS

In this study, 162 *Staphylococcus* spp. were isolated from a sample collected from dairy farms in the state of Pernambuco, Brazil. The results of isolation, molecular identification of *Staphylococcus aureus* and non-*aureus* samples from milk, milkers, and milking utensils are shown in **Table 2**

Table 2. Isolation, molecular identification of *Staphylococcus* spp. samples from milk, milkers, and milking utensils

Sample	n ¹	Isolation of <i>Staphylococcus</i> spp. ²	Molecular identification of <i>Staphylococcus</i> spp. ³	
			<i>S. aureus</i>	Sna ⁴
Milk	335	115/335 (34,3%)	43/115 (37,4 %)	72/115 (62,6 %)
Milkers hand swab	15	12/ 15 (80%)	8/12 (66.6%)	4/12 (33.3%)
Milkers nasal swab	15	13/15 (86.6%)	2/13 (15.3%)	11/13 (84.7%)
Teat cup swab	14	14/14 (100%)	4/14 (28.5%)	10/14 (71.5%)
Milking bucket swab	9	8/9 (88.8%)	7/8 (87.5%)	1/8 (12.5%)

¹Samples collected. ²Based on phenotypical characteristics. ³Based on PCR for *nuc*. ⁴ *Staphylococcus non-aureus*.

In the antimicrobial susceptibility test, 35/162 (21.6%) *Staphylococcus* spp. Isolates, 23/35 (65.7%) *S. aureus* and 12/35 (34.3%) *S. non-aureus*, were resistant to at least two antimicrobials. In the molecular analysis of these isolates, *norA*, *norC*, *tet-38*, and *msrA* genes were all observed (table 3).

Table 3. Frequency of multi-drug efflux system genes in *Staphylococcus aureus* and *S. non-aureus* isolated from milk, environment and milkers from dairy farms in Pernambuco, Brazil.

Gene	Molecular identification		
	Total	<i>S. aureus</i>	<i>S. non-aureus</i>
<i>norA</i>	74.3% (26/35)	65.4% (17/26)	34.6 (9/26)
<i>norB</i>	0% (0/35)	-	-
<i>norC</i>	74.3% (26/35)	69.2% (18/26)	30.8 (8/26)
<i>tet-38</i>	51.4% (18/35)	72.2% (13/18)	27.8% (5/18)
<i>lmrS</i>	0% (0/35)	-	-
<i>mgrA</i>	0% (0/35)	-	-
<i>msrA</i>	40% (14/35)	35.7% (5/14)	64.3% (9/14)

In the table 4 shows the of the efflux system genes in *Staphylococcus aureus* and non-*aureus* according to origin.

Tabela 4. Frequency of the efflux system genes in *Staphylococcus aureus* according to origin.

Gene	Milk		Milkers nasal swab		Milkers Hands swab		Teat cup		Milking buckets		Total
	SA	SNA	SA	SNA	SA	SNA	SA	SNA	SA	SNA	
	<i>norA</i>	68.8% (11/16)	31,2% (5/16)	100% (1/1)	0% (0/1)	33.3% (1/3)	77.7% (2/3)	50% (2/4)	50% (2/4)	100% (2/2)	
<i>norC</i>	64.7% (11/17)	35.3% (6/17)	66.6% (2/3)	33.3% (1/3)	100% (1/1)	0% (0/1)	66.6% (2/3)	33.3% (1/3)	100% (2/2)	0% (0/2)	26
<i>tet-38</i>	77.8% (7/9)	22.2% (2/9)	66.6% (2/3)	33.3% (1/3)	-	-	60% (3/5)	40% (2/5)	100% (1/1)	-	18
<i>msrA</i>	0% (0/2)	100% (2/2)	25 % (1/4)	75% (3/4)	33.3% (1/3)	66.6% (2/3)	50% (3/6)	50% (3/6)	-	-	14

Legends: SA-*Staphylococcus aureus*; SNA-*Staphylococcus non-aureus*

The extract showed a specific HA of 32, indicating the presence of lectins. The sees of *M. oleifera* contain a water-soluble lectin called (WSMoL), which was previously reported to have antibacterial effects (Moura et al., 2015; Moura et al., 2017; Coriolano et al., 2020). Previous assays revealed the presence of flavonoids, tannins, saponins, phenylpropanoids, alkaloids, and reducing sugars in the extract (unpublished data).

The results of the antimicrobial activity aqueous *Moringa oleifera* seed extract's of against *Staphylococcus* spp. carrying multi-drug efflux system genes are presented in table 5. Table 6 shows the antimicrobial activity of polypyrrole nanoparticles against *Staphylococcus* spp. carrying multi-drug efflux system genes.

Table 5. Distribution by MIC of the aqueous extract of *Moringa oleifera* against *Staphylococcus* spp. carriers of *norA*, *norC*, *tet-38* and *msrA* isolated from milk, milkers and dairy farm environment.

MIC	<i>norA</i>					<i>norC</i>					<i>Tet-38</i>					<i>msrA</i>				
	M	HS	SN	TC	MB	M	HS	SN	TC	MB	M	HS	SN	TC	MB	M	HS	SN	TC	MB
6.1 mg/mL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.05 mg/mL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1/1 (100%)	-	2/3 (66.6%)	-	-	-
1.525 mg/mL	4/16 (25%)	1/1 (100%)	1/3 (33.3%)	1/4 (25%)	1/2 (50%)	3/16 (18.7%)	-	-	2/4 (50%)	2/2 (100%)	1/9 (11.1%)	-	2/3 (66.6%)	2/5 (40%)	-	-	1/3 (33.3%)	1/4 (25%)	2/6 (33.3%)	-
0.7625 mg/mL	5/16 (31.2%)	-	1/3 (33.3%)	3/4 (75%)	-	5/16 (31.2%)	-	3/3 (100%)	-	-	2/9 (22.2%)	-	-	1/5 (20%)	-	1/2 (50%)	-	-	2/6 (33.3%)	-
0.3812 mg/mL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1/3 (33.3%)	-	-	-	-	-	-	-
0.1906 mg/mL	-	-	1/3 (33.3%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1/4 (25%)	-	-
Não inibidos	7/16 (43.75%)	-	-	-	1/2 (50%)	8/16 (50%)	1/1 (100%)	-	2/4 (50%)	-	6/9 (66.7%)	-	-	2/5 (40%)	-	1/2 (50%)	-	2/4 (50%)	2/6 (33.3%)	-

Legend: M- milk; HS - hands swab; SN- nasal swab; TC- Teat cup; MB- Milking buckets

Table 6. Distribution by MIC of the aqueous extract of polypyrrole nanoparticles (PPy-NPs) against *Staphylococcus* spp. carriers of *norA*, *norC*, *tet-38* and *msrA* isolated from milk, milkers and dairy farm environment.

MIC	<i>norA</i>					<i>norC</i>					<i>Tet-38</i>					<i>msrA</i>				
	M	HS	SN	TC	MB	M	HS	SN	TC	MB	M	HS	SN	TC	MB	M	HS	SN	TC	MB
0,125 mg/mL	7/16 (43,7%)	1/1 (100%)	3/3 (100%)	4/4 (100%)	1/2 (50%)	7/16 (43,7%)	-	3/3 (100%)	2/4 (50%)	2/2 (100%)	2/9 (22,2%)	-	3/3 (100%)	3/5 (60%)	1/1(100 %)	1/2 (50%)	3/3 (100%)	2/4 (50%)	3/6 (50%)	-
0,062 mg/mL	1/16 (6,2%)	-	-	-	1/2 (50%)	1/16 (6,2%)	-	-	-	-	1/9 (11,1%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Não inibidos	8/16 (50%)	-	-	-	-	8/16 (50%)	1/1 (100%)	-	2/4 (50%)	-	6/9 (66,7%)	-	-	2/5 (40%)	-	1/2 (50%)	-	2/4 (50%)	3/6 (50%)	-

Legends: M- milk; HS - hands swab; SN- nasal swab; TC- Teat cup; MB- Milking buckets

DISCUSSION

In this study *norA*, *norC*, *tet-38*, and *msrA* were detected. The first three belong to MFS, the family with the largest number of studies in the context of staphylococci (Jang, 2016); *MsrA* belongs to the ABC family (Martineau et al., 2000). These results indicate the circulation of isolates with molecular mechanisms of resistance to quinolones, tetracyclines, erythromycin, and macrolides in the studied farms. Once the detected genes confer resistance to these antimicrobials and, if they are expressed, multiresistance can be observed (Chi Truong-Bolduc et al., 2003; Deng et al., 2012; Duran et al., 2012; Kumar et al., 2013; Phillips-Jones and Harding, 2018).

Most frequently observed were the *norA* and *norC* genes (table 3), both of which are responsible for quinolone resistance, followed by *tet-38*, which confers resistance to tetracyclines. These findings might reflect the frequent use of these antimicrobials to treat mastitis at the farms. Their use has likely contributed to the selection pressure for the emergence of resistant isolates (Hawkey, 2008).

Regarding isolates origin, milk samples gave the highest percentages of target genes. The exception was *msrA*, which was prevalent in the liners and milkers (table 4). This indicates a role for isolates with an efflux system in the etiology of bovine mastitis in the Northeast region of Brazil. This has been previously reported in Egypt (Elsayed et al., 2019). The *msrA* gene supports resistance to erythromycin and macrolides, which are not antimicrobials of choice for mastitis. This explains why it was detected more frequently in isolates from liners (utensil manipulated by humans), nasal swabs, and milkers' hands (Truong-Bolduc et al., 2005; Jang, 2016; Pereira and Scussel, 2017).

The detection of multi-drug efflux system genes in *Staphylococcus* spp. demonstrates that there is variability in the genetic components of resistance in the studied region. It is therefore pertinent to establish alternatives to the affected drugs, such as plant compounds with antibacterial activity such as *Moringa oleifera*, and chemical compounds such as PPy-NPs.

At all concentrations except 6.1 mg/mL, aqueous *Moringa oleifera* extract showed activity for at least one isolate. Greatest inhibition was found at concentrations of 1.525 mg/mL and 0.7625 mg/mL. This inhibitory effect was due to aqueous *Moringa oleifera* extract's bactericidal activity at these concentrations; this

was verified by MBC testing. However, only *msrA*-carrying isolates were 100% inhibited, which indicates better bactericidal activity against *Staphylococcus* carriers of this gene.

Moringa oleifera (family *Moringaceae*) is a tree grown in tropical and subtropical regions (Pontual et al., 2012). Its seeds are used to treat and reduce the turbidity of water intended for human consumption. In addition, its flowers are consumed and have hypoglycemic, tonic, and diuretic therapeutic actions (Moura et al., 2011; Santos et al., 2012). It also has larvicidal activity against *Aedes aegypti* and is antiparasitic against *Trypanosoma cruzi* (Pontual et al., 2012; 2018). Furthermore, it has technological potential in the food industry, due to its caseinolytic activity and milk-coagulating effects (Pontual et al., 2012).

No previous studies have evaluated the antimicrobial activity of aqueous *Moringa oleifera* extract against *Staphylococcus* spp. isolated from the agricultural environment. This makes it difficult to establish comparative parameters for the results obtained but also indicates this study's novelty. However, there are reports of *Moringa oleifera*'s activity against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* (Viera et al., 2010; Moura et al., 2011; Marrufo et al., 2013; Zaffer et al., 2014; Fayemi et al., 2018; Fouad et al., 2019), which corroborate this study.

These results with aqueous *Moringa oleifera* extract are promising, however, further studies are needed to identify the active components and to develop medicines (Moura et al., 2011). Although there is no clear mechanism, there is evidence that the plant's antimicrobial activity is related to a wide spectrum of bactericidal substances produced by the plant (Kostova and Dinchev, 2005; Viera et al., 2010).

For PPy-NPs, it was possible to determine MIC at two concentrations, 0.125 mg/mL and 0.062 mg/mL (table 6), the first of which delivered the greatest inhibition. The bactericidal activity of PPy-NPs at these concentrations was responsible for the inhibitory effect found in the tests to determine MBC.

The results differ from those obtained with the aqueous *Moringa oleifera* extract, where there was variability in inhibition across the concentrations. However, PPy-NPs did not inhibit all isolates with the four detected genes, indicating a narrower range of activity compared to the aqueous *Moringa oleifera* extract.

PPy is a polymer obtained through the oxidative chemical or electrochemical polymerization of monomer solutions (Sajesh et al., 2013). It is used in engineering

and biomedical sciences (de Oliveira and de Oliveira, 2014; Xue et al., 2014). The antimicrobial activity of PPy against *Staphylococcus aureus*, as well as other gram-positive and -negative bacteria has already been reported (Sayyah et al., 2014; da Silva et al., 2017). No other reports have investigated *Staphylococcus* spp. isolated from the agricultural environment.

Unlike aqueous *Moringa oleifera* extract, in PPy the mechanism responsible for antimicrobial activity has been elucidated. The polymer causes collapse of the cytoplasmic membrane resulting in bacterial death (Varesano et al., 2013; Sanchez Ramirez et al., 2019). This study demonstrates that PPy-NPs could be used as an alternative to traditional antimicrobials. For this to occur, it is necessary to carry out further studies aimed at drug development.

CONCLUSION

We have shown that there are genes from multi-drug efflux systems in *Staphylococcus* spp. isolated from the agricultural environment in Northeast Brazil. Aqueous *Moringa oleifera* extract and PPy-NPs both showed bactericidal activity against these isolates carrying multi-drug efflux system genes.

ACKNOWLEDGMENTS

To the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for granting research grants to the first author.

REFERENCES

- Brakstad, O. G.; Aasbakk, K.; Maeland, J. A., 1992. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the nuc gene. *Journal of clinical microbiology* 30, p. 1654–1660.
- Chi Truong-Bolduc, Q., Zhang, X., Hooper, D.C., 2003. Characterization of NorR Protein, a Multifunctional Regulator of norA Expression in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 185, 3127–3138. doi:10.1128/JB.185.10.3127-3138.2003
- CLSI, 2018. PerforCLSI. (2018). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Clinical and Laboratory Standards Institute. Retrieved from www.clsi.org Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing.,

Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing.

- Coriolano, M.C., Brito, J.S., Ferreira, G.R.S., Moura, M.C., Melo, C.M.L., Soares, A.K.A., Lorena, V.M.B., Figueiredo, R.C.B.Q., Paiva, P.M.G., Napoleão, T.H., Coelho, L.C.B.B., 2020. Antibacterial lectin from *Moringa oleifera* seeds (WSMoL) has differential action on growth, membrane permeability and protease secretory ability of Gram-positive and Gram-negative pathogens. *South African Journal of Botany*. doi: 10.1016/j.sajb.2019.06.014
- Costa, S.S., Viveiros, M., Amaral, L., Couto, I., 2013. Multidrug Efflux Pumps in *Staphylococcus aureus*: an Update.
- da Silva, F.A.G., Alcaraz-Espinoza, J.J., da Costa, M.M., de Oliveira, H.P., 2017. Synthesis and characterization of highly conductive polypyrrole-coated electrospun fibers as antibacterial agents. *Compos. Part B Eng.* 129, 143–151. doi:10.1016/j.compositesb.2017.07.080
- de Oliveira, A.H.P., de Oliveira, H.P., 2014. Carbon nanotube/ polypyrrole nanofibers core–shell composites decorated with titanium dioxide nanoparticles for supercapacitor electrodes. *J. Power Sources* 268, 45–49. doi:10.1016/j.jpowsour.2014.06.027
- Deng, X., Sun, F., Ji, Q., Liang, H., Missiakas, D., Lan, L., He, C., 2012. Expression of Multidrug Resistance Efflux Pump Gene *norA* Is Iron Responsive in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 194, 1753–1762. doi:10.1128/JB.06582-11
- Duran, N., Ozer, B., Duran, G.G., Onlen, Y., Demir, C., 2012. Antibiotic resistance genes & susceptibility patterns in staphylococci. *Indian J. Med. Res.* 135, 389–96.
- Elsayed, M.S.A.E., Roshdey, T., Salah, A., Tarabees, R., Younis, G., Eldeep, D., 2019. Phenotypic and genotypic methods for identification of slime layer production, efflux pump activity, and antimicrobial resistance genes as potential causes of the antimicrobial resistance of some mastitis pathogens from farms in Menoufia, Egypt. *Mol. Biol. Rep.* 46, 6533–6546. doi:10.1007/s11033-019-05099-6
- Fan, H. H., S. H. Kleven, and M. W. Jackwood. 1995. Application of polymerase chain reaction with arbitrary primers to strain identification of *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Dis.* 39:729–735
- Fayemi, O.E., Ekennia, A.C., Katata-Seru, L., Ebokaiwe, A.P., Ijomone, O.M., Onwudiwe, D.C., Ebenso, E.E., 2018. Antimicrobial and Wound Healing

- Properties of Polyacrylonitrile-Moringa Extract Nanofibers. ACS Omega 3, 4791–4797. doi:10.1021/acsomega.7b01981
- Fouad, E.A., Abu Elnaga, A.S.M., Kandil, M.M., 2019. Antibacterial efficacy of Moringa oleifera leaf extract against pyogenic bacteria isolated from a dromedary camel (*Camelus dromedarius*) abscess. Vet. World 12, 802–808. doi:10.14202/vetworld.2019.802-808
- Hawkey, P.M., 2008. The growing burden of antimicrobial resistance. J. Antimicrob. Chemother. 62 Suppl 1, 1–9. doi:10.1093/jac/dkn241
- Jang, S., 2016. Multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus* and their clinical implications. J. Microbiol. 54, 1–8. doi:10.1007/s12275-016-5159-z
- Kang, T. S.; Lee, S. W.; Joo, J.; Lee, J. Y. Electrically conducting polypyrrole fibers spun by 256 electrospinning. Synthetic Met., v. 153, n. 1, p. 61-64 2005.
- Kostova, I., Dinchev, D., 2005. Saponins in Tribulus terrestris – Chemistry and Bioactivity. Phytochem. Rev. 4, 111–137. doi:10.1007/s11101-005-2833-x
- Kumar, S., Mukherjee, M.M., Varela, M.F., 2013. Modulation of Bacterial Multidrug Resistance Efflux Pumps of the Major Facilitator Superfamily. Int. J. Bacteriol. 2013, 1–15. doi:10.1155/2013/204141
- Lin, J., Nishino, K., Roberts, M.C., Tolmasky, M., Aminov, R.I., Zhang, L., 2015. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. Front. Microbiol. 6, 1–3. doi:10.1038/nrmicro3380.
- Lowry O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. The Journal of Biological Chemistry. 193, 265–275.
- Moura, M.C., Napoleão, T.H., Coriolano, M.C., Paiva, P.M.G., Figueiredo, R.C.B.Q., Coelho, L.C.B.B., 2015. Water-soluble *Moringa oleifera* lectin interferes with growth, survival and cell permeability of corrosive and pathogenic bacteria. Journal of Applied Microbiology. 119, 666-676.
- Moura, M.C., Trentin, D.S., Napoleão, T.H., Primon-Barros, M., Xavier, A.S., Carneiro, N.P., Paiva, P.M.G., Macedo, A.J., Coelho, L.C.B.B., 2017. Multi-effect of the water-soluble *Moringa oleifera* lectin against *Serratia marcescens* and *Bacillus* sp.: antibacterial, antibiofilm and anti-adhesive properties. Journal of Applied Microbiology. 123, 861-874.
- Marrufo, T., Nazzaro, F., Mancini, E., Fratianni, F., Coppola, R., De Martino, L., Agostinho, A.B., De Feo, V., 2013. Chemical composition and biological activity

- of the essential oil from leaves of *Moringa oleifera* Lam. cultivated in Mozambique. *Molecules* 18, 10989–11000. doi:10.3390/molecules180910989
- Martineau, F., Lansac, N., Me, C., Roy, P.H., Ouellette, M., Bergeron, M.G., 2000. Correlation between the Resistance Genotype Determined by Multiplex PCR Assays and the Antibiotic Susceptibility Patterns of. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 231–238.
- Micas, A.F.D., 2008. Avaliação da atividade bactericida e bacteriostática da violaceína. Universidade Estadual de Campinas.
- Moura, M.C., Pontual, E. V., Gomes, F.S., Napoleão, T.H., Xavier, H.S., Paiva, P.M.G., Coelho, L.C.B.B., 2011. Preparations of *Moringa Oleifera* flowers to treat contaminated water, in: *Advances in Environmental Research*. pp. 269–285.
- Paiva P.M.G., Coelho L.C.B.B., 1992. Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (camaratu bean). *Applied Biochemistry Biotechnology* 36, 113–118.
- Peixoto, R.D.M., Silva, W.E.L.E., Almeida, J.R.G.S., Branco, A., Costa, M.M. DA, 2016. Antibacterial potential of native plants from the caatinga biome against *Staphylococcus* spp. isolates from small ruminants with mastitis. *Rev. Caatinga* 29, 758–763. doi:10.1590/1983-21252016v29n328rc
- Pereira, M.N., Scussel, V.M., 2017. Resíduos de antimicrobianos em leite bovino: fonte de contaminação, impactos e controle. *Rev. Ciências Agroveterinárias* 16, 170–182. doi:10.5965/223811711622017170
- Phillips-Jones, M.K., Harding, S.E., 2018. Antimicrobial resistance (AMR) nanomachines-mechanisms for fluoroquinolone and glycopeptide recognition, efflux and/or deactivation. doi:10.1007/s12551-018-0404-9
- Pontual, Emmanuel Viana, Napoleão, T.H., Dias de Assis, C.R., de Souza Bezerra, R., Xavier, H.S., Navarro, D.M. do A.F., Coelho, L.C.B.B., Paiva, P.M.G., 2012. Effect of *Moringa oleifera* flower extract on larval trypsin and acetylcholinesterase activities in *Aedes aegypti*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 79, 135–152. doi:10.1002/arch.21012
- Pontual, Emmanuel V., Carvalho, B.E.A., Bezerra, R.S., Coelho, L.C.B.B., Napoleão, T.H., Paiva, P.M.G., 2012. Caseinolytic and milk-clotting activities from *Moringa oleifera* flowers. *Food Chem.* 135, 1848–1854. doi:10.1016/j.foodchem.2012.06.087
- Pontual, E. V., Pires-Neto, D.F., Fraige, K., Higino, T.M.M., Carvalho, B.E.A., Alves,

- N.M.P., Lima, T.A., Zingali, R.B., Coelho, L.C.B.B., Bolzani, V.S., Figueiredo, R.C.B.Q., Napoleão, T.H., Paiva, P.M.G., 2018. A trypsin inhibitor from *Moringa oleifera* flower extract is cytotoxic to *Trypanosoma cruzi* with high selectivity over mammalian cells. *Nat. Prod. Res.* 32, 2940–2944. doi:10.1080/14786419.2017.1389932
- Poole, K., 2008. Bacterial Multidrug Efflux Pumps Serve Other Functions. *Microbe* 3, 179–185. doi:10.1128/microbe.3.179.1
- Projan, S.J., Strahilevitz, J., Dunman, P.M., Hooper, D.C., Truong-Bolduc, Q.C., 2005. MgrA Is a Multiple Regulator of Two New Efflux Pumps in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 187, 2395–2405. doi:10.1128/jb.187.7.2395-2405.2005
- Sajesh, K.M., Jayakumar, R., Nair, S. V., Chennazhi, K.P., 2013. Biocompatible conducting chitosan/polypyrrole–alginate composite scaffold for bone tissue engineering. *Int. J. Biol. Macromol.* 62, 465–471. doi:10.1016/j.ijbiomac.2013.09.028
- Sanchez Ramirez, D.O., Varesano, A., Carletto, R.A., Vineis, C., Perelshtein, I., Natan, M., Perkash, N., Banin, E., Gedanken, A., 2019. Antibacterial properties of polypyrrole-treated fabrics by ultrasound deposition. *Mater. Sci. Eng. C* 102, 164–170. doi:10.1016/j.msec.2019.04.016
- Santos, A.F.S., Paiva, P.M.G., Coelho, L.C.B.B., 2012. *Moringa oleifera*: a multipurpose tree with water coagulant seed proteins, in: *Advances in Environmental Research*. pp. 393–401.
- Sayyah, S.M., Mohamed, F., Shaban, M., 2014. Antibacterial activity of nano fabricated polypyrrole by cyclic voltammetry. *IOSR J. Appl. Chem.* 7, 11–15. doi:10.9790/5736-07211115
- Truong-Bolduc, Q.C., Dunman, P.M., Strahilevitz, J., Projan, S.J., Hooper, D.C., 2005. MgrA Is a Multiple Regulator of Two New Efflux Pumps in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 187, 2395–2405. doi:10.1128/JB.187.7.2395-2405.2005
- Truong-Bolduc, Q.C., Strahilevitz, J., Hooper, D.C., 2006. NorC, a new efflux pump regulated by MgrA of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 1104–1107. doi:10.1128/AAC.50.3.1104-1107.2006
- Truong-Bolduc, Q.C., Zhang, X., Hooper, D.C., 2003. Characterization of NorR Protein, a Multifunctional Regulator of norA Expression in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 185, 3127–3138. doi:10.1128/JB.185.10.3127-3138.2003
- Varesano, A., Vineis, C., Aluigi, A., Rombaldoni, F., Tonetti, C., Mazzuchetti, G.,

2013. Antibacterial efficacy of polypyrrole in textile applications. *Fibers Polym.* 14, 36–42. doi:10.1007/s12221-013-0036-4
- Viera, G.H.F., Mourão, J.A., Ângelo, Â.M., Costa, R.A., Vieira, R.H.S. dos F., 2010. Antibacterial effect (in vitro) of *Moringa oleifera* and *Annona muricata* against Gram positive and Gram negative bacteria. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 52, 129–132. doi:10.1590/S0036-46652010000300003
- Xue, K., Zhou, S., Shi, H., Feng, X., Xin, H., Song, W., 2014. A novel amperometric glucose biosensor based on ternary gold nanoparticles/polypyrrole/reduced graphene oxide nanocomposite. *Sensors Actuators B Chem.* 203, 412–416. doi:10.1016/j.snb.2014.07.018
- Zaffer, M., Ahmad, S., Sharma, R., Mahajan, S., Gupta, A., Agnihotri, R.K., 2014. Antibacterial activity of bark extracts of *Moringa oleifera Lam.* against some selected bacteria. *Pak. J. Pharm. Sci.* 27, 1857–1862.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos neste estudo, considera-se que:

- Há disseminação de *Staphylococcus aureus* e *S. não-aureus* resistentes a meticilina no ambiente de fazendas leiteiras no estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil.
- *mecA*-MRSA detectado apresenta dois perfis clonais distintos. O primeiro inclui isolados de amostras humanas e ambiental e outro formado exclusivamente por isolados de leite, sendo que este último compartilha uma maior correlação genética, confirmando a circulação desses isolados entre as fazendas leiteiras.
- Foi detectada a primeira cepa de MRSA portadora de *mecC* no ambiente agropecuário no Brasil e esta possui vários fatores de virulência e de patogenicidade.
- Os genes de sistemas de efluxo multidrogas estão presentes em *Staphylococcus aureus* e *S. não-aureus* de ambiente agropecuário podendo contribuir para os fenótipos de multirresistência.
- O extrato aquoso de *Moringa oleifera* e do PPy apresentam atividade bactericida frente a isolados de *Staphylococcus* spp. portadores de genes de sistemas de efluxo multidrogas. Os resultados obtidos são promissores quanto a utilização de ambos como alternativa ao uso de antimicrobianos. Devido a emergência da resistência a antimicrobianos, o estudo de alternativas ao uso dessas drogas deve ser fomentado.
- É imprescindível a coleta de amostras de outras fontes como utensílios de ordenha e ordenhadores para avaliar a circulação de isolados de *Staphylococcus aureus* e *S. não-aureus* e elucidar sua participação na mastite bovina.
- Além da higiene de tetos é importante conscientizar os envolvidos na ordenha quanto a implementação de práticas eficazes para higienização de utensílios e ordenhadores.
- As autoridades de saúde humana e animal precisam trabalhar em conjunto para implementar programas efetivos que reduzam a utilização de

antimicrobianos no ambiente agropecuário, principalmente de betalactâmicos, quinolonas e tetraciclina.