

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

Avaliação de fatores de risco para resistência múltipla a antimicrobianos em bactérias da glândula mamária do gado de leite em sete regiões do Brasil

WALDEMIR SANTIAGO NETO

PORTO ALEGRE

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

Autor: Waldemir Santiago Neto\*

Dissertação apresentada como requisito parcial  
para obtenção do grau de Mestre em Ciências  
Veterinárias, especialidade na área de Epidemi-  
ologia, Saneamento e Profilaxia.

Orientador: Dr. Luís Gustavo Corbellini

PORTO ALEGRE

2015

---

\* Médico Veterinário

### CIP - Catalogação na Publicação

Santiago Neto, Waldemir

Avaliação de fatores de risco para resistência múltipla a antimicrobianos em bactérias da glândula mamária do gado de leite em sete regiões do Brasil / Waldemir Santiago Neto. -- 2015.  
98 f.

Orientador: Luis Gustavo Corbellini.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Epidemiologia Veterinária. 2. Gado leiteiro. 3. Resistência a antimicrobianos. 4. Staphylococcus sp.. 5. Modelo Misto. I. Corbellini, Luis Gustavo, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

**Waldemir Santiago Neto**

**Avaliação de fatores de risco para resistência múltipla a antimicrobianos em bactérias da glândula mamária do gado de leite em sete regiões do Brasil.**

Aprovado em 02 de março de 2015

APROVADO POR

---

Dr. Luís Gustavo Corbellini

Orientador e Presidente da Comissão

APROVADO POR

---

Dra. Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso

Membro da Comissão

APROVADO POR

---

Dr. Mauro Riegert Borba

Membro da Comissão

APROVADO POR

---

Dra. Vanessa B. Leotti Torman

Membro da Comissão

## AGRADECIMENTOS

Aos bons professores que acreditam no seu trabalho como força modificadora e integradora da humanidade. À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e à Faculdade de Veterinária. Obrigado àqueles que me formaram.

A todos os membros da ‘Preventiva’, que buscam e deixam algum conhecimento, obrigado pela harmonia e pelas conversas animadas. Ao meu orientador, professor PhD L. G. Corbellini, pelas oportunidades e exemplos de excelência. Aos colegas e amigos do Epilab, pelas discussões descontraídas e pelo exemplo de profissionais que são. Às professoras PhD Marisa R. I. Cardoso, Maria Aparecida V. P. Brito e Suzi Camey pelas contribuições atenciosas neste trabalho.

Aos meus amigos e irmãos, Nicole, Miojo, Tony, Marcel, EasyTaci, Bing, Beto, Braga, Arthur, Rafael, Caxias, Dorna, Alexandre, Chico, Sílvio, Raul e toda a galera que me acompanha no caminho: *valeu pela parceria, tamo junto!*

Em especial, à memória de minhas avós, Zilda, sempre gentil e serena, Josefina, a “madrinha”, divertida e doce, obrigado pelos seus ensinamentos e pela simplicidade com que viveram, sempre ajudando a todos. Aos Henz de Fortaleza, Ricardo, Augusta e Arthur, obrigado pela acolhida. À memória de Márcia, guerreira que nos acompanha. Aos meus tios, Madalena e João, obrigado pelo carinho e zelo. Ao meu irmão Philip, obrigado pela parceria e lealdade. Ao meu pai, Waldemir, pelos conselhos. À Verônica, amiga e amante, pelas últimas primaveras. À minha mãe, Isabel, por tudo.

Amo muito todos vocês e me orgulha compartilhar o presente ao lado de pessoas maravilhosas e inspiradoras.

A todos, meu respeito e apreço.

# Avaliação de fatores de risco para resistência múltipla a antimicrobianos em bactérias da glândula mamária do gado de leite em sete regiões do Brasil

Autor: Waldemir Santiago Neto

Orientador: Luís Gustavo Corbellini

## RESUMO

Estafilococos têm sido relatados como os agentes mais prevalentes de mastite bovina. Este grupo bacteriano pode transportar múltiplos elementos de resistência provenientes inclusive de outras populações bacterianas, tornando-se um grande problema de saúde pública, uma vez que também está envolvido em vários processos de doença em humanos, incluindo infecções da pele e dos tecidos moles, septicemia, osteomielite e pneumonia. A caracterização do perfil de resistência dos estafilococos aos antimicrobianos é importante para controlar a sua disseminação. O presente trabalho avaliou a distribuição de multirresistência entre mais de 3.500 isolados de um estudo transversal repetido, realizado entre 2010 e 2011 nas principais regiões produtoras de leite do Brasil. As bactérias foram classificadas de acordo com métodos fenotípicos e os padrões de resistência antimicrobiana foram determinados pelo teste de difusão em disco ao invés de testes moleculares e ensaios quantitativos. Para avaliar os principais fatores relacionados à variável resposta – proporção de bactérias resistentes a três ou mais classes de antimicrobianos, ou multirresistência – diversas variáveis explicativas foram acessadas por meio de um questionário epidemiológico. Um modelo misto foi construído com um componente aleatório multinível, a saber, a variação de multirresistência entre as bacias leiteiras (segundo nível) e a variação das propriedades em cada bacia (primeiro nível) durante os quatro momentos de amostragem, ou seja, a variação *entre-sujeitos* e *intra-sujeitos*, respectivamente. A avaliação dos perfis de resistência revelou que as penicilinas, seguidas por tetraciclina e sulfonamida, foram os antimicrobianos com menor eficácia em estafilococos (n = 3009). Estafilococos coagulase negativa parecem ter semelhanças com *S. aureus* e alguns outros estafilococos coagulase positiva testados, demonstrando um padrão de grupo com moderada resistência a múltiplas drogas. Ilustrativamente, alguns estreptococos (n = 480) também foram submetidos a testes de suscetibilidade a antimicrobianos, os quais mostraram moderada a alta resistência à tetraciclina, gentamicina e clindamicina. O modelo misto indicou que o tratamento de mastite feito de imediato, a aplicação de terapia antimicrobiana pelo próprio produtor ao invés de um veterinário, e a interação entre este último fator e o sistema de produção intensivo aumentou a probabilidade de resistência múltipla em nível de rebanho. O coeficiente de correlação intraclasses (ICC) foi baixo e mostrou que a maior parte da variação de resistência múltipla é explicada pelas características em nível

de hospedeiro, seguido por fatores em nível de rebanho ( $ICC = 0,126$ ). Esses fatores são exemplos importantes de como o uso leigo de antimicrobianos em vacas leiteiras tem grande potencial para seleção, expansão e manutenção de populações de bactérias resistentes a múltiplas drogas em ambientes de produção animal, em especial nos mais intensivos.

Palavras-chave: prevalência de estafilococos, resistência a antimicrobianos, rebanhos leiteiros, fatores de risco, modelo misto

*Risk factor analysis of multidrug-resistant bacteria from dairy herds in Brazil*

*Author: Waldemir Santiago Neto*

*Advisor: Luís Gustavo Corbellini*

**ABSTRACT**

*Staphylococci have already been reported as the most prevalent mastitis agents. Such bacterial species can carry multidrug-resistant elements coming from other bacteria species, and so on are becoming a great public health concern, once it is also involved in several human disease. The characterization of their antimicrobial resistance profile is important to better control their dissemination. The present work evaluated the distribution of multidrug-resistance among more than 3500 isolates from a repeated cross-sectional study performed from 2010 to 2011 in the main dairy regions of Brazil. The bacteria were classified according to phenotypic methods and the antimicrobial resistance patterns were determined by disk diffusion. To evaluate the main factors related to the response variable – the proportion of bacteria resistant to three or more antimicrobial classes, or multidrug resistance – several explanatory variables were accessed by means of an epidemiological questionnaire. A multivariable mixed model was created to access the strength of association between several putative risk factors and resistance to multiple drugs. Resistance profiles evaluation revealed that penicillins, followed by tetracycline and sulfonamide, were the antimicrobials with lower effectiveness in staphylococci ( $n = 3009$ ). Coagulase negative staphylococci seemed to have similarities with coagulase positive tested, performing moderate resistance pattern to multiple drugs. Some streptococci ( $n = 480$ ) were also submitted to antimicrobial susceptibility tests, and showed moderate to high resistance to tetracycline, gentamycin and clindamycin. The mixed model indicated that mastitis treatment made immediately rather than cautiously; application of antimicrobial therapy by the producer itself rather than a veterinarian practitioner; and the interaction between the producer as applicator and the intensive, modern production system increased the likelihood of multiple-resistance at herd level. The low intraclass correlation coefficient at region level showed that resistance variance is most explained at herd level, and its characteristics, rather than region level. Probably the host level factors not evaluated in this study explains more than the herd level factors, but, considering the coverage of our study, these factors give us insights of how cattle antimicrobial consumption can affect the maintenance and expansion of multidrug resistant bacteria populations in animal production environments.*

*Key words: staphylococci prevalence, antimicrobial resistance, dairy herds, risk factors, mixed model*

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO 1

Quadro 1 Distribuição das frequências de bactérias e de animais com isolamento de pelo menos uma bactéria a partir da amostra de leite, de acordo com as classes de microrganismos causadores de mastite, em 251 vacas em lactação amostradas de 21 rebanhos no Estado do Rio Grande do Sul.....	51
Quadro 2 Distribuição dos microrganismos (n = 159) resistentes a diferentes classes de antimicrobianos isolados de amostras de leites de 251 vacas em lactação de 21 rebanhos no Rio Grande do Sul.....	52
Quadro 3 Distribuição de frequência dos animais amostrados categorizados por faixa etária segundo a prevalência de colonização de bactérias e o resultado dos antibiogramas.....	53
Quadro 4 Resultado da regressão logística para presença de ECP (n =156).....	54
Quadro 5 Resultado da regressão logística para presença de ECN (n = 156).....	54
Quadro 6 Resultado da regressão logística para presença de ECP <sup>a</sup> multirresistentes (n = 156)..	54
Quadro 7 Resultado da regressão logística para presença de bactérias resistentes a pelo menos uma classe de antimicrobianos (n = 148).....	54

### ARTIGO 2

Table 1 Production characteristics from milk basins studied.....	74
Table 2 Main bacteria prevalence and multiple-resistance at herd level by milk basin (with 95% confidence interval).....	75
Table 3 Resistance percentual from all bacteria sampled from composite milk samples and tested to different antimicrobials in Brazilian dairy herds (n = 3506), with the number of isolates discriminated between parenthesis.....	76
Table 4 Descriptive statistics of univariate association results with $p < 0.25$ .....	77
Table 5 Multidrug resistance final multivariable mixed model by least square means.....	81

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

FIGURA 1 Mapa com a densidade de produção de leite no Brasil em 2010. Cada categoria corresponde a 25% da produção nacional. (IBGE, 2011).....14

FIGURA 2 Diagrama conceitual de associações entre fatores de risco manejáveis e incidência, eliminação e prevalência de infecção intramamária por *Staphylococcus aureus*. (DUFOUR et al., 2011).....23

FIGURA 3 Modelo de distribuição e transferência de antibióticos, genes de resistência a antibióticos e micróbios na biosfera, produzido em 1997 para União Européia e Suíça. (TEUBER 2001).....33

### ARTIGO 2

Figure 1 Density plot with milk production in mesorregions from Brazil in 2010. Each category account for 25% of the whole production (adapted from PPM IBGE 2011/ Embrapa Gado de Leite).....72

Figure 2 Milk acquisition growth in Brazilian States between 1980 and 2012 ( $\times 10^3$ L) (adapted from Milk Point/ IBGE 2012).....73

## SIGLAS

CMT – California Mastitis Test

CCS – Contagem de células somáticas

SCC – staphylococcal cassette chromosome/ somatic cell count

SCN – *Staphylococcus* coagulase-negativa

SCP – *Staphylococcus* coagulase-positiva

SCV – small colony variants

MRSA – Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

MIC – Minimum inhibitory concentration

ICC – intraclass correlation coefficient

IMI – intramammary infection

OIE – Organização Mundial de Saúde Animal

WHO – World Health Organization/ OMS – Organização Mundial da Saúde

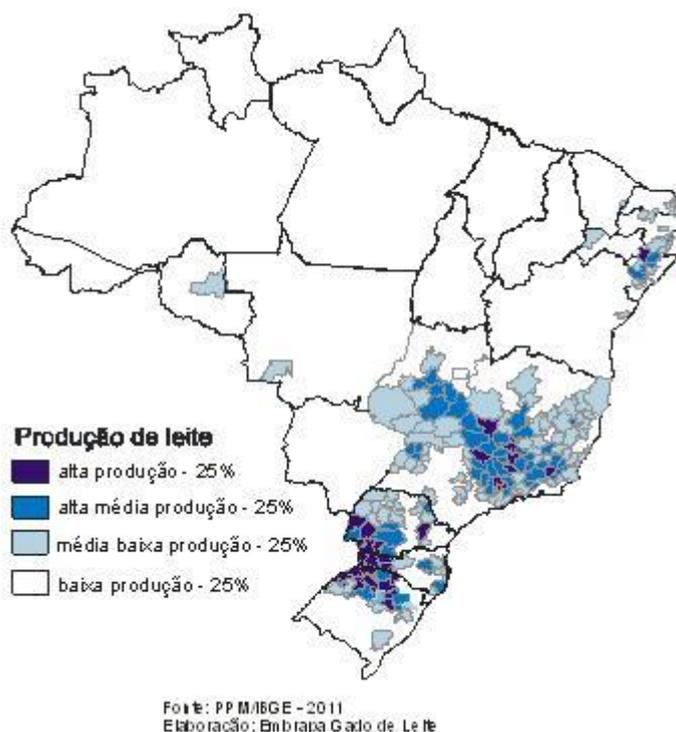
GE – Gastreenterite Estafilocócica

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>18</b>
<b>2.1 Mastite: Perspectivas atuais.....</b>	<b>18</b>
2.1.1 <i>Staphylococcus</i> sp.....	18
2.1.2 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	19
2.1.3 <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativa.....	24
2.1.4 Tratamento.....	25
2.1.5 Profilaxia.....	27
<b>2.2 Microbiologia dos alimentos em Saúde Pública: a interface homem animal na transmissão de <i>Staphylococcus</i> sp. ....</b>	<b>28</b>
<b>2.3 Resistência múltipla a antimicrobianos e fatores de risco.....</b>	<b>30</b>
2.3.1 Resistência em animais: transmissível a humanos?.....	30
2.3.2 Fatores de risco em estudos transversais e modelos multiníveis.....	32
<b>3 ARTIGO 1 – Relação da idade na presença de bactérias resistentes a antimicrobianos em rebanhos leiteiros no Rio Grande do Sul, Brasil.....</b>	<b>34</b>
<b>4 ARTIGO 2 – Associated factors for antimicrobial resistance in dairy cattle bacteria: a multilevel analysis in Brazil.....</b>	<b>55</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>82</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>83</b>
<b>APÊNDICE A Questionário.....</b>	<b>94</b>
<b>APÊNDICE B Comandos do modelo misto de resistência múltipla no SAS®.....</b>	<b>97</b>
<b>APÊNDICE C Artigo <i>Relação da idade na presença de bactérias resistentes a antimicrobianos em rebanhos leiteiros no Rio Grande do Sul, Brasil</i> publicado na Revista Pesquisa Veterinária Brasileira.....</b>	<b>98</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Mundialmente, o Brasil ocupa a sexta posição na produção de leite segundo dados do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (United States Department of Agriculture – USDA (DAIRY, 2013)). No terceiro trimestre de 2012, o Sudeste do Brasil concentrava 36,9% da produção de leite, o Sul, 40,1%, e o Centro-Oeste, 12,8% (IBGE 2012). Comparativamente, no terceiro trimestre do ano seguinte, o Sudeste teve participação de 40,1% da aquisição de leite nacional, seguido pelo Sul, com 37,2%. O Centro-Oeste manteve o patamar com 12,7%, assim como as regiões Norte e Nordeste, com cerca de 5% cada nos dois períodos avaliados (IBGE 2013). O principal estado brasileiro produtor de leite foi Minas Gerais com 27,6% de participação. O Rio Grande do Sul participou com 12,5% da produção e o Paraná, com 12,3% (IBGE 2012). A Figura 1 demonstra as principais microrregiões produtoras de leite no país no ano de 2010.



**FIGURA 1** - Mapa com a densidade de produção de leite no Brasil em 2010. Cada categoria corresponde a 25% da produção nacional.

A mastite bovina é uma doença importante para a bovinocultura leiteira devido à alta incidência de casos clínicos e subclínicos. Como resultado, advêm prejuízos econômicos, em particular por tratamentos com antimicrobianos. Esses, por vezes, são ineficazes e põem em risco a sanidade do rebanho, ao propiciar a manutenção de casos crônicos e reservatórios de bactérias possivelmente resistentes. A mastite resulta da infecção da glândula mamária, princi-

palmente por bactérias dos gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus* e coliformes gram-negativos (RUEGG, 2012), ditos patógenos principais de mastite bovina. *Staphylococcus aureus* é protagonista em termos de mastites contagiosas, entretanto, poucos clones parecem ser responsáveis pelo desenvolvimento da enfermidade numa determinada população (DENADANI, 2010). Produtores são responsáveis pela transmissão deste patógeno (RADOSTITS et al., 1994) no que tange às práticas de manejo do rebanho e ao conhecimento empírico da utilização de antimicrobianos. Há alguns anos já é discutida a mudança no perfil etiológico de mastite bovina, de patógenos contagiosos para ambientais, em que estafilococos coagulase-negativos, comumente referidos como patógenos minoritários, possam proteger o úbere de infecções causadas pelos patógenos principais (SCHUKKEN et al., 1989). Ao mesmo tempo, estes minoritários poderiam albergar determinantes de resistência que podem transpassar para patógenos principais (LEONARD & MARKEY, 2008).

Nos humanos, infecções estafilocócicas são comumente envolvidas em múltiplas doenças afetando a pele e os tecidos moles, e podendo causar sepse, osteomielite e pneumonia (KECHRID et al., 2011; TALAN et al., 2011). Um estudo com dados contínuos da vigilância de patógenos de importância epidemiológica em humanos em nível nacional nos Estados Unidos identificou *Staphylococcus* sp. como os organismos mais comuns na causa de infecções sanguíneas nosocomiais, sendo 31% dos isolados estafilococos coagulase-negativo e 20%, *Staphylococcus aureus* (WISPLINGHOFF et al., 2004). Aproximadamente um terço dos pacientes com bacteremia causada por *S. aureus* desenvolve complicações locais ou metástases sépticas distantes (FOWLER JR. et al., 2003). A preocupação com a emergência de cepas resistentes a antimicrobianos, como *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA, da sigla em inglês *methicillin resistant Staphylococcus aureus*) associado a infecções nosocomiais (WEGNER et al., 2013), ainda é pouco disseminada na população em geral. Estima-se que 20 a 30% da população humana sejam carreadores assintomáticos de *Staphylococcus aureus*. Além disso, a prevalência de genótipos de estafilococos resistentes de origem comunitária tem crescido nos últimos anos (NICHOL et al., 2011; SIMOR et al., 2010).

O uso de antimicrobianos é amplamente disseminado em animais de estimação e de produção de alimentos, tanto terrestres quanto aquáticos. Para os animais terrestres, antimicrobianos são utilizados tanto para terapia e profilaxia, como para acelerar o crescimento e melhorar a eficiência de conversão alimentar. No meio agropecuário, a crescente banalização do uso de antimicrobianos tem mudado a epidemiologia da resistência preocupando autoridades e especialistas. A perspectiva de infecções sem possibilidade de tratamentos é assombrosa e nos remete às décadas antigas. Analogamente à medicina humana, no meio rural cada rebanho e seus

produtores podem representar centros de saúde animal, e problemas de resistência podem emergir conforme o manejo de antimicrobianos e se manifestar em surtos locais.

Contudo, o problema também deve ser avaliado do ponto de vista clínico-epidemiológico no que diz respeito ao bem estar animal, visto a perda de efetividade dos antimicrobianos, e à contaminação ambiental por resíduos de compostos químicos. A interação entre patógenos e resposta imune de hospedeiros tem sido avaliada (endocrinologia microbiana), e a transmissão de determinantes de resistência entre diferentes bactérias comensais e destas para patógenos aumentam a complexidade deste fenômeno. Estudos epidemiológicos de transferência de resistência a antimicrobianos por meio de alimentos tiveram resultados negativos (CRAGO et al 2012) ou em baixos níveis (NORMANNO et al., 2007a; WEESE et al., 2010). Um dos pontos de risco possíveis é a adubagem com sólidos biológicos (dejetos) de animais tratados com antimicrobianos, que podem conter tanto antimicrobianos quanto bactérias resistentes, impondo um risco de transmissão pela água, pelo solo e pela irrigação de plantas bem como por animais selvagens (PEAK et al. 2007; WELLINGTON et al. 2013). Fortes evidências contextuais sugerem que genes de resistência circulam e caso identificados em animais, aumentam as chances de difusão a outros nichos.

A epidemiologia moderna passou a depender mais intensamente de modelos estatísticos, os quais parecem ter se difundido da física aos estudos sociais e, então, à epidemiologia (FREEDMAN, 1999). Epidemiologistas exploram ‘fatores de risco’, os quais aumentariam a probabilidade de adoecer quando da exposição de um hospedeiro a um determinante hipotético de uma doença; geralmente (embora nem sempre) são sinônimos de fatores causais (PORTA, 2008). A exploração consiste em observar a doença em populações naturalmente (ao contrário de experimentalmente) infectadas por meio de ‘estudos observacionais’.

Para estabelecer os níveis de resistência basais em uma região são necessários pelo menos dois anos de monitoramento (GREKO, 2013). Análises multinível têm despertado interesse crescente na investigação de problemas de saúde pública (VON KORFF et al., 1992, DIEZ-ROUX, 1998; DUNCAN et al., 1998). Dentre elas, o modelo linear hierárquico é bastante útil para analisar medidas repetidas, ou dados longitudinais, onde medidas repetidas múltiplas da mesma variável de uma amostra de indivíduos estão disponíveis. Das vantagens desta abordagem, se destaca a flexibilidade em lidar com estrutura de dados desbalanceados, por exemplo, dados longitudinais em que alguns ou até mesmo todos os indivíduos são medidos em diferentes pontos no tempo (SNIJDERS & BOSKER, 2012). No Brasil, existe poucos estudos de resistência a antimicrobianos em bactérias de bovinos leiteiros com amostras probabilísticas, o que compromete a elucidação e atualização de protocolos terapêuticos eficientes, bem como sua extrapolação para uma população bovina abrangente.

O presente trabalho visou avaliar a resistência aos principais compostos antimicrobianos disponíveis à produção comercial de leite bovino, num período de quatro semestres, em projeto multicêntrico com participação de sete centros universitários, os quais sortearam e coletaram amostras e dados de rebanhos de leite em sete regiões distintas do Brasil, representativas na aquisição de leite. A seguir, uma revisão bibliográfica é apresentada contendo (a) a microbiologia de *Staphylococcus* sp., os principais organismos envolvidos na mastite bovina, a qual é a causa mais importante na utilização de antimicrobianos; (b) o risco que estes tem de seguirem a cadeia alimentar e infectar humanos; e (c) uma abordagem conciliadora das medicinas, uma vez que a saúde dos animais nos é importante quando pensamos que nos relacionamos intimamente com eles, direta (produção e companhia) ou indiretamente (consumo). Como resultados deste projeto foram desenvolvidos dois artigos: o primeiro avaliando a relação de dados demográficos de animais amostrados na primeira coleta no Rio Grande do Sul na ocorrência de bactérias multirresistentes; e o segundo, contando com variáveis coletadas em nível de rebanho a partir de questionários epidemiológicos e buscando acessar fatores associados com a resistência no rebanho brasileiro de bovinos de leite que forneçam subsídios para medidas de controle. Por fim, considerações finais prospectam futuras abordagens relacionadas ao problema levando em conta a articulação com diferentes disciplinas.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Mastite bovina

A mastite resulta tipicamente de infecções intramamárias bacterianas e os agentes infecciosos podem ser agrupados com base no seu impacto na saúde do úbere. Patógenos principais, tais como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus uberis* são mais relevantes do ponto de vista clínico do que *Corynebacterium* spp. e *Staphylococcus* coagulase-negativa (SCN), considerados patógenos minoritários. Os reservatórios e os modos de transmissão destes patógenos também servem para diferenciá-los epidemiologicamente em contagiosos, ambientais e oportunistas (associados à superfície dos tetos) (PYORALA & TAPONEN, 2009; ZADOKS et al., 2011). Mastite por *Mycoplasma* spp. é considerada contagiosa e emergente e, devido seu caráter fastidioso, é provavelmente bastante subnotificada. *Streptococcus dysgalactiae* também tem potencial de transmissão por via contagiosa, o que é mais raro quando se trata de SCN, como *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus epidermidis* (GILLESPIE et al., 2009; SAWANT et al., 2009).

A importância econômica da mastite subclínica já foi descrita (SHEPHARD et al., 2000, HALASA et al., 2007; HUJIPS et al., 2008) – tratá-la durante a lactação tem alto custo e baixa eficácia. A implementação de um programa de controle de mastite lançado há quase cinco décadas (NEAVE et al., 1969) tem mudado a epidemiologia desta enfermidade, com um controle razoável de patógenos contagiosos e predominância de mastite associada à SCN. Esta é comumente assintomática e/ ou auto-limitante, bem como aquelas causadas por outros agentes etiológicos ambientais. Diferente do que se pensava, SCN é um grupo heterogêneo de microrganismos, destacando a necessidade de identificação das espécies isoladas de amostras de leite. Patógenos ambientais, tais como coliformes e estreptococos não-*agalactiae*, podem causar grande parte das mastites sub-clínicas depois de SCN e antes de *S. aureus* em alguns rebanhos. Segundo COMPTON et al. (2007), *S. uberis* é o patógeno mais comumente isolado de casos de novilhas no período periparto, manejadas em sistemas de pastejo. Infecções intramamárias por *S. agalactiae* foram erradicadas na maioria das fazendas leiteiras de países com uma indústria leiteira desenvolvida (SAMPIMON et al., 2009), uma vez que este agente costuma ser controlado por terapias antimicrobianas, implementadas a partir de diagnósticos laboratoriais. Dentre as mastites por coliformes, *Klebsiella pneumoniae* possivelmente pode ser transmitida por equipamentos de ordenha e/ ou camas contaminadas por animais infectados (MUÑOZ et al., 2007).

#### 2.1.1 *Staphylococcus* sp.

Estas bactérias esféricas Gram-positivas com 1µm de diâmetro se organizam em agrupamentos tipo cacho de uva, uma vez que a divisão celular ocorre em mais de um plano. A for-

mação de coágulo em plasma numa reação conduzida *in vitro* é comumente utilizada para diferenciar este gênero bacteriano. Esse fator de virulência propicia que as proteínas que surgem pelo efeito em cascata de coagulação *in vivo* sejam depositadas na superfície da bactéria auxiliando na sua evasão das defesas do hospedeiro. Seis espécies do gênero *Staphylococcus* são tipicamente coagulase-positiva (*S. aureus*, *Staphylococcus delphini*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus lutrae*, *Staphylococcus pseudintermedius* e *Staphylococcus schleiferi subsp. coagulans*) e duas são coagulase variável (*Staphylococcus hyicus* e *Staphylococcus agnetis*). Com exceção de *S. aureus* e das espécies coagulase variável, *Staphylococcus* coagulase-positiva são raramente isoladas de casos de mastite bovina. O gênero *Staphylococcus* compreende espécies anaeróbias facultativas capazes de gerar energia por respiração aeróbica e por fermentação, que leva à produção de ácido lático. São também positivas para catalase, o que as difere do gênero *Streptococcus*, e negativas para oxidase, requerendo nutrientes complexos como aminoácidos e vitamina B para seu crescimento (QUINN et al., 2011).

Ao contrário, espécies de SCN constituem a maioria do gênero *Staphylococcus*. As espécies mais comuns causadoras de infecção intramamárias deste subgrupo apresentam algumas similitudes bem como divergências em diferentes estudos, demandando mais pesquisas. Por exemplo, *Staphylococcus chromogenes* e *Staphylococcus simulans* foram encontradas tanto em um estudo de SAMPIMON et al. (2009a) quanto em um de DE VISSCHER et al. (2014). Já *Staphylococcus haemolyticus* foi isolado apenas por SAMPIMON et al. (2009a) ao passo que *Staphylococcus xylosus*, somente por DE VISSCHER et al. (2014). Por sua vez, ZADOKS et al. (2002) concluíram que cepas de *S. aureus* causadoras de mastite são essencialmente diferentes daquelas encontradas na pele bovina. Neste mesmo estudo, foi constatado que equipamentos de ordenha podem transmitir tanto cepas de mastite quanto cepas da pele, e estas últimas eram do mesmo tipo de isolados da pele de ordenhadores.

### **2.1.2 *Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* tem sido intensivamente estudado por ser um agente patogênico em humanos (nosocomial de endocardites a osteomielites) e exibir resistência a um número crescente de agentes terapêuticos. Interessantemente, seu nome advém do fato de produzir pigmentos carotenóides (que em meio de cultura rico tem uma coloração dourada, do latim *aureus* – ouro). A presença destes pigmentos foi relacionada à defesa contra oxidantes produzidos pelo sistema imune do hospedeiro (LIU et al., 2005). Os fatores de virulência associados a essa bactéria podem ser divididos em três tipos: (i) adesinas; (ii) exotoxinas; e (iii) toxina de superantígeno. Os componentes de superfície microbiana reconhecedores de moléculas de matriz adesiva mediam a adesão aos tecidos do hospedeiro e iniciam a colonização que leva à infecção (GOR-

DON & LOWY, 2008). Dentre esses se incluem as proteínas ligadoras de fibronectina (FnbpA e FnbpB), proteína de ligação de colégeno (Cna), fator *clumping* (ClfA e ClfB), proteínas de superfície sensíveis ao plasma (Pis) e proteína A (codificada pelo gene *spa*). Esta última, associada à parede celular, liga-se a porção Fc da imunoglobulina G (IgG) em uma ligação errônea, o que leva a inibição da opsonização que é prejudicial à ocorrência da fagocitose (SWITALSKI et al., 1993). Além destes, a capacidade de formação de biofilmes promove resistência à resposta imune do hospedeiro e a antimicrobianos, dificultando o tratamento.

Após a adesão, dois tipos de toxinas promovem a patogenicidade desta bactéria, interferindo com a resposta imune do hospedeiro e permitindo a propagação da bactéria. Por um lado, toxinas citolíticas formam poros na membrana citoplasmática de células do hospedeiro causando extravasamento de conteúdo celular e lise (FOSTER, 2005). Por outro, um grupo de poderosas proteínas imuno-estimuladoras, tais como enterotoxinas e causadoras da síndrome do choque tóxico, têm a habilidade de fazer uma ligação cruzada entre moléculas de MHC classe II localizadas em células apresentadoras de antígeno (macrófagos e células dendríticas) e células T receptoras, formando um complexo trimolecular. Assim, há a indução de uma intensa proliferação de células T independente da presença de antígenos, resultando na produção e liberação massiva de citocinas que causam extravasamento capilar, dano epitelial e hipotensão (BAKER & ACHARYA, 2004).

A regulação dos genes envolvidos na virulência é associada, em grande parte, a um sistema regulador de gene acessório (*agr*), controlado por um mecanismo de *quorum sensing* formado por duas unidades de transcrição com seus respectivos promotores (RNAII-promotor P2 e RNA III-promotor P3) (NOVICK & GEISINGER, 2008). Em *S. aureus*, genes codificadores de proteínas de adesão e defesa – tais como proteína A, coagulase e Fnbps – são regulados durante os estágios iniciais de crescimento, enquanto genes que codificam proteínas degradativas – hemolisinas, citotoxinas, proteases, etc. – são estimulados na fase exponencial tardia, demonstrando uma estratégia de priorização do estabelecimento no hospedeiro para, então, atacá-lo.

*S. aureus* é um importante patógeno causador de mastite tanto em vacas como pequenos ruminantes (FOSTER, 2012). A mastite crônica é uma das principais enfermidades que afetam a indústria leiteira. A sobrevivência intracelular de estafilococos tem sido apontada como um componente importante da patogênese, embora a natureza persistente de *S. aureus* e das demais espécies do gênero que colonizam bovinos, tornando-os carreadores, ainda está por ser determinada. Amostras isoladas de animais infectados revelaram bactérias dentro de células alveolares isoladas de leite (HEBERT et al., 2000). Por outro lado, animais saudáveis podem carrear tais bactérias intermitentemente. Análises moleculares de isolados de diferentes animais têm revelado que algumas cepas parecem ser hospedeiro-adaptadas enquanto outras podem colonizar diversas

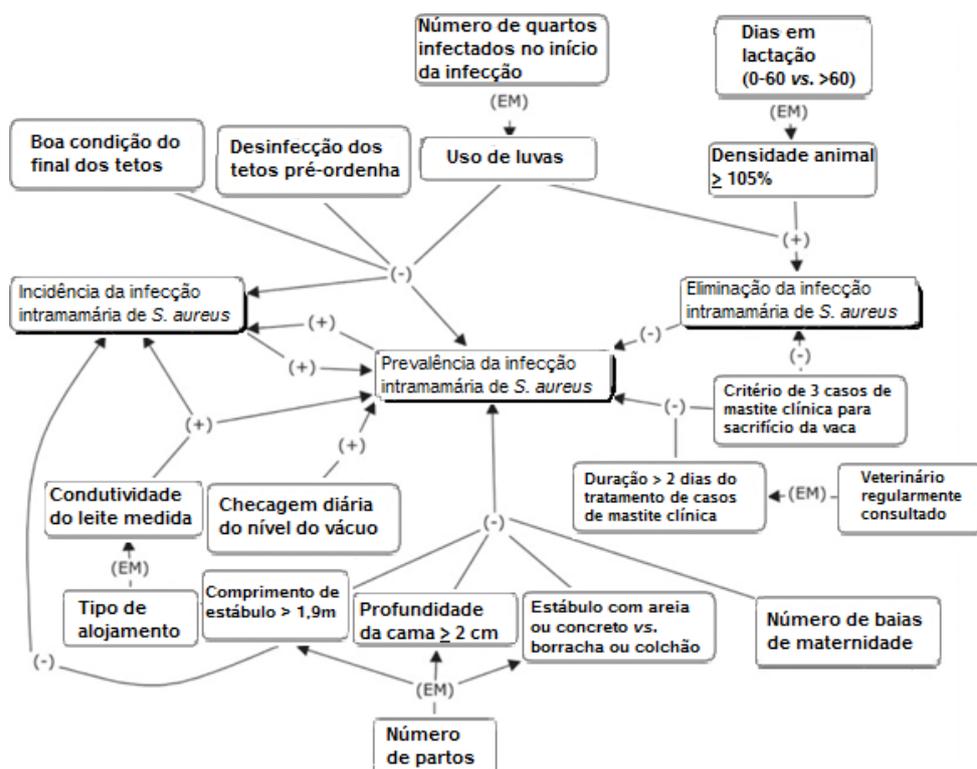
espécies animais (CUNY et al., 2010), sugerindo uma plasticidade da bactéria conforme interage com o hospedeiro. Por exemplo, SMITH et al. (2005) demonstraram que *S. aureus* poderia ter especificidade sítio-hospedeiro, embora tenham encontrado cepas comuns entre o leite, mãos de ordenhadores e outras fontes. Seguindo esta concepção de comunhão de cepas, HAVERI et al. (comunicação pessoal apud TAPONEN & PYORALA, 2009) observaram que em altas prevalências de mastite por *S. aureus*, o mesmo pode ser encontrado em vários sítios, tanto mamários (intra e extraductos) quanto extramamários. Estes resultados sugerem uma transição de populações bacterianas conforme desenvolvem processos infecciosos.

*S. aureus* não tem sido tradicionalmente classificado entre patógenos intracelulares (tais como *Listeria monocytogenes* e *Shigella flexneri*), embora haja evidências de que este microrganismo pode invadir e persistir por variados períodos de tempo em diversos tipos celulares – a saber, células endoteliais e epiteliais, fibroblastos, osteoblastos e queratinócitos – em modelos de culturas celulares (GARZONI & KELLEY, 2009). Estudos recentes documentam até mesmo a sobrevivência em células fagocíticas, como macrófagos (KUBICA, 2008). Uma das prováveis explicações para este mecanismo é a presença das “Small-colony variants” (SCVs), que representam uma sub-população de ocorrência natural e crescimento lento de *S. aureus* com fenótipo e patogenia distintas (por exemplo, não possuem pigmentação e a produção de exotoxinas é deficiente ou reduzida). Estas variedades, particularmente insidiosas, mostram perfis de resistência alterados frente os beta-lactâmicos, em decorrência da síntese reduzida de parede celular, e os aminoglicosídeos, pelo baixo potencial de membrana. São difíceis de detectar e tratar, e dão origem a infecções recrudescentes (PROCTOR et al., 2006). Em medicina humana, a terapia antimicrobiana efetiva para *S. aureus* intracelular faz uso de rifampicina, a qual é ativa contra estafilococos intracelulares, mas gera rápida resistência se utilizada isoladamente. Relatos demonstram a efetividade de algumas combinações de drogas na contenção, mas também resultam em resistência terapêutica (KRUT et al. 2004). Estudos recentes indicam que alguns estafilococos coagulase-negativos tais como *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus saprophyticus* poderiam também promover infecções por virtude de colonizações intracelulares (ZIEBUHR et al., 2006; KHALIL et al., 2007; SZABADOS et al., 2008).

Bactérias persistentes, mesmo compreendendo uma fração pequena de uma população bacteriana, conseguem ativar rigorosos mecanismos de defesa a estresse oxidativo, tal como causado por drogas bactericidas que induzem a formação de espécies oxigênio-reativas (ROS) (KOHANSKI et al., 2007) – citotóxicas para diversos componentes celulares essenciais (como o DNA, proteínas e lipídeos) – levando à morte celular. Esses mecanismos são compostos por elementos de defesa, como as enzimas catalase e superóxido-dismutase (SODs), e pela inibição de pró-oxidantes, como a HAQ (hydroxy-2-alkylquinoline), resultando em menores níveis de

ROS, menor dano celular e, conseqüentemente, resistência aos efeitos bactericidas. Além desses mecanismos, algumas bactérias (como *E. coli*, *S. aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*) têm a capacidade de sequestrar ferro, aliviando o estresse oxidativo, e estimular atividades antioxidantes de catalases e SODs (SHATALIN et al., 2011).

PIEPERS et al. (2011), por meio de uma regressão logística multivariável multinível, verificaram que variáveis em nível de tetos e de novilhas (sua categoria de estudo) eram responsáveis por grande parte da variação na contagem de células somáticas (CCS), e que variáveis em nível de rebanho, por apenas 3% da variabilidade. O aumento da CCS foi relacionado a infecções por patógenos contagiosos (incluindo *S. aureus*), somado a alguns fatores de risco: contato prévio de novilhas com vacas antes da parição (transmissão horizontal) e controle infetivo de moscas-dos-chifres (*Hydrotea irritans*) (vetores). DUFOUR et al. (2011) verificaram fatores associados à prevalência, incidência e eliminação de infecções intramamárias por *S. aureus* (Figura 2, adaptada). O uso de luvas na ordenha pareceu ser uma eficiente medida para prevenir infecção intramamária por *S. aureus* de vacas infectadas. Além disso, o uso de luvas também parece prevenir a ‘autoinfecção’ entre quartos de uma mesma vaca, como pode ser visto pela diminuição das chances de infecção associada ao uso de luvas conforme o número de quartos infectados aumenta. Variáveis relacionadas ao bem-estar dos bovinos foram ressaltadas por possibilitarem uma melhor resposta imune dos hospedeiros. Variáveis de alojamento e densidade de animais sofreram modificação conforme paridade e dias em lactação (DIM – days in milking), respectivamente, revelando nichos diferentes. Três casos de mastite clínica como critério para abate tiveram associação com menores níveis de eliminação e prevalência por *S. aureus*. Por fim, tratamentos prolongados (mais de dois dias) tiveram associação com menores prevalências de IMI por *S. aureus*, com a consulta regular de médicos veterinários como efeito modificador. Estas duas últimas variáveis podem ter relevância no estudo de resistência a antimicrobianos, visto que estão relacionadas à manutenção de animais no rebanho e à conformidade de uso de antimicrobianos.



(-): Associado com menor incidência, eliminação ou prevalência de infecção intramamária por *S. aureus*  
 (+): Associado com maior incidência, eliminação ou prevalência de infecção intramamária por *S. aureus*  
 (EM): Efeito modificador

**FIGURA 2.** Gráfico conceitual das associações entre fatores de risco manejáveis e incidência, eliminação e prevalência de infecção intramamária por *Staphylococcus aureus* (adaptado de DUFOUR et al. 2011).

Recentemente, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) de origem animal tem se tornado um importante problema em saúde pública, preponderantemente aqueles de origem suína, porém também já isolados em mastite bovina (JUHÁSZ-KASZANYTZKY et al. 2007; MOON et al. 2007; WULF & VOSS 2008). A emergência e a disseminação da resistência a antimicrobianos são resultado de numerosas e complexas interações entre antimicrobianos, microrganismos e o ambiente. A resistência pode ser adquirida por mutações genéticas, as quais são verticalmente transferidas a células filhas. Mais comumente, ocorre por transferência horizontal de elementos genéticos móveis de células doadoras, inclusive de bactérias de espécies distintas (SEFTON, 2002). A organização do pangenoma desta bactéria é dividida entre o *core* (representa 75% de qualquer *S. aureus*), e elementos genéticos móveis, tais como prófagos, plasmídeos (i. e. pT181, pUB110 e p1258), transposons (Tn554), sequências de inserção e cassetes cromossomais (SCC*mec*). Essa gama de componentes acessórios e genes estranhos servem a outras espécies bacterianas, possibilitando uma comunicação horizontal tanto de genes de virulência quanto de resistência entre espécies. Tem sido proposto que um dos elementos conservados no cassete cromossomal estafilocócico (SCC*mec*), o complexo cassete-cromossomo-

recombinase (*ccr*), foi trazido juntamente com genes *mec* em SCN, onde ocorreram deleções nos genes regulatórios *mec* para então serem transferidos a *S. aureus* (PLATA et al., 2009). Os transposons são um exemplo desses elementos genéticos, carregando, ao lado do gene da transposase, outros genes, os quais frequentemente são determinantes de resistência (PLATA et al., 2009). *S. aureus* pode ser hospedeiro de mais de dez transposons, a maioria carregando genes de resistência a antimicrobianos (BABA et al., 2004 apud PLATA et al., 2009). Por outro lado, plasmídeos, elementos genéticos extracromossomais, podem carrear genes que conferem resistência a antimicrobianos e metais pesados, bem como fatores de virulência e proteínas que facilitam a sobrevivência na presença de nutrientes incomuns (WEGRZYN, 2005). Exemplificando, a produção de  $\beta$ -lactamases, enzimas que quebram o anel  $\beta$ -lactâmico por hidrólise, é o mecanismo mais comum de resistência em *Staphylococcus* sp. Entretanto, a mudança do sítio de ligação parece ser mais importante. MRSA é definido pela presença de um grande elemento genético móvel denominado cassete cromossomal estafilocócico (SCCmec). Este carrega o gene *mecA* que codifica para uma proteína de ligação a penicilina (PBP2a) com baixa afinidade de ligação a todos os  $\beta$ -lactâmicos (ITO et al., 1999).

### 2.1.3 *Staphylococcus coagulase negativa* (SCN)

A categoria de patógenos oportunistas associados à superfície dos tetos compreende *Staphylococcus coagulase negativa*, que possuem a característica de residir na pele e causar doença em condições que favoreçam a colonização do úbere. SCN têm sido classicamente descritos como um grupo homogêneo de pouca relevância, entretanto alguns investigadores têm afirmado que algumas espécies (ou cepas de algumas espécies) do grupo podem ter um efeito benéfico na saúde do úbere (VANDERHAEGHEN et al., 2014). De qualquer maneira, há diferenças ecológicas entre espécies do grupo no que tange adaptação ao hospedeiro, de rebanho para rebanho, mas também de sítio reservatório principal (luvas e mãos de ordenhador, ápice dos tetos e/ou equipamento de ordenha) (DE VISSCHER et al., 2014).

Infelizmente, métodos fenotípicos (bioquímicos) para identificação de SCN têm pouca acurácia e capacidade de tipagem por si só (especialização) (TAPONEN et al., 2006, 2008; SAMPIMON et al., 2009b), comparados a métodos moleculares, não sendo válidos para pesquisa de infecções intramamárias por SCN. Apesar de técnicas moleculares já estarem disponíveis, tais como sequenciamento de genes e *fingerprinting*, nem todas foram validadas para identificação de SCN em ruminantes.

Em termos de prevalência, infecções intramamárias por SCN podem variar consideravelmente entre regiões e países, principalmente dependendo do desenho amostral do estudo. Casos clínicos apresentaram prevalências menores comparados a casos subclínicos. Nesses úl-

timos há maior prevalência de SCN (PYORALA & TAPONEN, 2009), a qual é ainda maior em amostras provenientes de animais saudáveis (BRAEM et al. 2013). Devido ao interesse relativamente recente em infecções por SCN, o conhecimento a respeito da prevalência relativa a espécies deste grupo é escasso. DE VIESSCHER et al. (2014) encontraram diferenças entre rebanhos que identificaram preferências por sítios de colonização em determinadas espécies. *S. chromogenes*, *S. simulans* e *S. xylosus* predominaram na glândula mamária e raramente foram encontrados no ápice dos tetos, nas linhas ordenhadeiras e mãos/ luvas de ordenadores. Já as espécies *S. equorum* e *S. fleurettii*, foram encontradas em sítios extramamários.

A produção de leite parece não ser comprometida quando há colonização por SCN, e o aumento de contagem de células somáticas é substancialmente menor quando comparado com a infecção por estafilococos coagulase-positiva (SCHUKKEN et al., 2009). Além disso, características de persistência de SCN foram avaliadas. No período periparto *S. simulans* persistiu, mas *S. chromogenes* não (AARESTRUP & JENSEN, 1997). Já no acompanhamento por um mês durante a lactação ambos persistiram (TAPONEN et al., 2007).

O controle de mastite causada por SCN, apesar de ser mais eficaz que de patógenos principais, pode ser dificultado pela heterogeneidade deste grupo bacteriano. Infecções por SCN costumam ser auto-limitantes e tratamentos desnecessários (i.e. tratamento no período seco) contra este grupo podem estimular a seleção de isolados com determinantes de resistência que servirão de reservatórios para futuras infecções, até mesmo por SCP. Entre as espécies de SCN, *S. epidermidis* demonstrou maior potencial de resistência à metilicina, carreando o gene *mecA* significativamente mais frequentemente que outras espécies (SAMPIMON, 2009a). A produção de  $\beta$ -lactamases também é comum nesta espécie (PERSSON WALLER et al., 2011), e foi encontrada mais em casos subclínicos de SCN (PYORALA & TAPONEN, 2009).

#### **2.1.4 Tratamento**

A glândula mamária é um alvo difícil para o tratamento antimicrobiano. A farmacocinética envolvendo solubilidade lipídica, grau de ionização, grau de ligação às proteínas séricas e ao úbere, bem como o tipo de veículo, irá determinar o quanto haverá penetração de uma substância no leite, quando administrada via parenteral. Das mesmas características dependerão também a absorção e a distribuição em todo o úbere, quando infundida via intramamária (CONSTABLE et al., 2010). Aspectos farmacodinâmicos também devem ser considerados, como a possível interferência do leite na atividade dos antimicrobianos (ex. macrolídeos, tetraciclina e trimetoprima/ sulfonamidas) e atividade bactericida, pois a fagocitose é deficiente na glândula mamária (SORDILLO, 2005).

A via sistêmica de administração de antimicrobianos tem sido sugerida como mais eficiente do que a via intramamária para o tratamento de mastite clínica, teoricamente pela melhor penetração no tecido mamário. Porém, a via intra-mamária é a mais comumente empregada. As elevadas concentrações da substância obtidas no local, o baixo consumo de antimicrobianos necessário, e o fato de poucas drogas terem características farmacocinéticas e farmacodinâmicas adequadas para tratamento sistêmico de mastite explicam a preferência. No entanto, a distribuição desigual em todo o úbere e o risco de contaminação quando infundido o produto no canal do teto, pesam contra a escolha da via mamária para fins terapêuticos (CONSTABLE et al., 2010).

*Staphylococcus aureus* tem a capacidade de penetrar no tecido do úbere e causa infecção profunda, sendo indicado o tratamento sistêmico (BARKEMA et al., 2006), de preferência em combinação com tratamento intramamário (TAPONEN et al., 2002). Os antimicrobianos de primeira escolha para o tratamento da mastite por estafilococos são da classe dos  $\beta$ -lactâmicos, em particular a penicilina G. Os antimicrobianos de amplo espectro, como as cefalosporinas de terceira e quarta geração, não devem ser utilizados como primeira alternativa para mastite, pois podem aumentar a emergência de resistência a esses compostos (TAPONEN et al., 2002). Além disso, a curta duração dos tratamentos-padrão é uma provável razão para a baixa taxa de cura da mastite, uma vez que o período adequado de tratamento é tratado pela indústria como *tratamento prolongado*. Em mastites causadas por *S. aureus* este período deve ser respeitado, pois potencializa a cura (BARKEMA et al., 2006).

O tratamento de mastite subclínica com antimicrobianos costuma não ser aconselhado do ponto de vista de custo-efetividade, uma vez que a taxa de cura espontânea se assemelha à taxa de cura por terapia antimicrobiana (WILSON et al., 1999). Além disso, o tratamento não irá afetar a incidência de mastite no rebanho, caso outras medidas profiláticas não sejam asseguradas. Entretanto, em rebanhos problemáticos, com prevalências altas de bactérias contagiosas, o tratamento de mastite subclínica é aconselhado, preferencialmente pautado por resultados etiológicos com perfis de resistência conhecidos. Seguindo orientações de especialistas em mastite, o tratamento de todo o rebanho leiteiro no momento da secagem tem sido praticado por décadas. Essa abordagem se propõe a eliminar infecções subclínicas e prevenir novas infecções no início do período seco, em que as vacas estão mais suscetíveis a casos de mastite. Essa prática, contudo, tem sido questionada, pelo fato de ser um possível fator de risco para cepas resistentes numa população (RAJALA-SCHULTZ et al., 2004), e mesmo sendo efetiva contra os principais agentes etiológicos de mastite contagiosa tem gerado uma transição de prevalência a favor de patógenos ambientais. Como alternativa, a identificação condicionada ao diagnóstico de infecções intramamárias (a terapia seletiva da vaca seca) a partir de CCS, California Mastitis Test (CMT) e condutividade elétrica despontam para a rotina em rebanhos (HUJIPS & HOGE-

VEEN, 2007), associadas às medidas de biossegurança – higiene, nutrição e bem-estar. Para patógenos menores, do ponto de vista econômico, apenas o uso destas medidas é suficiente para controlar problemas de infecções (ROBERT et al., 2006).

A Organização Internacional de Saúde Animal (OIE) publicou uma lista classificando os antimicrobianos de acordo com o grau de importância em medicina veterinária, assim como a Organização Mundial de Saúde (OMS), em medicina humana (WHO, 2011). Esta lista utiliza dois critérios para classificar os antimicrobianos: I – a verificação da importância geral da classe; II – a verificação da importância específica a alguma enfermidade, dado a falta de compostos terapêuticos alternativos (OIE, 2014). Fluorquinolonas, cefalosporinas de terceira e quarta gerações, e macrolídeos são vistos como sendo de alta prioridade em análises de risco. Contudo, em situações agudas, o tratamento deve ser iniciado com base em dados do estabelecimento rural e na experiência pessoal do veterinário responsável pela fazenda. A utilização de protocolos descritivos próprios do tratamento da mastite para o estabelecimento leiteiro pode promover o uso racional de antimicrobianos e reduzir sua utilização (RAYMOND et al., 2006).

É difícil estabelecer protocolos que sejam abrangentes para diferentes realidades epidemiológicas de mastite bovina. Uma meta-análise, a qual compreende um processo de revisão sistemática seguido pela combinação de resultados dos estudos elencados, pode ser realizada para elucidar quais os antimicrobianos são mais eficientes em uma determinada população. COSTA et al. (comunicação pessoal) procurou responder *Qual a frequência de S. aureus resistente a antimicrobianos isolados de amostras de leite em rebanhos leiteiros com mastite?* Por meio desta abordagem. A partir de 15 artigos selecionados após avaliações de relevância, crítica e de qualidade, foi concluído que houve diferença entre a maioria das classes de antimicrobianos bem como heterogeneidade em cada fármaco em si, com exceção de Neomicina e Sulfam/Trimetoprim. De acordo com O'CONNOR & SARGEANT (2014) a heterogeneidade em estudos observacionais pode ser contextual, devido a fatores que caracterizam os sistemas de produção envolvidos, ou metodológica, relativas às diferenças relevantes nos desenhos dos estudos, neste caso descartada.

### **2.1.5 Profilaxia**

A prevenção de mastites contagiosas ocorre em relação à introdução e transmissão no rebanho. À medida que o crescimento dos rebanhos ocorre, a compra de animais torna-se necessária. O risco inerente na aquisição externa de animais pode ser minimizado se pontos cruciais forem abordados entre as partes. A saber, média geométrica do rebanho de CCS <200.000 células/mL no último ano; controle individual de CCS mensal ou bimestral, durante o último semestre; ausência de casos por *S. agalactiae* nos últimos dois anos; rebanho com estado livre ou va-

cinado para o vírus da diarreia viral bovina; ausência de lesões severas nos tetos; e informação confiável pelo produtor dos patógenos circulantes no rebanho. Preferencialmente o rebanho deve ser fechado sem compra de animais, com barreiras a animais e pessoas externas. Em caso de funcionários contratados na criação de bovinos de leite, educação sanitária, medidas de biossegurança e prevenção de mastite podem ser alcançadas por meio de treinamento. O controle da circulação de animais domésticos (cães e gatos) também é importante, pois estes podem albergar alguns patógenos (YILDIRIM et al., 2002; TIKOFSKY & ZADOKS, 2005).

Uma vez presentes no rebanho, microrganismos podem ser controlados para que não se disseminem entre animais. Historicamente, o programa de controle de mastite focado essencialmente em patógenos contagiosos foi recomendado no final da década de 60 (NEAVE et al., 1969) e consiste em: tratamento apropriado de mastites clínicas, sacrifício de vacas infectadas cronicamente, limpeza e desinfecção dos tetos antes e após a ordenha, propriedades vizinhas que também tenham um bom controle sanitário, manutenção e utilização corretas do equipamento de ordenha e aplicação da terapia no período seco. A epidemiologia da mastite tem sido influenciada por essas medidas, e em alguns locais, como Reino Unido e Nova Zelândia, a mastite ambiental tornou-se mais prevalente que a contagiosa. O Conselho Nacional de Mastite (NMC, 2009) indicou recentemente cuidados adicionais relativos ao bem-estar animal (conforto, higiene e ventilação nos alojamentos) para prevenir patógenos ambientais. O controle de infecções primárias em novilhas também deve ser avaliado no rebanho, pois é um forte preditor da qualidade da produção de leite no futuro. A colonização por SCN parece ter um papel chave no desenvolvimento de mastites clínicas e na produção de leite nesta categoria (PIEPERS et al., 2010). Estas bactérias podem ser vistas como sentinelas no processo de resistência, e fornecer parâmetros para um possível controle biológico, uma vez que ainda não provocam mastites intensas, mas albergam os primeiros determinantes genéticos de resistência numa população. Deve-se ter parcimônia em adaptar medidas de controle “padronizadas” a realidades distintas socioeconomicamente, pois o acesso facilitado a antimicrobianos aliado à falta de engajamento a outras medidas de biossegurança pode ser determinante no desenvolvimento de alta prevalência de resistência na população de patógenos.

## **2.2 Microbiologia dos alimentos em Saúde Pública: a interface homem-animal na transmissão de *Staphylococcus***

*Staphylococcus aureus* é um produtor de enterotoxinas termodúricas que crescem em uma variedade de alimentos (produtos cárneos, pastas cremosas, batatas, e algumas saladas). Há décadas esta bactéria tem sido uma preocupação para processadores e produtores de alimentos quanto à sanidade, por causa da sua característica ubiquitária, sendo encontrada frequentemente no ar, poeira, água, leite cru e outros alimentos, bem como em superfícies ambientais. O risco

de transmissão destes patógenos por via alimentar é altamente relacionado com aspectos higiênicos de produção e processamento por operadores, visto que eles são tipicamente vulneráveis a destruição pelo calor e agentes sanitizantes. Manipuladores têm sido associados a 20% dos casos de doenças veiculadas por alimento (DTAs) (US FDA, 2000), somado à estimativa que cerca de 30% da população é carreadora assintomática destes microrganismos (HEYMAN, 2004; KUEHNERT et al., 2006).

Os animais, fontes de produção de alimentos, também participam no ciclo de transmissão, associados aos trabalhadores do meio rural, inclusive veterinários. Neste contexto, pode-se hipotetizar que a transmissão por via alimentar de estafilococos por produtos cárneos se dê por meio de manipulação (*human handling*) de manipuladores/ processadores carreadores (possivelmente assintomáticos) e manutenção em temperatura ambiente como fatores de risco. Por outro lado, a produção de leite impõe um cenário em que há contato íntimo entre ordenhador/ produtor e vacas leiteiras, semelhante ao que ocorre com animais de companhia, propiciando uma transmissão tanto zoonótica como antropozoonótica (KHANA et al., 2008; CATRY et al., 2010). Além disso, produtores de leite comumente consomem o leite produzido, por vezes *in natura*, representando um risco acentuado em casos de infecção do rebanho.

A biota do leite cru de bovinos é a mesma encontrada no úbere e pele deste animal, nos utensílios da ordenha e nas tubulações da coleta. Em boas condições de manuseio e conservação a microbiota predominante é Gram-positiva (JAY, 2005). O leite é veículo de algumas doenças, que se apresentam por vezes em forma de surto após o consumo de leite cru. Dentre elas, está a Gastrenterite Estafilocócica (GE), estudada pela primeira vez em 1894 por J. Denys. Em 1914, M. A. Barber chegou a reproduzir em si mesmo os efeitos e sintomas da doença por meio do consumo de leite inoculado com uma cultura de *Staphylococcus aureus*. A patologia mediada por toxinas citolíticas leva a sintomas tais como náuseas, emese, diarreia e dores abdominais dentro de 1-6 horas após o consumo do alimento contaminado (FDA, 1998). Por esse fato, a curta duração da doença, e a raras complicações, acredita-se que a GE seja bastante subnotificada e subdiagnosticada (SCALLAN et al. 2011).

O isolamento de MRSA a partir de alimentos tem sido documentado, inclusive em leite e queijo de bovinos (NORMANNO et al., 2007). Alguns estudos têm levantado valores entre 13 e 43% de isolamento de *S. aureus* em alimentos associados à toxinfecções alimentares (LEE et al., 2009; NORMANNO et al., 2007; CRAGO et al., 2012), embora o risco de transmissão pela via alimentar de isolados resistentes ter se mostrado negligenciável (CRAGO et al., 2012).

## 2.3 Resistência múltipla a antimicrobianos e fatores de risco

### 2.3.1 Resistência em animais: transmissível a humanos?

A introdução da meticilina em 1959 trouxe a expectativa do término de problemas associados a infecções causadas por *Staphylococcus aureus* penicilina-resistente. Entretanto, poucos clones geograficamente limitados e relacionadas com casos hospitalares causados por cepas resistentes emergiram dentro de 2 anos após sua introdução (JEVONS et al., 1963). No final da década de 90, novos clones de MRSA emergiram na comunidade, causando infecções sem prévia exposição a centros de saúde. Durante a última década, uma tendência perturbadora tem atraído uma considerável atenção, a emergência e disseminação de vários estafilococos, particularmente os coagulase-positivo (*S. aureus* e *S. pseudintermedius*), resistentes à meticilina em animais. Pouco é sabido sobre as forças de seleção que levaram ao repentino surgimento destas bactérias em diferentes reservatórios animais. Foi na Bélgica, no início da década de 70, que foi isolado MRSA em vacas leiteiras com mastite, o primeiro caso em animais de criação publicado (DEVRIESE et al., 1972). A emergência de MRSA em gado leiteiro pode estar associada com o contato com outras espécies dos hospedeiros, como no caso de uma variante de MRSA associado à pecuária (do inglês, *livestock associated*, LA-MRSA ST398), ou com a troca de material genético entre *S. aureus* e estafilococos coagulase-negativo (os quais são comuns em infecções intramamárias e frequentemente levam determinantes de resistência a antimicrobianos consigo).

Até final dos anos 90, mais de um bilhão de toneladas de antimicrobianos foram lançados na biosfera nas últimas décadas (MAZEL & DAVIES, 1999) e estima-se que cerca de 50% destes foram dispendidos para fins agropecuários (LEVY, 1992). Geralmente, as indicações mais comuns para o emprego de antimicrobianos são doenças entéricas e respiratórias em animais jovens e mastite em bovinos (PAGEL & GAUTIER, 2012). Um efeito direto da emergência e disseminação da resistência antimicrobiana em bactérias de origem animal é a perda de efetividade terapêutica nos tratamentos em animais. Pouco se discute a respeito, mas o bem-estar animal é seriamente comprometido com a ineficácia de tratamentos de enfermidades graves, além das consequências para a produtividade e economia, tanto em sistemas intensivos modernos quanto em países de baixa a média renda (PAGEL & GAUTIER, 2012).

A transmissão de MRSA dos animais para os humanos pode acontecer por contato direto, contaminação ambiental, e consumo ou manuseio de alimentos contaminados. O primeiro modo parece ser o mais importante, tendo como consequência um risco elevado de colonização àqueles com contato próximo a animais colonizados por MRSA, como fazendeiros (KLUYTMANS et al., 1995; VOSS et al., 2005) e veterinários (WULF et al., 2008; GARCIA-GRAELLS et al., 2012). Recentemente, os resultados de Price et al. (2012) sugerem fortemente que o grupo clonal CC398 de MRSA associado à pecuária originou em humanos como suscetíf-

vel (MSSA). A linhagem parece ter passado de humanos aos animais de produção, onde adquiriu resistência à tetraciclina e à meticilina, subsequentemente. O primeiro surto desta linhagem foi notificado em um hospital holandês, mas nenhum paciente relatou ter contato com animais de produção (WULF et al., 2008), indicando transmissão entre humanos. De qualquer maneira, estudos ainda relatam pouca importância desta linhagem em especial nos casos humanos.

Abordagens mais holísticas envolvendo aspectos ambientais (MARSHALL & LEVY, 2011; ASHBOLT et al., 2013) e as diversas rotas possíveis de transmissão, a partir da análise de dados de resistência, podem servir para elucidar a complexidade da epidemiologia da resistência e identificar os pontos de controle cruciais. O termo multiresistência não possui uma definição aceita universalmente. Entretanto, Schwarz et al. (2010) sugeriram que trabalhos em que somente um teste de suscetibilidade fenotípica for realizado, resistência a um componente de três ou mais classes de agentes antimicrobianos pode ser referida como multirresistência, para uma apresentação mais acurada dos padrões de multirresistência entre estudos.

Regulações e práticas de uso de antimicrobianos variam largamente ao redor do globo e são provavelmente afetadas por contextos sócio-econômicos. Ao contrário da União Européia e dos Estados Unidos, no Brasil não existe um comitê específico para vigilância do consumo de antimicrobianos veterinários; e os dados do montante de antimicrobianos vendido para o uso em animais ainda são escassos no nosso país. CHANTZIARAS et al. (2013) demonstraram, em nível nacional, forte correlação entre o grau de uso de antimicrobianos específicos com o grau de resistência contra estes princípios ativos em *E. coli* comensais isoladas de porcos, frangos e bovinos. Poucos estimadores confiáveis sobre o uso de antimicrobianos estão disponíveis nos países emergentes. O acesso irrestrito, e muitas vezes estimulado, somado ao uso empírico de antimicrobianos, indica níveis alarmantes de resistência em países de alta renda.

Ambientes hospitalares humanos têm conseguido controlar a emergência de MRSA, entretanto, casos advindos da comunidade têm crescido. No ramo pecuário, em que cada propriedade pode perfazer um ambiente de cuidados médicos, a falta de controle de antimicrobianos pode amplificar o risco de transmissão direta e/ ou via alimentar de cepas resistentes. O Código de Animais Terrestres (capítulo 6.5 OIE, 2008) faz recomendações para o monitoramento e a vigilância de resistência a antimicrobianos em animais e produtos de origem animal, em escala nacional. Deste modo, programas voltados a esse problema podem monitorar as tendências de resistência a antimicrobianos e indicar as melhores medidas terapêuticas, detectar novos mecanismos de resistência envolvidos, e prover dados necessários à condução de análises de risco, que poderão sustentar tecnicamente novas políticas de uso de antimicrobianos.

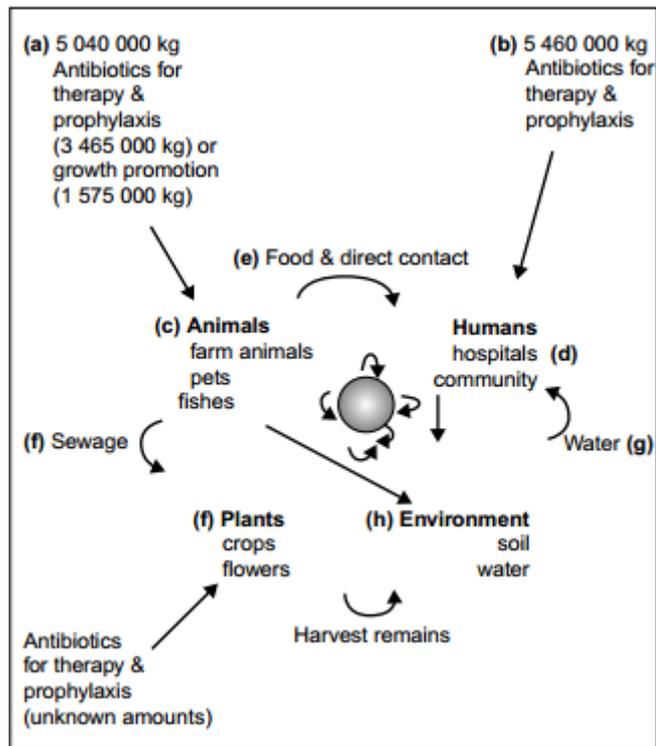
### 2.3.2 Fatores de risco em estudos transversais e modelos multiníveis

Estudos transversais envolvem a seleção de uma amostra de indivíduos a partir de uma população, bem como a determinação da presença da doença simultânea ao fator de associação hipotético. Modelos de regressão são amplamente utilizados em epidemiologia. Um modelo é especificado a partir da escolha de: (i) variáveis explanatórias (também chamadas de “covariáveis”, ou “variáveis independentes”), a serem postas no lado direito da equação; (ii) a função da equação (linear, log linear, etc.); (iii) as premissas sobre os erros (independentes ou alguma outra matriz de covariância); e (iv) a variável resposta. Epidemiologistas trabalham muito com respostas binárias, codificando doença como “1” e ausência de doença como “0”. As análises podem ser ajustadas para agrupamentos (*clusters*) dentro de compartimentos dentro de propriedades dentro de regiões, tratando os efeitos dos diferentes níveis como efeitos randômicos.

Nos últimos anos tem havido um interesse crescente em considerar fatores definidos em múltiplos níveis em pesquisas de saúde pública. Análises multiníveis têm emergido como uma estratégia analítica que podem lidar com essa necessidade, ao permitirem o exame simultâneo de fatores em nível de grupo e em nível de indivíduo (DIEZ-ROUX, 2000). Entende-se como multinível o fato dos dados assumirem uma característica de dependência entre si e não considerá-la, pode nos levar a erros na interpretação das estimativas. O fato é que há uma noção clara que os indivíduos estão sob a influência de um contexto social, possibilitando que pesquisas empíricas investiguem a interação entre atributos de grupos e atributos individuais (agrupados). DIEZ-ROUX (2000) conclui que modelar a variação entre grupos simultaneamente da variação individual, analisando variáveis individuais com propriedades de grupo, possibilita uma leitura mais clara, e leva em conta o quanto a variação em cada nível explica a variação dos desfechos clínicos.

Em 2001, TEUBER elaborou uma modelo sintetizando a distribuição na biosfera de antimicrobianos, genes de resistência e micróbios (Figura 3) a partir de diversas fontes. O cenário propõe que especialistas de diversas áreas do conhecimento (medicina humana e veterinária, produção de alimentos de origem animal e vegetal, órgãos governamentais e empresas farmacêuticas) são responsáveis pelo problema e devem somar esforços em busca de soluções, imediatamente. A evidência mais forte da relação direta entre uso de antimicrobianos em animais e a transmissão de organismos resistentes a antimicrobianos a humanos foi descrita por Graveland et al. (2010), em que animais de produção carregando MRSA foram mais frequentemente tratados com antimicrobianos. Neste mesmo estudo, pessoas em contato próximo com os animais tiveram um risco elevado de carregamento de MRSA. Bos et al. (2012) concluíram em estudo transversal com vitelos que associações entre idade, uso de antimicrobianos e prevalência de MRSA sugerem que tratamentos com antimicrobianos em grupos são uma condição para que

MRSA se mantenha presente após sua introdução, mas que outros fatores determinam sua transmissão, como o tempo de tratamento e a higiene da fazenda, por exemplo.



**FIGURA 3.** Modelo de distribuição e transferência de antibióticos, genes de resistência a antibióticos e micróbios na biosfera, produzido em 1997 para União Européia e Suíça. (TEUBER 2001)

3 ARTIGO 1

ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA “PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA”  
34 (7): 613-620, julho de 2014

**A formatação do artigo segue as normas da revista “Pesquisa Veterinária Brasileira”**

## Relação da idade na presença de bactérias resistentes a antimicrobianos em rebanhos leiteiros no Rio Grande do Sul, Brasil<sup>1</sup>

Waldemir Santiago-Neto<sup>1,2\*</sup>, Gustavo Machado<sup>1,2</sup>, Daniel S. Paim<sup>2</sup>, Thais de Campos<sup>2</sup>, Maria A. V. P. Brito<sup>3</sup>, Marisa R. I. Cardoso<sup>2</sup> e Luís G. Corbellini<sup>1,2</sup>

**ABSTRACT.-** Santiago-Neto W., Machado G., Paim D.S., Campos T., Brito M.A.V.P., Cardoso M.R.I. & Corbellini L.G. 2014. [Age related to the presence of antimicrobial resistant bacteria in twenty one dairy herds in Rio Grande do Sul, Brazil.] Relação da idade na presença de bactérias resistentes a antimicrobianos em vinte e um rebanhos leiteiros no Rio Grande do Sul, Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 34 (7): 613-620. Laboratório de Epidemiologia Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 91540-000, Brazil. E-mail: [wal\\_sanet@hotmail.com](mailto:wal_sanet@hotmail.com)

Bovine mastitis is an important disease in dairy cattle due to its high incidence and economic losses associated mainly with reduced milk production and treatment costs. The use of antimicrobials to treat clinical cases and at dry off raises the concern of selection of resistant bacterial strains. This also may reflect on public health, since resistant bacteria, such as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), may be transmitted to humans by direct contact with infected animals or by dairy products. The resistance of bacteria to antimicrobials has risen, in general, due to ineffective therapy. Studies in Brazil with unplanned samples show increase in resistance pattern, mainly in *S. aureus*. The exposition to repeated antimicrobial treatment throughout the consecutive lactations of cows may be a predisposing factor to development of antimicrobial resistance in bacteria that infect the udder. Thus, the aim of this study was to determine the possible causal association between antimicrobial resistance in bacteria isolated from bovine udder milk and animal data such as age and lactation period. Milk samples were collected from 21 dairy herds from Rio Grande do Sul, southernmost Brazilian state, randomly selected from the target population of 1656 semi-intensive dairy farms, stratified by herd size. The sample unit was considered the bacteria, and for the prevalence estimation a frequency of 35% *Staphylococcus* sp. penicillin resistant; an absolute precision of 12%; and 90% confidence level were used. Bacteria were isolated from composite milk samples obtained from all quarters of each cow after discarding the initial three or four streams of milk. To access potential risk factors, animal characteristics were obtained through an interview with the producers. Laboratory tests were done according to National Mastitis Council recommendations. A total of 242 isolates was obtained from 195 cows out of the total herd sample (251 cows). The prevalence of animal infections was described in groups according to the epidemiological profile: environmental, contagious and other bacteria. These were 57.3%, 26.3% and 11.2%, respectively of the

sampled animals. Antimicrobial susceptibility tests against 12 different antimicrobials were performed in 159 isolates. Altogether, 30% of the isolates tested showed resistance to at least three different antimicrobial groups and were classified as multidrug-resistant. Higher frequencies of resistance were observed against ampicillin to coagulase-negative staphylococci, followed by erythromycin to coagulase-positive staphylococci and tetracycline to streptococci. The logistic regression analysis showed a significant relationship between age of the cows and presence of multidrug-resistant coagulase-positive staphylococci and distribution of different class of bacteria, suggesting a competition dynamic throughout the ages ( $p < 0.05$ ). Animals with three to four years old had 13.7 times more chances ( $IC_{95\%} 1.4 - 130.2$ ;  $p = 0.02$ ) to have multidrug-resistant coagulase-positive staphylococci compared to those with two to three years. Time of exposure to infectious agents and consequent therapies suggests a greater chance of udder's colonization by resistant pathogens due to repeatedly selection pressure during lifetime.

**INDEX TERMS:** Antimicrobial resistance, coagulase-positive staphylococci, coagulase-negative staphylococci, ageing epidemiology.

**RESUMO.-** A mastite bovina é uma doença importante na bovinocultura de leite, devido à sua alta incidência e perdas econômicas associadas principalmente com a produção de leite reduzida e aos custos do tratamento. O uso de antimicrobianos para o tratamento de casos clínicos e no período seco tem levantado preocupações quanto à seleção de cepas bacterianas resistentes. Isso também pode refletir na saúde pública, uma vez que bactérias resistentes, como o *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente (MRSA), podem ser transmitidas aos seres humanos por contato direto com animais infectados ou produtos lácteos. A resistência das bactérias aos agentes antimicrobianos aumentou, em geral, devido a tratamentos ineficazes. Estudos realizados no Brasil com amostras não planejadas mostram aumento no padrão de resistência, principalmente em *S. aureus*. A exposição ao tratamento antimicrobiano repetido ao longo das lactações consecutivas de vacas pode ser um fator predisponente para o desenvolvimento da resistência antimicrobiana em bactérias que infectam o úbere. Assim, o objetivo deste estudo foi determinar a possível associação entre dados como idade e período de lactação e resistência antimicrobiana em bactérias isoladas a partir do leite bovino. As amostras de leite foram coletadas de 21 rebanhos leiteiros do Rio Grande do Sul, Brasil, selecionados aleatoriamente a partir da população-alvo de 1.656 explorações leiteiras semi-intensivas, estratificada por tamanho do rebanho. A bactéria foi considerada a unidade para o cálculo amostral, levando em consideração limitações logísticas, em que foram utilizados os seguintes parâmetros: uma frequência de 35% de *Staphylococcus* sp. resistentes à penicilina; um nível de confiança de 90%; e uma precisão absoluta de 12%. As bactérias foram isoladas de amostras de leite compostas de todos os quartos mamá-

rios de cada vaca após descartar os primeiros três ou quatro jatos de leite. Para acessar os potenciais fatores de risco, características dos animais foram obtidas através de uma entrevista com os produtores. Os exames laboratoriais foram realizados de acordo com as recomendações do National Mastitis Council. Um total de 242 isolados foi obtido de 195 vacas a partir da amostra do rebanho total (251 vacas). A prevalência de infecções foi descrita em grupos de acordo com o perfil epidemiológico: bactérias ambientais, contagiosas e outras. Estas perfizeram 57,3%, 26,3% e 11,2%, respectivamente, dos animais amostrados. Testes de suscetibilidade antimicrobiana contra 12 diferentes antimicrobianos foram realizados em 159 isolados. No total, 30% dos isolados testados mostraram resistência a pelo menos três grupos diferentes de antimicrobianos e foram classificados como multirresistentes. Foram observadas as frequências mais elevadas de resistência contra a ampicilina para os estafilococos coagulase-negativo, seguida de eritromicina para estafilococos coagulase-positivo e tetraciclina para estreptococos. A análise de regressão logística mostrou uma relação significativa entre a idade das vacas e a presença de estafilococos coagulase-positivo multirresistentes e distribuição de classes diferentes de bactérias nos diferentes estratos etários, o que sugere uma concorrência dinâmica ao longo do tempo ( $p < 0,05$ ). Animais com três a quatro anos tiveram 13,7 vezes mais chances ( $IC_{95\%}$  1,4 – 130,2,  $p = 0,02$ ) de ter estafilococos coagulase-positivo multirresistentes em comparação com aqueles com dois ou três anos. O tempo de exposição a agentes infecciosos e consequentes terapias sugere uma maior chance de colonização do úbere por patógenos resistentes devido à pressão de seleção repetida durante a vida.

**TERMOS DE INDEXAÇÃO:** Resistência antimicrobiana, estafilococos coagulase-positivo, estafilococos coagulase-negativa; epidemiologia do envelhecimento.

## INTRODUÇÃO

A mastite bovina é uma doença importante para a bovinocultura leiteira, devido à alta incidência de casos clínicos e subclínicos e aos prejuízos econômicos que acarreta. A mastite resulta da infecção da glândula mamária, principalmente por bactérias dos gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus* e Gram-negativos do grupo dos coliformes (Ruegg 2012).

Na pecuária leiteira, é a doença que demanda maior emprego de antimicrobianos (Erskine et al. 2004) administrados para tratamento dos casos clínicos e na terapia da vaca seca. Em alguns estudos, o uso terapêutico e preventivo de antimicrobianos na mastite não foi relacionado ao aumento ou emergência da resistência entre os patógenos da mastite (Erskine et al. 2002, Erskine et al. 2004). Entretanto, variações nos índices de resistência são observadas entre regiões ou rebanhos devido à pressão seletiva exercida pelo agente antimicrobiano (O'Brien 2002

apud Rajala-Schultz et al. 2004). A antibioticoterapia executada contínua e imprudentemente é relatada como fator determinante para a seleção de cepas resistentes, podendo repercutir sobre a saúde pública (Piddock 1996, OIE 2008b). Estudos têm sugerido o potencial de seleção de cepas devido ao tratamento no período seco e à idade das vacas em combinação com alta contagem de células somáticas e histórico de mastite clínica (Rajala-Schultz et al. 2009), demonstrando a complexidade de avaliar-se tal risco.

Entre os agentes da mastite, as bactérias do gênero *Staphylococcus* têm apresentado maior resistência aos antimicrobianos, sobretudo *Staphylococcus aureus*, com destaque para a resistência aos antibióticos beta-lactâmicos (Brito et al. 2001, Pitkälä et al. 2004, Olsen, Christensen & Aarestrup 2006,). Entretanto, estafilococos coagulase-negativos (ECN) têm sido indicados como protetores contra infecções por patógenos mais virulentos (Schukken et al. 1989) e, por outro lado, tendem a ser mais resistentes quando comparados a *S. aureus* e com facilidade desenvolvem multirresistência (Pitkälä et al. 2004), servindo como reservatório de genes de resistência.

A idade é um reconhecido fator de risco, ou predisponente, contribuindo para a ocorrência de doenças multifatoriais, sendo o conhecimento do seu papel relevante particularmente para a estimação de morbimortalidade das doenças em populações e identificação de causas das doenças (Thrusfield 2010). O monitoramento periódico das mudanças na prevalência de bactérias resistentes a nível animal constitui uma parte essencial na estratégia destinada a limitar a propagação da resistência antimicrobiana e otimiza a escolha dos antimicrobianos utilizados na terapia (OIE 2008a).

O objetivo deste estudo foi avaliar a possível associação entre variáveis de desfecho (1 e 2) e variáveis preditoras (3): (1) a prevalência de bactérias relevantes causadoras de mastite na glândula mamária de bovinos, destacando o gênero *Staphylococcus*, e (2) a resistência dessas bactérias aos antimicrobianos, e (3) fatores ligados ao hospedeiro como a idade, número de partos e dias em lactação.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Amostragem

O cálculo da amostra considerou a bactéria como unidade primária visando saber quantos rebanhos seriam necessários para obter o número de isolados de *Staphylococcus* spp. necessário para estimar a frequência de resistência aos antibióticos beta-lactâmicos. Os parâmetros utilizados para o cálculo da amostra foram: frequência de *Staphylococcus* spp. resistentes à penicilina de 35% (Brito et al. 2001); precisão absoluta de 12%; e nível de confiança de 90%. O

cálculo de amostra baseou-se no gênero *Staphylococcus*, por ser este o microrganismo mais isolado na glândula mamária de bovinos.

Em janeiro de 2010, foram amostrados aleatoriamente 21 rebanhos da população alvo, constituída de 1656 propriedades leiteiras de criação semi-intensiva do Rio Grande do Sul estratificadas por tamanho de rebanho. Foram coletadas amostras de leite de todas as vacas em lactação nas propriedades amostradas, totalizando 251 animais. As amostras foram compostas, isto é, formadas por alíquotas de leite colhidas dos quartos de cada vaca. Antes da coleta foi feita a antissepsia dos tetos e descarte dos primeiros jatos. As amostras foram acondicionadas em frascos individuais estéreis e armazenadas em caixa isotérmicas. Dados dos animais – idade, número de lactações e período em lactação – foram obtidos por meio de entrevista realizada com os produtores. As análises foram realizadas no Setor de Medicina Veterinária Preventiva da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

#### Exames microbiológicos

A cultura das amostras de leite foi realizada semeando-se volumes de 0,01mL em ágar sangue contendo 5% de sangue desfibrinado de carneiro, seguindo-se incubação a 37° C durante 24-48 h. As colônias foram analisadas segundo recomendações do National Mastitis Council (NMC 2004) quanto à morfologia, padrões hemolíticos, coloração de Gram e testes bioquímicos. Os microrganismos isolados foram classificados em grupos (contagioso, ambiental e outros), considerando a epidemiologia da infecção do úbere.

#### Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos

Foi empregado o teste de ágar-difusão para testar a suscetibilidade dos isolados de *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. e *Enterococcus* spp., seguindo as recomendações do Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI 2008). *S. aureus* ATCC 29213 foi empregado como controle dos testes. Foram testados discos impregnados com os seguintes antimicrobianos (Oxoid, U.S.A., Columbia, Maryland): ampicilina 10µg, cefalotina 30µg, ceftiofour 30µg, clindamicina 2µg, enrofloxacina 5µg, eritromicina 15µg, gentamicina 10µg, oxacilina 1µg, penicilina 10 Unidades, trimetoprima/ sulfametoxazol 1,25/23,75µg; sulfonamida 300µg; e tetraciclina 30µg. De acordo com o critério interpretativo das zonas de inibição, as bactérias foram classificadas em resistentes (R), intermediárias (I) ou suscetíveis (S) aos antimicrobianos testados. Bactérias resistentes a três ou mais classes de antimicrobianos foram consideradas multirresistentes (Schwarz et al. 2010).

#### Análise estatística

As características dos animais – idade, período de lactação, raça e número de partos – foram descritas quanto às distribuições de frequência e compiladas aos resultados dos isolados e dos perfis de sensibilidade encontrados. Os indicadores analisados na estatística descritiva foram: (1) animais com pelo menos um patógeno relevante em mastite bovina (animais infectados), (2) infecções por *Staphylococcus* spp. e (3) infecções por *Staphylococcus* spp. multirresistentes. As variáveis: idade animal, partos e dias em lactação foram categorizadas de acordo com seus quartis por faixa etária em anos [(1) dois a três, (2) quatro a cinco, (3) seis a sete e (4) mais que sete], por número de partos [(1) um ou dois, (2) três ou quatro e (3) mais de quatro], e por quartis dos dias em lactação [(1) até 82, (2) 82 a 180, (3) 180 a 245 e (4) mais que 245].

A unidade amostral utilizada na análise estatística para verificar a hipótese de associação entre multirresistência e o hospedeiro foi a vaca lactante. Foram incluídos na regressão logística 156 animais, os quais dispunham de dados completos para a análise, a saber, idade, número de partos e período de lactação (variáveis preditoras) e, também, resultados de isolamento e perfis de sensibilidade aos antimicrobianos (variáveis de desfecho). Foram construídos dois modelos de regressão logística univariada para verificar se haveria associação entre as variáveis preditoras mencionadas e as variáveis de desfecho – (1) colonização por *Staphylococcus* spp. (coagulase-negativos e positivos) e (2) colonização por um microrganismo resistente (a pelo menos uma classe ou a mais de três classes antimicrobianas). A associação foi investigada a nível individual utilizando valor de  $p$  crítico 0,05. O modelo de regressão foi construído no SAS 9.2®. Variáveis com associação significativa foram consideradas para discussão do desfecho. Odds ratios (ORs), valores de  $p$  e intervalos de confiança de 95% foram reportados. Além disso, a partir da observação da estatística descritiva foi utilizado o teste de qui-quadrado para verificar a diferença de resistência à tetraciclina entre *Streptococcus* spp. e *Staphylococcus* spp.

## RESULTADOS

### Estatística descritiva

O número de animais por rebanho variou de três a 53, sendo a moda sete animais. Em 67% dos rebanhos (14/21) havia no máximo dez animais em lactação. A raça predominante foi a Holandesa (95%). A idade média dos animais ( $n = 156$ ) foi 5,2 anos; o número médio de partos foi 3,2; e a média dos dias em lactação foi 181,2. Em 76% dos rebanhos foram encontrados agentes associados à mastite em pelo menos um animal (16/21).

Estafilococos coagulase-positivo (ECP), ECN, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium* sp., *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Enterococcus* sp. e *Escherichia coli*

foram identificados nas amostras, perfazendo 242 isolados ao total (Quadro 1). Em 77,7% dos animais (195/251) houve o isolamento de pelo menos uma bactéria a partir das amostras de leite (Quadro 1), sendo que destes, 22,5% (44/195) apresentaram crescimento de mais de um agente e 12,3% (24/195) de dois grupos epidemiológicos distintos (por exemplo, um ambiental e outro contagioso na mesma amostra). As prevalências das colonizações nos 195 animais, descritas por grupos epidemiológicos, foram: ambientais – 74% (IC<sub>95%</sub> 67,8 – 80,2), contagiosas – 40% (IC<sub>95%</sub> 33,1 – 46,9) e outras – 5% (IC<sub>95%</sub> 2 – 7,9). No grupo ‘ambiental’, destacaram-se os ECN (34,2%; IC<sub>95%</sub> 28,1 – 39,9), e no grupo ‘contagioso’, os ECP, ao qual pertence *S. aureus* (21%; IC<sub>95%</sub> 16 – 26).

Do total de isolados analisados pelo teste de suscetibilidade (n = 159), 58,5% (93/159) apresentavam resistência ao menos a um dos antimicrobianos. Os maiores índices de resistência foram para o grupo dos beta-lactâmicos testados (44%) e eritromicina (42,8%). O maior percentual de resistência dos ECN foi justamente aos beta-lactâmicos (48,8%), enquanto que 50,9% dos ECP isolados foram resistentes à eritromicina. Dentre todos os isolados resistentes, 58,5% (93/159) apresentaram resistência ao menos a um antimicrobiano e 30,2% (48/159) ao menos a três grupos antimicrobianos (multirresistentes) (Quadro 2).

A análise de regressão logística, considerando animais que apresentavam dados demográficos completos e respectivos microrganismos isolados submetidos ao teste de suscetibilidade a antimicrobianos (gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus*), evidenciou a associação significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre (a) prevalência das principais bactérias isoladas (ECP e ECN – variáveis de desfecho) e a faixa etária (variável explanatória) e (b) a presença de resistência aos antimicrobianos testados (variável de desfecho) e a faixa etária e número de partos das vacas (variáveis explanatórias). As distribuições de prevalência de colonização e de resistência estão demonstradas no Quadro 3, por estrato de idade e de número de partos de acordo com a análise.

#### Prevalência bacteriana e idade como fator de risco

Houve 3,5 vezes mais chances de vacas com mais de sete anos apresentarem colonização por ECP quando comparadas com vacas de dois a três anos de idade (OR = 3,56; IC<sub>95%</sub> = 1,3 – 9,7;  $p = 0,01$ ) (Quadro 4). Antagonicamente, o risco de colonização por ECN foi 73% menor em vacas mais velhas do que sete anos em comparação com a faixa etária de referência, mais nova (dois a três anos) (OR = 0,27; IC<sub>95%</sub> = 0,1 – 0,7;  $p = 0,01$ ) (Quadro 5).

#### Resistência a antimicrobianos e idade/ número de partos como preditores

Vacas na faixa etária de quatro a cinco anos tiveram um risco 13,7 vezes maior em relação à faixa etária de dois a três anos de estarem colonizadas por ECP multirresistentes (OR = 13,75; IC<sub>95%</sub> 1,4 – 130,2;  $p = 0,02$ ) (Quadro 6). Vacas com três a quatro partos tiveram um risco 2,7 vezes maior do que aquelas com um a dois partos (OR = 2,71; IC<sub>95%</sub> 1,1 – 6,5;  $p = 0,02$ ) de possuírem agentes de mastite com resistência a pelo menos uma classe antimicrobiana (Quadro 7). Na categoria seguinte, de animais com mais de quatro partos, houve uma inversão da direção do efeito, com menores chances de colonização por bactérias resistentes (Quadro 7). Neste desfecho, *Streptococcus* spp. tiveram um maior percentual (83,3%) (Quadro 2), sendo 60% destes ambientais (dados não demonstrados). Observou-se uma razão de chances de resistência à tetraciclina em *Streptococcus* spp. de 14,7 vezes maior que em *Staphylococcus* spp. pelo teste do qui-quadrado (IC<sub>95%</sub> 4,8 – 45,0;  $p < 0,001$ ).

## DISCUSSÃO

O plano amostral baseado na estimativa de *Staphylococcus* spp. resistentes à penicilina levou à coleta de todas as vacas em lactação por rebanho e, por conseguinte, houve uma prevalência maior de bactérias ambientais, predominando os ECN. Os ECN são sabidamente comensais dos tecidos mamários (Taponen & Pyörälä 2009) e alguns pesquisadores têm apontado seu papel na proteção do úbere contra infecções por bactérias mais patogênicas (Schukken et al. 1989 apud Rajala-Schultz et al. 2004). Curiosamente, a regressão logística evidenciou essa possível dinâmica competitiva nas populações de bactérias conforme a idade das vacas. A definição de quando um animal é considerado “velho” é complexa, mas, de maneira geral, pode ser determinada demograficamente quando apenas 25% da população estão acima da sua idade (Grundy 2002 apud Thrusfield 2010). Vacas velhas, com mais de sete anos, tiveram menos chances de apresentar ECN e 3,5 vezes mais chances de estarem colonizadas por ECP (ambos com  $p < 0,05$ ).

Mastite bovina é a razão mais comum para o uso de antimicrobianos em vacas leiteiras e a resistência dos agentes etiológicos aos antimicrobianos tem recebido interesse nos últimos anos (Rajala-Schultz et al. 2004) devido às terapias ineficazes ou subterapêuticas dadas aos rebanhos (Erskine et al. 2002). A terapia no período seco de lactação é executada em todas as vacas na maioria das propriedades e consiste em formulações com atividade antimicrobiana prolongada. A persistência deste tipo de tratamento deve, portanto, proporcionar uma forte pressão seletiva para a aquisição, transmissão e manutenção de genes de resistência a drogas (Berghash et al. 1983 apud Erskine et al. 2002). A hipótese deste estudo foi relativa à resistência ser maior em bactérias de múltíparas em comparação às de primíparas devido ao período de pressão seletiva por exposição a antimicrobianos. Isto foi verificado em duas instâncias, entre

todas as bactérias testadas resistentes a pelo menos um antimicrobiano, com maior razão de chances nas multíparas com três ou quatro partos comparadas às primíparas com um ou dois partos; e entre ECP multirresistentes, com maior razão de chances na faixa etária de três a quatro anos comparadas à faixa etária de um a dois anos.

A suscetibilidade antimicrobiana *in vitro* é uma condição prévia ao tratamento, mas não garante a eficácia *in vivo* (Constable & Morin 2003 apud Guardabassi, Jensen & Kruse 2010). A resistência a antimicrobianos resulta de interações entre antibióticos, microrganismos e ambiente (Witte 2000 apud Rajala-Schultz et al. 2004, Levin 2001, O'Brien 2002 apud Rajala-Schultz et al. 2004). Dois fatores envolvidos são a pressão seletiva dos antibióticos e a presença de genes de resistência (Levy 1997, Witte 2000 apud Rajala-Schultz et al. 2004), que podem ser transmitidos verticalmente ou por transferência horizontal de elementos móveis de DNA (Chambers 2001 apud Rajala-Schultz et al. 2004, Sefton 2002 apud Rajala-Schultz et al. 2004). A exposição a concentrações insuficientes da droga proporciona a chamada *janela de seleção* (Burgess 1999 apud Guardabassi, Jensen & Kruse 2010). *Streptococcus* spp. apresentaram mais chances de serem resistentes à tetraciclina comparados aos *Staphylococcus* spp. Dentre todas as bactérias testadas, vacas com três ou quatro partos tiveram 2,7 mais chances que o grupo com menos partos – um ou dois – de estarem colonizadas por bactérias resistentes a pelo menos uma classe antibiótica (Quadro 7). Observou-se uma curva de risco típica da presença de resistência a pelo menos uma classe antimicrobiana no decorrer das três classes de partos, com menor risco nas com um ou dois partos, maior nas vacas com três ou quatro (OR = 2,7) e menor novamente nas com mais de quatro (OR = 0,7). Isso pode estar relacionado à eliminação de animais velhos com infecção crônica, ou por outras causas, que normalmente seleciona o melhor estrato de animais.

A resistência de *S. aureus* às penicilinas tem aumentado (Olsen, Christensen & Aarestrup 2006, Piddock 1996 apud Guardabassi, Jensen & Kruse 2010) porque, de um modo geral, a terapia é ineficiente pelo acesso antimicrobiano às bactérias ser dificultado por fibroses decorrentes da patogenia (Radostits, Leslie & Fetrow 1994), além de tratamentos ineficazes ou incompletos. As taxas de cura variam entre 15 e 85%, dependendo do número de lactações, contagem de células somáticas antes do tratamento e produção de  $\beta$ -lactamase (Barkema, Schukken & Zadocks 2006 apud Taponen & Pyörälä 2009). Em muitos casos, os animais tornam-se cronicamente infectados e reservatórios de *S. aureus*. No presente estudo a prevalência de colonização por ECP de 21% foi obtida a partir da população amostrada em lactação desconsiderando o seu estado clínico.

Quanto à resistência à penicilina por *S. aureus*, esta costuma ser menor do que em ECN, salvo exceções (Pitkälä et al. 2004, Schwarz et al. 2010). Na Índia, por exemplo, os resultados

variaram largamente (Mubarack et al. 2012, Mohanty et al. 2013) e estudos no Brasil com amostras não planejadas mostram variabilidade no padrão de resistência (Silva et al. 2012, Oliveira et al. 2012), e aumento quando comparados com estudos mais antigos (Brito et al. 2001). Entretanto, de maneira geral, fica deficiente a comparação dos resultados devido a diferenças na metodologia, principalmente devido a critérios de amostragem, e servem apenas como referência. Resistência à penicilina por ECN de mastite bovina foi 31,7% em Ohio, EUA (Rajala-Schultz et al. 2004) e 32% na Finlândia (Pitkälä et al. 2004). Pesquisadores suecos (Persson Waller et al. 2011) relatam que não houve muita resistência a antimicrobianos em estudo, com exceção à penicilina, por ECN em mastites clínicas e subclínicas, o que é corroborado em nosso estudo, em que a resistência por ECN ao grupo das penicilinas foi 48,8%, embora também houve resistência considerável à eritromicina (41,6%). Pesquisadores estadunidenses de Ohio (Rajala-Schultz et al. 2004) encontraram 43,9% de resistência a pelo menos um antibiótico por ECN, e indicam o uso de terapias no período seco como sendo fator de risco para o aparecimento de resistência (Rajala-Schultz et al. 2009). Em estudo na Holanda, 30% de ECN foram resistentes a mais de um composto antimicrobiano em rebanhos leiteiros (Sampimon 2009). Estes resultados estão em consonância com um estudo que avaliou a correlação entre o uso de antimicrobianos veterinários e a resistência antimicrobiana em animais de produção de sete países europeus (Chantziaras et al. 2014), sendo a Holanda um dos maiores consumidores de antimicrobianos e os países nórdicos, uns dos menores. Encontramos resistência a pelo menos uma classe de antimicrobianos em 55,9% dos ECN testados e, a três ou mais classes, em 23,8% (Quadro 2). A coleta de dados de consumo de antimicrobianos através de um sistema de armazenamento padrão a nível populacional é altamente recomendável para elucidação dos níveis de resistência encontrados.

Eritromicina e clindamicina estão entre os fármacos selecionados para o tratamento de mastite bovina estafilocócica (Dingwell et al. 2003, Yu & Li 2005) e a resistência a eles ocorre por metilação ou mutação do sítio alvo, ativação do efluxo do antibiótico, e inativação da droga. Pesquisadores chineses (Wang et al. 2008) verificaram resistência à eritromicina – 93,1% e à clindamicina – 36,1% por *S. aureus* mais elevada que neste estudo, 46,3% e 31,7%, respectivamente (Quadro 2), porém tais antimicrobianos foram aprovados na China para o tratamento de mastite estafilocócica. Resistência por ECN a macrolídeos e lincosamidas foi relatada na Alemanha em 6-7% (Lüthje & Schwarz 2006). Obtiveram-se valores de resistência à eritromicina e à clindamicina por ECN de 41,6% e 16,6%, respectivamente. Os macrolídeos, bem como as fluorquinolonas e as cefalosporinas de 3ª e 4ª geração, têm sido listados como criticamente importantes à saúde pública pela Organização Mundial da Saúde, por serem as únicas ou umas das poucas alternativas para tratar doenças humanas severas e causadas por microrganismos de fon-

tes não humanas ou que possam adquirir genes de resistência de fontes não humanas (WHO 2011).

Entre os objetivos da epidemiologia, o conhecimento da distribuição das doenças em populações nos diferentes estratos de idade é particularmente relevante para estimação de morbimortalidades e identificação de causas (Thrusfield 2007). A epidemiologia é baseada na premissa de que doença e saúde não são distribuídas aleatoriamente na população, e é função da epidemiologia identificar padrões das doenças e fatores causais associados, alguns dos quais são relacionados à idade (Satariano 2006). A idade é frequentemente classificada como um fator predisponente, refletindo um conhecimento inadequado do seu papel nos níveis celular, molecular e bioquímico (Thrusfield 2010). A regressão logística evidenciou associação significativa entre a presença de ECP multirresistentes e a idade dos bovinos em lactação, especificamente na faixa intermediária de quatro a cinco anos que coincide com a idade média dos animais (5,2 anos). A chance de colonização por cepas de ECP multirresistentes foi 13,7 vezes maior do que aquelas com dois a três anos. Tal fato pode estar relacionado às chances de animais velhos, comparados aos de primeira lactação, terem tido maior contato com cepas resistentes (Rajala-Schultz et al. 2004).

## CONCLUSÃO

Este trabalho verificou a distribuição de bactérias colonizadoras da glândula mamária segundo a idade de vacas leiteiras amostradas independentemente do estado clínico. As regressões logísticas evidenciaram que há menor razão de chances de colonização por ECN e maior razão de chances por ECP em animais mais velhos comparados aos mais novos. A prevalência poderia aumentar devido à perda de cepas suscetíveis que são repostas por cepas carreando e expressando resistência em resposta aos tratamentos antimicrobianos. É possível que exista uma complexa dinâmica de competição entre bactérias comensais e patogênicas durante a vida produtiva de vacas leiteiras, por meio de interações seletivas de antimicrobianos. A resistência identificada nas classes intermediárias (etária e número de partos) levanta a hipótese de uma convergência do ápice da produção de leite e estado imunitário do hospedeiro com a exposição a patógenos e consecutivos tratamentos antimicrobianos numa escala populacional. Conforme o passar dos anos, há o descarte sistemático de animais debilitados por mastite ou outras enfermidades, justificando o baixo risco de colonização por bactérias resistentes nas vacas mais velhas. A resistência a fármacos de importância crítica no tratamento de enfermidades em humanos representa um importante risco à saúde pública. O uso de antimicrobianos deve ser extremamente criterioso e o uso preventivo, abolido, como tem sido feito em outras cadeias de produção animal, a fim de interromper o estímulo à resistência. Além disso, propõe-se a adoção da idade

como parâmetro nos estudos populacionais de resistência a antimicrobianos, visto a distribuição heterogênea nas faixas etárias de bovinos.

## REFERÊNCIAS

- Barkema, H.W., Schukken, Y.H. & Zadocks, R.N. 2006. Invited review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. J. Dairy Sci. 89: 1877-1895. (Apud Taponen & Pyörälä 2009)
- Berghash, S.R., Davidson, J.N., Armstrong, J.C. & Dunny, G.M. 1983. Effects of Antibiotic Treatment of Nonlactating Dairy Cows on Antibiotic Resistance Patterns of Bovine Mastitis Pathogens. Antimicrob. Agents Chemother. 24(5): 771-776. (Apud Erskine et al. 2002)
- Burgess, D.S., 1999. Pharmacodynamic principles of antimicrobial therapy in the prevention of resistance. Chest. 115: 195-233. (Apud Guardabassi, Jensen & Kruse 2010)
- Brito, M.A.V.P.; Brito, J.R.F.; Silva, M.A.S. & Carmo, R.A. 2001. Concentração mínima inibitória de dez antimicrobianos para amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de infecção intramamária bovina. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 53 (5): 531-537.
- Chambers, H.F., 2001. Antimicrobial agents: general considerations. In: Hardman, J.G., Limbird, L.E. (Eds.), Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. McGraw-Hill, New York, p.1143-1170. (Apud Rajala-Schultz et. al 2004)
- Chantziaras, I., Bayen, F., Callens, B. & Dewulf, J. 2014. Correlation between veterinary antimicrobial use and antimicrobial resistance in food-producing animals: a report on seven countries. J. Antimicrob. Chemother. 69 (3): 827-834.
- CLSI. 2008. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals; Approved Standard – Third Edition. CLSI document M31-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Constable, P.D. & Morin, D.E. 2003. Treatment of clinical mastitis. Using antimicrobial susceptibility profiles for treatment decisions. In: Sears P. Guest Editor, Bovine Mastitis. Vet. Clin. North Am., Food Anim. Pract. 19: 139-55. (Apud Guardabassi, Jensen & Kruse 2010)
- Dingwell, R., Leslie, K.E., Duffield, T.F., Schukken, Y.H., DesCoteaux, L., Keefe, G.P., Kelton, D.F., Lissemore, K.D., Shewfelt, W., Dick, P. & Bagg, R. 2003. Efficacy of intramammary tilmicosin and risk factors for cure of *Staphylococcus aureus* infection in the dry period. J. Dairy Sci. 86: 159-168.

- Erskine, R., Cullor, J., Schaellibaum, M., Yancey, B. & Zecconi, A. 2004. Bovine mastitis pathogens and trends in resistance to antibacterial drugs. In: National Mastitis Council Annual Meeting, 43, 2004, Charlotte NC. Proceedings... Charlotte: NMC, p. 400-414.
- Erskine, R.J., Walker, R.D., Bolin, C.A., Bartlett, P.C. & White, D.G. 2002. Trends in antibacterial susceptibility of mastitis pathogens during a seven-year period. *J. Dairy Sci.* 85: 1111-1118.
- Grundy, E.M.D. 2002. The epidemiology of aging. Em: Brockelhurst's Textbook of Geriatric Medicine and Gerontology, 6th Edit., Tallis, R.C., Fillit H.M., Eds. Churchill Livingstone, London, pp. 3-20. (Apud Thrusfield 2010)
- Guardabassi, L., Jensen, L.B. & Kruse, H. 2010. Guia de Antimicrobianos em Veterinária. Porto Alegre: Artmed, 267p.
- Levin, B.R. 2001. Minimizing potential resistance: a population dynamics view. *Clin. Infect. Dis.* 33 (3): 161-169.
- Levy, S.B. 1997. Antibiotic resistance: an ecological imbalance. In: Chadwick, D.J., Goode, J. (Eds.), Antibiotic Resistance: Origins, Evolution, Selection and Spread. Ciba Foundation Symposium 207. Wiley, Chichester, p.1-14.
- Lüthje, P., Schwarz, S. 2006. Antimicrobial resistance of coagulase-negative staphylococci from bovine subclinical mastitis with particular reference to macrolide-lincosamide resistance phenotypes and genotypes. *J. Antimicrob. Chemother.* 57: 966-969.
- Mohanty, N. N., Das, P., Pany, S. S., Sarangi, L. N., Ranabijuli, S. & Panda, H. K. 2013. Isolation and antibiogram of *Staphylococcus*, *Streptococcus* and *Escherichia coli* isolates from clinical and subclinical cases of bovine mastitis. *Vet. World.* 6(10): 739-743.
- Mubarack, H. M., Doss, A., Vijayasanthi, M. & Venkataswamy, R. 2012. Antimicrobial drug susceptibility of *Staphylococcus aureus* from subclinical bovine mastitis in Coimbatore, Tamilnadu, South India. *Vet. World.* 5(6): 352-355.
- National Mastitis Council. 2004. Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection and determination of milk quality. 4. ed. Verona: NMC, p.47.
- O'Brien, T.F. 2002. Emergence, spread, and environmental effect of antimicrobial resistance: how use of an antimicrobial anywhere can increase resistance to any antimicrobial anywhere else. *Clin. Infect. Dis.* 34 (3): 78-84. (Apud Rajala-Schultz et. al 2004)

- OIE. 2008a. World Organization for Animal Health. Harmonisation of national antimicrobial resistance surveillance and monitoring programs. In: OIE. Terrestrial animal health code. Paris: OIE, 2008b. (Capítulo 6.5. p. 1-7). Disponível em [http://www.oie.int/eng/normes/Mcode/en\\_sommaire.htm](http://www.oie.int/eng/normes/Mcode/en_sommaire.htm). Acesso em 20/11/2011.
- OIE. 2008b. World Organization for Animal Health. Risk assessment for antimicrobial resistance arising from the use of antimicrobials in animals. In: OIE. Terrestrial animal health code. Paris: OIE, 2008c. (Capítulo 6.8. p. 1-6). Disponível em [http://www.oie.int/eng/normes/Mcode/en\\_sommaire.htm](http://www.oie.int/eng/normes/Mcode/en_sommaire.htm). Acesso em 20/11/2011.
- Oliveira, U. V., Galvão, G. S., Ribeiro, A. R. P., Andrioli, J. L. & Munhoz, A. D. 2012. Eficácia *in vitro* da gentamicina sobre bactérias isoladas de vacas com mastite subclínica na microrregião Ilhéus-Itabuna, Bahia. *Rev. Bras. Med. Vet.* 34(3): 213-218.
- Olsen, J. E., Christensen, H. & Aarestrup, FM. 2006. Diversity and evolution of blaZ from *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *J. Antimicrob. Chemother.* 57: 450-60.
- Persson Waller, K., Aspán, A., Nyman, A., Persson. Y. & Grönlund Andersson, U. 2011. CNS species and antimicrobial resistance in clinical and subclinical bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 152: 112-116.
- Piddock, L. J. V. 1996. Does the use of antimicrobial agents in veterinary medicine and animal husbandry select antibiotic-resistant bacteria that infect man and compromise antimicrobial therapy? *J. Antimicrob. Chemother.* 38: 1-3. (Apud Guardabassi, Jensen & Kruse 2010)
- Pitkälä, A., Haveri, M., Pyorala, S., Myllys, V. & Honkanen-Buzalski, T. 2004. Bovine mastitis in Finland 2001 – prevalence, distribution of bacteria and antimicrobial resistance. *J. Dairy Sci.* 87: 2433-41.
- Radostits, O.M., Leslie, K.E. & Fetrow, J. 1994. Mastitis control in dairy herds. In: Radostits, O.M.; Leslie, K.E., Fetrow, J. *Herd health food animal production medicine*. Philadelphia: W.B. Saunders, p. 229-276.
- Rajala-Schultz, P.J., Smith, K.L., Hogan, J.S. & Love, B.C. 2004. Antimicrobial susceptibility of mastitis pathogens from first lactation and older cows. *Vet. Microbiol.* 102: 33-42.

- Rajala-Schultz, P.J., Torres, A.H., DeGraves, F.J., Gebreyes, W.A. & Patchanee, P. 2009. Antimicrobial resistance and genotypic characterization of coagulase-negative staphylococci over the dry period. *Vet. Microbiol.* 134: 55-64.
- Ruegg, P.L. 2012. New perspective in udder health management. *Vet. Clin. North Am., Food Anim. Pract.* 28: 149-163.
- Sampimon, O.C. 2009. Coagulase-negative staphylococci mastitis in Dutch dairy herds. Tese, Dutch Animal Health Service (GD), Deventer, The Netherlands.
- Schwarz, S., Silley, P., Simjee, S., Woodfords, N., Van Duijkeren, E., Johnson, A.P. & Gaastra, W. 2010. Assessing the susceptibility of bacteria obtained from animals. *J. Antimicrob. Chemother.* v. 65, p. 601-604.
- Schukken, Y.H., Van de Geer, D., Grommers, F.J., Smit, J. A.H. & Brand, A. 1989. Intramammary infections and risk factors for clinical mastitis in herds with low somatic cell counts in bulk milk. *Vet. Rec.* 125: 393 – 396. (Apud Rajala-Schultz et. al 2004)
- Sefton, A.M. 2002. Mechanisms of antimicrobial resistance. Their clinical relevance in the new millennium. *Drugs.* 62: 557-566. (Apud Rajala-Schultz et. al 2004)
- Silva, E. R., Pereira, A. M. G., Moraes, W. S., Santoro, K. R. & Silva, T. R. M. 2012. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus aureus* isolado de mastite subclínica bovina. *Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.* 13(3): 701-711.
- Taponen, S. & Pyörälä, S. 2009. Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis—Not so different from *Staphylococcus aureus*? *Vet. Microbiol.* 134: 29-36.
- Thrusfield, M.V. 2007. *Veterinary Epidemiology*, 3rd Edition, Blackwell Science, Oxford, pp. 22 – 33.
- Thrusfield, M.V. 2010. Ageing in Animal Populations – an Epidemiological Perspective. *J. Comp. Pathol.* 142: S22 – S32.
- Wang, Y., Wu, C.M., Lu, L.M., Ren, G.W.N., Cao, X.Y. & Shen, J.Z. 2008. Macrolide–lincosamide–resistant phenotypes and genotypes of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis. *Vet. Microbiol.* 130: 118-125.
- WHO. 2011. Critically important antimicrobials for human medicine. 3rd revision 2011. [http://who.int/foodborne\\_disease/resistance/cia/en](http://who.int/foodborne_disease/resistance/cia/en) (acessado em 14 de fevereiro, 2014).

- Witte, W. 2000. Ecological impact of antibiotic use in animals on different complex microflora: environment. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 14: 321-325. (Apud Rajala-Schultz et. al 2004)
- Yu, Y. & Li, J.S. 2005. The curative effects of clindamycin hydrochloride on dairly acute mastadenitis. *Chin. J. Vet. Drug.* 39: 37-42.

**Quadro 1. Distribuição das frequências de bactérias e de animais com isolamento de pelo menos uma bactéria a partir da amostra de leite, de acordo com as classes de microrganismos causadores de mastite, em 251 vacas em lactação amostradas de 21 rebanhos no Estado do Rio Grande do Sul**

<b>Classe de Microrganismos<sup>a</sup></b>	<b>Número de bactérias isoladas (N = 242) n (%)</b>	<b>Número de animais (N = 251) n (%)</b>
<b>Ambientais</b>	145(59,9)	144 (57,3)
<b>Contagiosos</b>	69 (28,5)	66 (26,3)
<b>Outros</b>	28 (11,6)	28(11,2)
<b>NHC (Negativos)</b>	-	56 (22,3)

<sup>a</sup> Ambientais – ECN (estafilococos coagulase-negativo), *Klebsiella* sp., *Escherichia coli*, *Enterococcus* sp. e gênero *Streptococcus* exceto *S. agalactiae*; Contagiosos – ECP (estafilococos coagulase-positivo), *S. agalactiae* e *Corynebacterium* sp.; Outros – *Arcanobacterium* sp., *Nocardia* sp. e leveduras ; NHC – não houve crescimento relevante conferindo um status negativo ao animal.

**Quadro 2. Distribuição dos microrganismos (n = 159) resistentes a diferentes classes de antimicrobianos isolados de amostras de leites de 251 vacas em lactação de 21 rebanhos no Rio Grande do Sul**

Classe de Antimicrobianos	Isolados resistentes no antibiograma (%)			
	ECN <sup>a</sup> (n=84)	ECP <sup>b</sup> (n=57)	<i>Streptococcus</i> (n=18)	Total (n=159)
Beta Lactâmicos (Ampicilina, Penicilina e Oxacilina)	48,8	43,8	22,2	44
Cefalosporinas (Ceftiofur/ Cefalotina)	10,7	31,6	11,1	18,2
Lincosamidas (Clindamicina)	16,6	35	33,3	25,2
Fluorquinolonas (Enrofloxacina)	19	29,8	5,5	21,4
Macrolídeos (Eritromicina)	41,6	50,9	22,2	42,8
Aminoglicosídeos (Gentamicina)	11,9	26,3	11,1	17
Inibidores do Ácido Fólico (Sulfametoxazol/Trimetoprim+Sulfa.)	15,5	24,5	27,8	20,1
Tetraciclina	5,9	10,5	55,5	13,2
Resistência a pelo menos uma classe de antimicrobianos	55,9	54,4	83,3	58,5
Multirresistentes ( $\geq 3$ classes)	23,8	40,35	27,8	30,2

<sup>a</sup>Estafilococos coagulase-negativo

<sup>b</sup>Estafilococos coagulase-positivo

**Quadro 3. Distribuição de frequência dos animais amostrados categorizados por faixa etária segundo a prevalência de colonização de bactérias e o resultado dos antibiogramas**

Faixa Etária	Número de animais	Prevalência		Resistência	
		ECN <sup>a</sup>	ECP <sup>b</sup>	Bactérias a pelo menos um antimicrobiano	ECP <sup>b</sup> multirresistentes
2-3 anos	45	31	11	25	1
4-5 anos	49	24	19	33	11
6-7 anos	34	16	11	20	5
> 7 anos	28	11	15	14	6
<b>Total</b>	156	84 (53,8%)	56 (35,9%)	92 (60,1%)	23 (16,7%)

<sup>a</sup>Estafilococos coagulase-negativo

<sup>b</sup>Estafilococos coagulase-positivo

### Prevalência e idade

**Quadro 4. Resultado da regressão logística para presença de ECP<sup>a</sup> (n =156)**

Faixa Etária	<i>p</i> (wald)	OR <sup>b</sup>	IC 95%	
2-3 anos	-	1	-	-
4-5 anos	0,1392	1,958	0,804	4,768
6-7 anos	0,4387	1,478	0,55	3,975
> 7 anos	0,0133	3,566	1,303	9,761

<sup>a</sup>Estafilococos coagulase-positivo

<sup>b</sup>Odds ratio

**Quadro 5. Resultado da regressão logística para presença de ECN<sup>a</sup> (n = 156)**

Faixa Etária	<i>p</i> (wald)	OR <sup>b</sup>	IC 95%	
2-3 anos	-	1	-	-
4-5 anos	0,0523	0,434	0,187	1,088
6-7 anos	0,0714	0,425	0,168	1,077
> 7 anos	0,0101	0,276	0,104	0,736

<sup>a</sup>Estafilococos coagulase-negativo

<sup>b</sup>Odds ratio

### Resistência e idade

**Quadro 6. Resultado da regressão logística para presença de ECP<sup>a</sup> multirresistentes (n = 156)**

Faixa Etária	<i>p</i> (wald)	OR <sup>b</sup>	IC 95%	
2-3 anos	-	1	-	-
4-5 anos	0,0223	13,75	1,452	130,236
6-7 anos	0,08	8,333	0,776	89,467
> 7 anos	0,106	6,667	0,668	66,532

<sup>a</sup>Estafilococos coagulase-positivo

<sup>b</sup>Odds ratio

### Resistência e número de partos

**Quadro 7. Resultado da regressão logística para presença de bactérias resistentes a pelo menos uma classe de antimicrobianos (n = 148)**

Número de partos	<i>p</i> (wald)	OR <sup>a</sup>	IC 95%	
1-2	-	1	-	-
3-4	0,0268	2,713	1,122	6,564
>4	0,4936	0,762	0,35	1,66

<sup>a</sup>Odds ratio

## 4 ARTIGO 2

ARTIGO A SER SUBMETIDO À COMISSÃO EDITORIAL DA REVISTA “JOURNAL OF  
DAIRY SCIENCE”

**A formatação do artigo segue as normas da revista “Journal of Dairy Science”**

Associated factors for antimicrobial resistance in dairy cattle bacteria: a multilevel analysis in  
Brazil

W. Santiago Neto<sup>1</sup>, G. Machado<sup>1</sup>, S. Comey<sup>2</sup>, M. R. I. Cardoso<sup>1</sup>, Adil K. Vaz<sup>3</sup>, Lisiane A. Martins<sup>4</sup>, Marcos V. Santos<sup>5</sup>, Geraldo M. Costa<sup>6</sup>, Rinaldo A. Mota<sup>7</sup>, Letícia C. Mendonça<sup>8</sup>, Carla C. Lange<sup>8</sup>, Guilherme N. Souza<sup>8</sup>, M. A. V. P. Brito<sup>8</sup>, L. G. Corbellini<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Preventive Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary, University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>2</sup>Department of Statistics, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>3</sup>Center of Agroveterinary Sciences, Univesity of Santa Catarina State, Lages, Brazil

<sup>4</sup>Laboratory of Preventive Veterinary Medicine and Public Health, Paranaense University, Umuarama, Brazil

<sup>5</sup>Faculty of Veterinary Medicine and Zootechnics, University of São Paulo, Pirassununga, Brazil

<sup>6</sup>Department of Veterinary Medicine, Federal University of Lavras, Lavras, Brazil

<sup>7</sup>Department of Veterinary Medicine, Federal Rural University of Pernambuco, Recife, Brazil

<sup>8</sup>EMBRAPA Gado de Leite, Juiz de Fora, Brazil

## ABSTRACT

Several bacteria can colonize the bovine's mammary gland and between them Staphylococci have already been reported as the most prevalent mastitis agents. Such bacterial species can carry multidrug-resistant elements coming inclusive from other bacteria species, and so on are becoming a great public health concern, once it is stimulated by antimicrobials use and involved in several human diseases. Their antimicrobial resistance profile characterization is important to understand and control their dissemination. The present work evaluated the distribution of multidrug-resistance among more than 3500 isolates from a repeated cross-sectional study performed from 2010 to 2011 in the main dairy regions from Brazil. The bacteria were classified according to phenotypic methods and the antimicrobial resistance patterns were determined by disk diffusion test. To evaluate the factors related to the response variable – staphylococci resistant to three or more antimicrobial classes (i. e. multidrug resistance) – a multivariable mixed model was created to access the strength of association with herd level putative risk factors, accessed by means of an epidemiological questionnaire. Penicillin-group antimicrobials, followed by tetracycline and sulfonamide, were the less effective antimicrobials in staphylococci (n = 3009). Coagulase negative staphylococci had similarities with coagulase positive. Some streptococci (n = 480) were also submitted to antimicrobial susceptibility tests, and showed moderate to high resistance to tetracycline, gentamycin and clindamycin. The mixed model indicated that clinical mastitis treatment done immediatly and the interaction of antimicrobials applied by the producer itself rather than a veterinarian practitioner with the in-

tensive, modern production system increased the likelihood of multidrug resistance at the herd level. A low intraclass correlation coefficient at basin level showed that resistance variations are most explained by herd level, and its characteristics, rather than region level. These dairy management practices potentially selected for the expansion and maintenance of multidrug resistant bacteria populations in dairy herds.

Key words: staphylococci prevalence, antimicrobial resistance, dairy herds, risk factors, mixed model

## INTRODUCTION

Staphylococci cohabit within natural bacteria of mammals' skin (Quinn et al. 2011) and are also related to the colonization of the udder in dairy cattle, culminating in an elevated risk for mastitis. Among control measures to prevent mastitis caused by microbes at clinical or subclinical degree, the use of antimicrobials is commonly implemented and focused in treatment or in prevention of this pathology. Since the constantly use of antimicrobials had become widespread, it did not take long to the emergence of resistant strains to increase rapidly. Despite mutations and acquisition of foreign resistant determinants, in general, this process has been related to selective pressure driven by the misuse of antimicrobials, at different scales, and has being classified in relation of its source origin, starting at hospitals, being discovered at community later, and, more recently, at livestock environments, which makes possible animal-to-human transfers of resistance genes (Harrison et al. 2013).

The milk production follows the productivity dogma, selecting cows by productivity attributes, and intensifying the production system by means of genetic improvement, nutrition excellence and biosecurity standards. In Brazil, one of the largest bovine milk producers in the world, reaching more than 20 billion liters per year, most dairy farms are concentrated at the southern and southeastern regions (IBGE, 2012). Mastitis, sub- or clinical, is the most prevalent disease all around the world and affects income (Geary et al. 2012), by means of less and worse milk production, treatment costs – mastitis is the main cause for antimicrobials utilization (Erskine 2004) – animal reposition, and mortality, with an estimate cost of 117 US\$ dollars (Bar et al. 2008). In Brazil, the milk production still suffers from the heterogeneous management standards in each dairy herd, being far behind from other well established animal origin product systems, like the swine and avian chains. Hopefully, the risk of transmission of resistant *S. aureus* via the food chain seems to be low (Crago et al. 2012).

The use of antimicrobials in dairy cattle is abundant and has been described in mastitis control programs worldwide, including Brazil. In this context, there is a growing concern about

the viability of milk consumption, including as well antimicrobial residues as bacteriology security of the products, particularly in those ones consumed raw. The heterogeneity of the dairy rearing in Brazil may impose a relevant risk when we think in the complex process of antimicrobial resistance in udder bacteria in dairy cattle. Studies had described the risk of resistant bacteria transmission between humans and animals living intimately, and vice versa. Veterinarian's practitioners and producers, in the livestock context, seem to be at large risk (and impose it) by carrying resistant strains. The "*which antimicrobial to use?*" decision are also related with these actors at the dairy routine, usually leading to different levels of antimicrobial resistance. Antimicrobial Susceptibility Test (AST) data intended for surveillance purposes may be reported using epidemiological cut-off values (Schwarz et al. 2010). Thus, monitoring antimicrobial resistance profiles at the herd level is important to achieve better control of mastitis and also to prevent superbugs arising in community, possibly through food chain.

The knowledge of phenotypic bacterial resistance in a representative Brazilian dairy herd sample is, although scarce, important to clarify the main particular factors related to resistance patterns found. It is plausible that the majority of antimicrobials in a worldwide scale are consumed in the agricultural sector leading to a 'mass action' hypothesis that selection in agriculture is a significant driving force for evolution, persistence and dissemination of multidrug resistance traits (Silbergeld et al. 2008). This is the first report to the best of our knowledge that describes prevalence of staphylococci and its resistance patterns in a large scale randomly assigned dairy herds in Brazil, showing the trends through the time and the main factors associated with the outcomes. Herd composite sampling may be employed in situations where the prevalence of certain pathogen can be estimated, or for use in control programs for especially virulent pathogens (Reyher & Dohoo 2011). Also, associations between putative risk factors are usually concerned about pathogen group intramammary infections (Piepers et al. 2011) rather than general multidrug resistant bacteria.

## **MATERIALS AND METHODS**

### ***Herd Sample Selection and Collection of Milk Samples***

This study was performed to show a holistic view of Brazilian dairy herd resistant bacteria isolated from milking cows irrespective of the clinical signs, meaning colonization rather inflammation (e. g. mastitis). To reach that goal, the prevalence of different kind of bacteria throughout two years of sampling in seven main milk Brazilian basins was described, as well as its resistance profiles and herd risk factors for resistance to twelve antimicrobials commonly administered in commercial dairy herds. The target population consisted of dairy herds located in seven important milk basins in Brazil, distributed in six Brazilian states, three from Southern

region (Taquari Valley from Rio Grande do Sul – RS; Santa Catarina West (SC) and Paraná West (PR), three from Southeastern region (Juiz de Fora and Lavras from Minas Gerais – MG; and Pirassununga from São Paulo – SP), and one from Northeastern region (Agreste Meridional from Pernambuco – PE) apart from the others.

The milk production could be seen in the density plot at the first year of the study, 2010 (Figure 1), and the production growth in the last 30 years (Figure 2). Each laboratory/University was encharged to collect milk samples picked up from randomly selected herds, identified by convenience within a radius of 100 Km from the respective Universities. After obtained a frame list, farms were stratified according to the number of cows in lactation ( $\leq 10$ , 11-15, 16-20, 21-25 and  $\geq 25$ ). The number of cows and herds in each selected regions were obtained in such a way to obtain a minimum number of 42 *Staphylococcus* sp. This size was calculated taking into account an *a priori* 35% staphylococci penicillin resistant prevalence (Brito *et al.*, 2001), and an absolute precision of 12% and 90% confidence interval. To reach this number of strains an average of 13 herds were selected from each target population within each region. The number of farms of each stratum to be included in the study was determined such that their representativeness in the target population was maintained. Some farms had to be excluded and were replaced by farms with similar productive characteristics. Samplings occurred in four moments every six months from January of 2010 to July of 2011.

At each sampling period, composite milk samples were collected from all lactating cows in the herd, except those that were receiving antimicrobial treatment, excluded from the sampling. The procedures for the collection and transport of milk samples, as well as the isolation and identification of the bacteria followed the recommendations of National Mastitis Council (NMC, 2004). Briefly, milk samples were collected before milking and the teats were washed and dried individually with disposable paper towels before sampling. The first three streams of milk were discarded and the teats were then disinfected with 70% alcohol. A composite sample of milk from all teats of each cow was collected in one sterile screw-cap flask. Samples were transported under refrigeration to the laboratory for processing. The study was decentralized, what means that each milk basin was located nearly at a university campus where the composite milk samples were stored and analyzed.

### *Questionnaire*

The farmers were interviewed by the respective research units' staff from each of the seven milk basins about the putative risk factors for multidrug-resistant staphylococci (for definition Schwarz *et al.*, 2010). To evaluate the potential risk factors the questionnaire included broad farm characteristics, as follows: (1) herd composition and milk production, (2) milking

procedures and installations, (3) selling and culling criteria, (4) general technical supervision, (5) milk analysis, like somatic cell count records and antibiogram results, and (6) antimicrobial utilization, including (a) people involved, (b) main pathologies for antimicrobial use, (c) withdrawal period and disposal of milk with antimicrobial residues, and (d) frequency records and antimicrobial principle used.

### ***Laboratory Analysis***

#### Isolation and identification of bacteria

Ten microliters of each milk sample composite was streaked onto 5% sheep blood agar and incubated at 37 °C for 24 – 48 hours. After incubation, predominant colonies (at least three colonies present on the agar plate) with similar morphology were isolated and identified as described previously (NMC, 2004). Identifications were confirmed using the tube coagulase and Voges-Proskauer (VP) tests.

#### Antimicrobial Susceptibility Test (AST)

All isolates of *Staphylococcus* sp. and 20% (illustrative) of *Streptococcus* sp. and *Enterococcus* sp. were tested for phenotypic antimicrobial susceptibility using disk diffusion test in Müller-Hinton agar (Oxoid, Thermo Scientific, UK), according to the guidelines of the Clinical and Laboratory Standards International document M31-A3 (2008). The following antimicrobials disks (Oxoid, Thermo Scientific, UK) were selected: ampicillin (10 µg), cephalotin (30 µg), ceftiofur (30 µg), clindamycin (2 µg), erythromycin (15 µg), enrofloxacin (5 µg), gentamicin (10 µg), oxacillin (10 µg), penicillin (10 IU), sulfonamide (300 µg), sulfa + trimethoprim (1.5/23.75 µg) and tetracycline (30 µg). *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 was used as the quality control. Interpretative standards (breakpoints) available in the CLSI (2008) were used in order to have an overview of antimicrobial resistance occurrence among isolates of the main bacteria species. All staphylococci isolates and 20% of streptococci isolates were tested by the in vitro disk diffusion method (CLSI, 2008) against 12 antimicrobials, which were chosen considering their availability in the Brazilian market for intramammary treatment of mastitis and also in order to monitor the resistance phenotypes among the bovine bacteria.

### ***Statistical Analysis***

Bacteria culture and antimicrobial susceptibility results (in classes and zone diameters, respectively) were entered into a customized database (Microsoft Office Excel 2010, Microsoft Corp., Redmond, WA). The classification in *Staphylococcus* coagulase-negative or positive was assumed based in phenotypic test. Data from questionnaire that assess the independent variables

was inputted also into another customized database (Microsoft Office Access 2010, Microsoft Corp., Redmond, WA) and encoded for analytical purpose. Both databases were compiled into a single dataset, hierarchically organized, bacteria and resistance profiles grouped in a herd from a milk basin) with the outcome (compiled percentage of resistant bacteria from tested ones) and the explanatory variables by producer (herd) with repetitions, as many as samplings periods made, performing a repeated cross-sectional study. Data analyses were performed using SAS 9.2 for Microsoft Windows (SAS Institute). The isolates were categorized as susceptible, intermediate, or resistant on the basis of Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines (CLSI, 2008). The intermediate class was assumed resistant to analytical purpose. Herd-level prevalence percentage of multidrug resistance was defined as the mean percentages of bacteria resistant to three or more antimicrobial classes divided by total number of isolates in all herds. A multilevel mixed-effects linear regression was fit using restricted maximum likelihood estimator to assess possible associations between the dependent variable, proportion of multiple resistant bacteria, and the explanatory variables at herd-level.

Fixed effects were derived from the questionnaire. Multiple resistance bacteria were assigned randomly from farms in seven milk basins by means of a random effect variable for milk basin through the four sampling moments. All independent variables were screened based on descriptive statistics. Those variables that had little variability (Dohoo *et al.*, 2009) (i. e. less than 20%) and those that had large amounts of missing data (>10%) were both excluded. Subsequently, the remaining variables were screened for univariable associations using the PROC MIXED procedure (SAS) and selected for inclusion in the multivariable model if  $p < 0.25$ . After that, all the screened variables were submitted to correlation analysis to avoid multicollinearity. If any correlation was found to be  $> 0.7$ , the variable with the lowest  $p$  – value was included to the multivariable model. Notwithstanding, we analyzed the variance inflation factor (VIF) of the remaining variables, by means of PROC REG, to evaluate those that were being explained mostly by another variables (e.g.  $VIF > 2$ ) and contributes little to the model, and were excluded by VIF backward elimination. Plausible interactions between some pairwise variables suitable for the final model were examined and if significant ( $p < 0.25$ ) were taken up for further analysis. Selected variables ( $n = 21$ ) were included to the multivariable model. A backwards selection process, including only variables with  $p$  value  $< 0.05$ , was used to identify possible significant predictors. Confounding effects were investigated by checking changes in the point estimates (beta) of the remaining variables in the model. Changes greater than 25% in parameter estimate were considered as a confounder. As milk production system intensity was correlated with average milk production and herd size, the latter a suggested indirect risk factor in the de-

velopment of antimicrobial resistance in *S. aureus* (Shitandi & Sternesjo 2004), it was retained in the final model as a confounder.

## **RESULTS and DISCUSSION**

An overview of the data with production measures and prevalences for bacteria colonization and multidrug resistance are summarized in Tables 1 and 2, respectively. An average of 13 dairy herds was collected per moment per milk basin, once there were repositions of quitting farmers, ranging from 10 (Agreste Meridional, PE) to 20 (Oeste Catarinense, SC) farms.

### ***Prevalence of bacteria colonization in dairy cattle's udders***

The main bacteria prevalence in each basin could be seen in Table 2. CNS has demonstrated a limited impact in terms of udder health despite the different species from this subgroup (Bexiga et al., 2014). Because the sample design included all lactating cows in the herds sampled, despite their clinical status, there was a high proportion of colonization caused by CNS in most milk basins, particularly in the southernmost ones, as demonstrated in a Flemish study (Braem et al. 2013). The bacteria from this group are also abundantly present in the dairy farm environment and in bovine skin and mucosae, and also to be the most prevalent bacteria causing bovine intramammary infection (De Visscher et al. 2014). There was little fluctuation in these prevalences through the time that could be partially related to season and rain periods variations. Essentially intensive milk basins (Juiz de Fora, Lavras, Pirassununga e Agreste Meridional) had CPS prevalence higher than CNS prevalence, differently than the extensive ones (Vale do Taquari and Oeste Paranaense from South region), with lower lactating cows' average and daily milk production, and more herds sampled. The most representative streptococci were *S. agalactiae* (56%), *S. uberis* (19%) and *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* (10%), considered as important mastitis pathogens. *S. agalactiae* is also a human pathogen that causes severe invasive neonatal infections, infection in pregnant women and elderly people and causes mortality in immuno-suppressed adults (Bisharat et al. 2004).

### ***Prevalence of antimicrobial resistance among bacterial pathogens isolated from cattle in six Brazilian states: 2010-2011***

Eventhough, resistance levels found generate concerns, because most antimicrobials that was demonstrated resistance are classified as 'veterinary critically important antimicrobial' according to the last list of antimicrobial agents of veterinary importance developed by the World Organization for Animal Health ([http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our\\_scientific\\_expertise/docs/pdf/OIE\\_list\\_antimicrob](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/OIE_list_antimicrob)

ials.pdf) in parallel with the WHO list for human medicine. *S. aureus* showed a moderate to high level of MDR (Table 3), especially because penicillins-resistance was higher than 50% followed by tetracycline and sulfamethoxazole, around 20%, and enrofloxacin, 15%. It was shown in a recent study in Lavras, Brazil (Costa et al. 2012), that the most common resistance pattern in the strains isolated were to penicillins (ampicillin and penicillin G), polymyxin B and tetracycline, and despite great diversity of *S. aureus* there were predominant clones that accounted for most infections, a fact that was already reported (Dendani et al. 2010). In China, in a single herd study, the most prevalent resistance genes in *S. aureus* isolates were *blaZ*, *ermC* and *tetM* (Gao et al. 2012a). Resistance to oxacillin, which predicts methicillin resistance, occurred in 5% of *S. aureus*, somewhat similar to recent reports that investigate healthy cows as well (Tavakol et al. 2012; van Duijkeren et al. 2014). In the other hand, other staphylococci than *S. aureus* showed a 3-fold resistance to this antimicrobial, which lead to potential sources of resistant determinants to more pathogenic *S. aureus* infection and resistant to treatments.

Remarkably, when all bacteria were compiled, staphylococci showed a group resistance pattern, with high similarity in almost all antimicrobials tested. CNS could be a key element in resistance process, once they were the most prevalent bacteria subgroup isolated and showed almost the same resistance level of *S. aureus* and other CPS to enrofloxacin, gentamycin, tetracycline, and, just of *S. aureus*, to erythromycin; and, as result, multidrug resistance. These bacteria are distributed in many environmental niches (De Visscher et al. 2014) and possibly are communicating between them and more pathogenic staphylococci, once they reach udders' cows. *S. aureus* showed higher levels of resistance to penicillins than from CNS and CPS (not determined at specie level), that by the way agreed in the levels of these antimicrobials, plus clindamycin. Cephalosporins, both 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> generations, had low resistance levels in all staphylococci. Sulfamethoxazole-resistance levels were higher in *S. aureus* than CNS, which in turn was higher than other CPS; and in all bacteria subgroups this resistance showed abrupt *up and downs* at the cross-sections. Rio Grande do Sul, the southernmost Brazilian state showed a curious resistance behavior through the collection period, with a dramatically decrease in multidrug resistance levels (data not shown). This might be explained because a systematic exclusion of producers that did not meet the industry requirements (i. e. they should have a cooler) was being performed by dairy industry, and therefore resulted in a high rate (>20%) of reposition of producers in that region, possibly selecting better ones. Another relevant fact was that in the first sample collection in 2010 a huge flood occurred in that region, raising the rate of udder's colonization.

Among the streptococci (n = 480) there was a general multidrug resistance, mostly related to tetracycline, gentamycin (especially in *S. agalactiae*), erythromycin, clindamycin and enrofloxacin, higher than 30%. These results are in agreement with other studies (Hendriksen et al. 2008; Rato et al. 2013), that also found low levels of resistance to penicillin groups antimicrobials in *Streptococcus* sp. Rato et al. (2013) suggested that particular therapeutic schedules may had been implemented in the farms studied because the most cases clones were herd-specific. A recent study with a small number of *S. agalactiae* isolates in cows with mastitis in China found level of resistance to tetracycline, gentamycin and erythromycin near 30% (Gao et al. 2012b), and concluded that resistance genotype does not accurately predict phenotypic resistance, once some susceptible strains sheltered resistance genes and resistant ones did not carry all resistant genes studied (those which are commonly searched and studied).

### ***Multivariable mixed model***

The univariable associations can be visualized in Table 4, as well as descriptive statistics for each variable. In correlation analysis, most herd level variables were excluded due high correlation with the herd milk production variable. The final multivariable model (Table 5) comprised three variables and one interaction. Immediate mastitis treatment increases the prevalence ratio of multidrug resistance. By modeling the equation with random effect of dairy basin through the time it was possible to elucidate that the individual-level variables, in farms, even nested at these regions, do not form a cluster of common practices in antimicrobial usage. Random effects are useful to look at the levels of the population included in the study (Ferrell, 2006). Each farm could be very different in antimicrobial utilization despite some similarity of the active principles used at farms at basin level. Unfortunately, the missing rate of specific data of antimicrobials use was higher than 20% and so it was not included in the analysis.

The herd level risk factors evaluated in our study corroborate with studies that have shown association between amounts of antimicrobials spent and resistance appearance (Chantziaras et al. 2013), and also indicate that the actors involved in the antimicrobial therapy play an important role in the resistance process in bacteria from cattle's udder. Generally, the most common indications of antimicrobial treatment or preventive use in terrestrial animals reared for food production are enteric and respiratory disorders in young animals and mastitis in dairy cows (Pagel & Gautier 2012). The immediate antimicrobial treatment in cases of clinical mastitis in the herd demonstrates a classical antimicrobial *use-and-resistance* relationship, which could be partly explained by the empirical antibiotic management before, or even without, the right diagnostic of the causative agent and his antimicrobial profile. Studies in countries where the antimicrobial use data reported by the government authorities prove that association

(Chantziararas et al. 2013). The production system involves a list of common practices that exposes the herd to environmental challenges, including staphylococci exposure, well adaptation to the host and selected by antimicrobial delivery. Inevitably, these practices supported the intensification of modern food production by facilitating early weaning, increased animal densities, and cheap feed sources (Swedish Ministry of Agriculture 1997). The most productive milk basin showed the highest levels of multiple-resistance, with west side of Santa Catarina leading the list, a big producer of products of animal origin (e. g. swine and avian industry), followed by dairy basins from Minas Gerais state, in Lavras and Juiz de Fora.

Another association found in our study was the staff involved in antimicrobial utilization and their knowledge about the mastitis epidemiology. It seems that the producer itself poses a worse scenario as it was related to no support to antimicrobial utilization judgement. Curiously, this assistance was distributed in extensive and semi-intensive production systems, and was concentrated at the south zone suggesting a social determinant. Regulations and practices vary widely around the globe and are probably affected by the economic and social context. Where authorized, antibiotics used for growth promotion can generally be purchased over the country without veterinary involvement (Greko 2013). Diez-Roux (2000) has discussed examples of empirical applications in public health involving individuals nested within groups or contexts, using a multilevel analysis. It was also argued that theories on neighborhood effects on health may also need to place the process of residential differentiation within a broader theory of social organization and social stratification. Education of health-care workers, including veterinarians and farmers, on appropriate antibiotic use and antibiotic resistance is essential, and related strategies have been reviewed, like the early start in the medical curriculum (Pulcini & Gyssens, 2013).

Studies have emphasized the greater risk that older animals have to carry resistant strains (Rajala-Schultz et al. 2004; Bos et al. 2012; Santiago-Neto et al. 2014). These animals are commonly more exposed to pathogens and to antimicrobials therapies, favoring selection pressure to bacteria that contains resistance elements. Culling criteria by animal age increased the chance to have lower proportion of multidrug-resistant bacteria at the univariable association (Table 4). The mid-age of cows' life production (around five years old) had a greater chance to be colonized by multidrug-resistant staphylococci coagulase positive. In the other hand, older animals in the herd demonstrated lower chances (Santiago Neto et al. 2014). This possibly could be explained because older animals are probably culled by chronic mastitis and/ or other pathologies, resulting in selection of the best animal stratum. Age itself is not a risk factor, but the particular niches that different categories of animal are submitted could probably increase the

likelihood of carry multidrug resistant strains (Bos et al., 2012), and ideally should be included in resistance populational studies.

Finally there was an interesting association between the intensity of type of production and multiple-resistance. The more the dairy rearing explore the production potential from herd, more it seems that resistance phenomena are manifested. It was observed an interaction with intensiveness of production, from extensive to modern intensive production, and the person involved in antimicrobial therapy, that gives us a clue about the dynamics of antimicrobial management. The risk was diminished with the presence of veterinarian practitioner, taking into account the effect of intensity of the system. The antimicrobial resistance to multiple classes of drugs reached a peak when no technical support was demanded for antimicrobial means in the most intensive rearing. That indicates a possible lack of relevant knowledge (Shitandi and Sternesjo 2004) at herd level by the producer itself that may not be following recommended treatment regimens when using antimicrobials and emphasizes the importance to appeal to a properly formed professional engaged with the herd problematic (susceptibility degree) at a regional level, regarding intensity. In Pennsylvania, USA (Sawant et al. 2005), less than 35% of milk producers asks for veterinarian healthcare to antimicrobials consumption and the practice is extremely variable.

Since resistance phenomenon is dependent of the host-bacteria interaction, some of the variance could not be explained by our herd level factors. In other hand, the variables associated at herd level were more general in explain the multidrug resistance outcome grouped, mostly to staphylococci, giving us some clues in a manner politics could understand and take part with public health measures. Once the outcome enclose resistance in a broader perspective, it seems feasible that these explanatory variables were related to it. Data collection at more levels, especially at the cow level (e.g. SCC and age data) would add up to explain specific bacteria (i. e. by genotypic diagnosis) prevalence variation. The intraclass correlation coefficient (ICC) was 0.126, a little bit higher than the ICC from the null model (0.115). This means that most of the variation in the results is within the herds and there is only little clustering. Dairy farms could vary from their neighbors, mainly because management practices and attitudes at herd level, but the interaction between microorganisms and their hosts is critical to the development of the resistance process.

Furthermore, differently than in the EU and in the USA, in Brazil there is not a specific committee for veterinary antimicrobial consumption surveillance and data for amounts of antimicrobials sold for use in animals are still scarce in our country. Genotyping rather phenotyping methods to access more accurate specimens and an antimicrobial susceptibility test that give us

a quantitative outcome (e. g. minimal inhibitory concentration) were not performed and could improve our knowledge. Even though not attempting to explain all disease/ factor causal relationship in intimate and biological detail, we found reasonable associations at a higher level, with loss of detail, but permeating the branches of bacterial resistance, so representing a black box approach (Latour 1999 apud Thrusfield 2010). Studies providing empirical investigations into the social processes applicable to mastitis control are increasing (Jansen et al., 2009), and focus in causal effect of attitude change on farmers' behavior could bar potential sources of antimicrobial resistance.

## CONCLUSION

We conclude that multiple-resistance is already common in bacteria from Brazilian dairy herds. The main antimicrobials which staphylococci showed low susceptibility were from the penicillin group, and streptococci, by the way, from tetracycline and clindamycin. A multi-level approach made possible to identify that intensive rearing, immediate antimicrobial administration and absence of a veterinarian supporting this administration posed a greater risk in development of multiple resistance in dairy herds from Brazil. This study reinforces the important role that veterinarian practitioners develop in the control of resistance dissemination in farm animals reared for food production, especially in the intensive ones.

## REFERENCES

- Bexiga, R., Rato, M. G., Lemsaddek, A., Semedo- Lemsaddek, T., Carneiro, C., Pereira, H., Mellor, D. J., Ellis, K. A., and Vilela, C. L., 2014. Dynamics of bovine intramammary infections due to coagulase-negative staphylococci on four farms. *J Dairy Res* doi:10.1017/S0022029914000041.
- Bisharat, N., Crook, D.W., Leigh, J., Harding, R.M., Ward, P.N., Coffey, T.J., Maiden, M.C., Peto, T., Jones, N., 2004. Hyperinvasive neonatal group B *Streptococcus* has arisen from a bovine ancestor. *J. Clin. Microbiol.* 42(5), 2161–2167.
- Bos, M. E. H., Graveland, H., Portengen, L., Wagenaar, J. A., Heederik, D. J. J., 2012. Live-stock-associated MRSA prevalence in veal calf production is associated with farm hygiene, use of antimicrobials, and age of the calves. *Prev. Vet. Med.* 105: 155-159.
- Braem, G., De Vlieghe, S., Verbist, B., Piessens, V., Van Coillie, E., De Vuyst, L., Leroy, F., 2013. Unraveling the microbiota of teat apices of clinically healthy lactating dairy cows, with special emphasis on coagulase-negative staphylococci. *J Dairy Sci* 96: 1499-1510.

Brito, M. A. V. P., Brito, J. R. F., Silva, M. A. S. & Carmo, R. A., 2001. Concentração mínima inibitória de dez antimicrobianos para amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de infecção intramamária bovina. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 53(5):531-537.

Chantziaras, I., Bayen, F., Callens, B. & Dewulf, J., 2014. Correlation between veterinary antimicrobial use and antimicrobial resistance in food-producing animals: a report on seven countries. J. Antimicrob Chemother 69(3):827-834.

CLSI, 2008. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard. 3rd ed. CLSI Document M31-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

Costa, G. M., Paiva, L. V., Figueiredo, H. C. P., Figueira, A. R., Pereira, U. P., Silva, N. 2012. Population diversity of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis in Brazilian dairy herds. Res Vet Sci 93: 733-735.

Crago, B., Ferrato, C., Drews, S. J., Svenson, L. W., Tyrrell, G. and Louie, M., 2012. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) in food samples associated with foodborne illness in Alberta, Canada from 2007 to 2010. Food Microbiol 32: 202–205.

De Visscher, A., Supré, K., Haesebrouck, F., Zadoks, R. N., Piessens, V., Coillie, E. V., Piepers, S., De Vlieghe, S., 2014. Further evidence for the existence of environmental and host-associated species of coagulase-negative staphylococci in dairy cattle. Vet. Microbiol. 172: 466-474.

Dendani, Z., Arcangioli, M. A., Bezille, P. et al., 2010. Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis by Pulse-Field Gel Electrophoresis (PFGE). J Animal Vet Adv 9(1): 5-11.

Diez-Roux, A. V., 2000. Multilevel Analysis in Public Health Research. Annu. Rev. Public Health, 21: 171-92.

Dohoo, I. R., Martin, S. W., and Stryhn, H., 2009: Veterinary Epidemiologic Research, pp. 589. VER Incorporated, Charlottetown.

Erskine, R., Cullor, J., Schaellibaum, M., Yancey, B. & Zeconi, A., 2004. Bovine mastitis pathogens and trends in resistance to antibacterial drugs. In: Proc. 43rd National Mastitis Council Annual Meeting, Charlotte, NC, p.400-414.

Ferrell, J., 2006. A comparison of the mixed procedure and the glimmix procedure. Paper 189-31, Statistics and Data Analysis Section. In: SUGI 31 Proceedings, San Francisco, CA.

G1 RS, 2014. Available at <http://g1.globo.com/rs/rio-grande-do-sul/campo-e-lavoura/noticia/2014/12/mp-do-rs-prende-funcionarias-de-laboratorio-por-fraude-no-leite.html> (accessed January 14, 2015)

Gao, J., Ferreri, M., Yu, F., Liu, X., Chen, L., Su, J., Han, B., 2012a. Molecular types and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in a single herd in China. *Vet J* 192: 550-552.

Gao, J., Yu, F. Q., Luo, L. P., He, J. Z., Hou, R. G., Zhang, H. Q., Li, S. M., Su, J. L., Han, B., 2012b. Antibiotic resistance of *Streptococcus agalactiae* from cows with mastitis. *Vet J* 194: 423-424.

Geary, U., Lopez-Villalobos, N., Begley, N., Mccoy, F., O'Brien, B., O'Grady, L., Shaloo, L., 2012. Estimating the effect of mastitis on the profitability of Irish dairy farms. *Journal of Dairy Science*, 95, 3662-3673.

Greko, C., 2013. Part 4: The interface between people and animals. In: Laxminarayan, R. et al., Antibiotic Resistance – the need for global solutions. The Lancet Infectious Disease Commission, pp. 12-15.

Harrison, E. M., Paterson, G. K., Holden, M. T., et al., 2013. Whole genome sequencing identifies zoonotic transmission of MRSA isolates with the novel *mecA* homologue *mecC*. *EMBO Mol Med* 5: 509-15.

Hendriksen, R. S., Mevius, D. J., Schroeter, A., Teale, C., Meunier, D., Butaye, P., Franco, A., Utiname, A., Amado, A., Moreno, M., Greko, C., Stark, K., Berghold, C., Myllyniemi, A. L., Wasyl, D., Sunde, M., Sunde, M., and Aarestrup, F. M., 2008. Prevalence of antimicrobial resistance among bacterial pathogens isolated from cattle in different European countries: 2002-2004.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 2012. Diferença entre leite adquirido e industrializado - Unidades da Federação e Brasil - primeiro trimestre de 2012. Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, Pesquisa Trimestral do Leite, 1º trimestre de 2012.

- Jansen, J., van den Borne, B. H. P., Renes, R. J., van Schaik, G., Lam, T. J. G. M., Leeuwis, C., 2009. Explaining mastitis incidence in Dutch dairy farming: The influence of farmers' attitudes and behavior. *Prev Vet Med* 92: 210-223.
- Latour, B., 1999, *Pandora's Hope: Essays on the Reality of Science Studies*. Harvard University Press, Cambridge, Mass, pp. 183- 185; 191-193; 304. (Apud Thrusfield 2010).
- National Mastitis Council (NMC), 2004. *Microbiological Procedures for the Diagnosis of Bovine Udder Infection and Determination of Milk Quality*. 4th ed. NMC, Verona. 47p
- Pagel, S. W. & Gautier, P., 2012. Use of antimicrobial agents in livestock. *Rev. Sci Tech.* 31: 148-88.
- Piepers, S., Peeters, K., Opsomer, G., Barkema, H. W., Frankena, K., De Vliegher, S., 2011. Pathogen groups specific risk factors at herd, heifer and quarter levels for intramammary infections in early lactating dairy heifers. *Prev Vet Med* 99: 91-101.
- Pulcini, C., Gyssens, I. C., 2013. How to educate prescribers in antimicrobial stewardship practices. *Virulence* 4: 192-202.
- Quinn, P.J.; Markey, B.K.; Leonard, F.C.; Fitzpatrick, E.S.; Fanning, S.; Hartigan, P.J., 2011. *Veterinary Microbiology and Microbial disease*. Second Edition. Wiley - Blackwell. Chapter 14 *Staphylococcus* species (p.179-187). pp. 912.
- Rajala-Schultz, P. J., Smith, K. L., Hogan, J. S. & Love, B. C., 2004. Antimicrobial susceptibility of mastitis pathogens from first lactation and older cows. *Vet. Microbiol.* 102:33-42.
- Rato, M. G., Bexiga, R., Florindo, C., Cavaco, L. M., Vilela, C. L., Santos-Sanches, I., 2013. Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of streptococci from bovine mastitis. *Vet Microbiol* 161: 286-294.
- Reyher, K. K., Dohoo, I. R., 2010. Diagnosing intramammary infections: Evaluation of composite milk samples to detect intramammary infections. *J. Dairy Sci.* 94: 3387-3396.
- Santiago-Neto, W., Machado, G., Paim, D. S., Campos, T., Brito, M. A. V. P., Cardoso, M. R. I., Corbellini, L. G., 2014. Relação da idade na presença de bactérias resistentes a antimicrobianos em rebanhos leiteiros no Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.* 34 (7): 613-620.
- Sawant, A.A., Sordillo, L.M., Jayarao, B.M., 2005. A survey on antibiotic usage in dairy herds in Pennsylvania. *J. Dairy Sci.* 88, 2991-2999.

- Silbergeld, E. K., Graham, J., Price, L. B., 2008. Industrial food animal production, antimicrobial resistance, and human health. *Annu Rev Pub Health* 29: 151-169.
- Schwarz, S., Silley, P., Simjee, S., Woodfords, N., Van Duijkeren, E., Johnson, A.P., Gaastra, W., 2010. Assessing the susceptibility of bacteria obtained from animals. *J. Antimicrob. Chemoth.* 65: 601-604.
- Shitandi, A. & Sternesjo, A., 2004. Prevalence of multidrug resistant *Staphylococcus aureus* in milk from large- and small-scale producers in Kenya. *J. Dairy Sci.* 87: 4145-4149.
- Swedish Ministry of Agriculture, 1997. Antimicrobial feed additives. Report from the commission on antimicrobial feed additives. Stockholm.
- Tavakol, M., Riekerink, R. G., Sampimon, O. C., van Wamel, W. J., vanBelkum, A., Lam, T. J., 2012. Bovine-associated MRSA ST398 in The Netherlands. *Acta Vet. Scand.* 54, 28–32.
- Thrusfield, M.V., 2010. Ageing in Animal Populations: an epidemiological perspective. *J. Comp. Pathol.* 142:S22-S32.
- Van Duijkeren, E., Hengeveld, P. D., Albers, M., Pluister, G., Jacobs, P., Heres, L., van de Giessen, A. W., 2014. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying *mecA* or *mecC* dairy cattle. *Vet Microbiol* 171: 364-367.

Figure 1 Density plot with milk production in mesorregions from Brazil in 2010. Each category account for 25% of the whole production (adapted from PPM IBGE 2011/ Embrapa Gado de Leite).

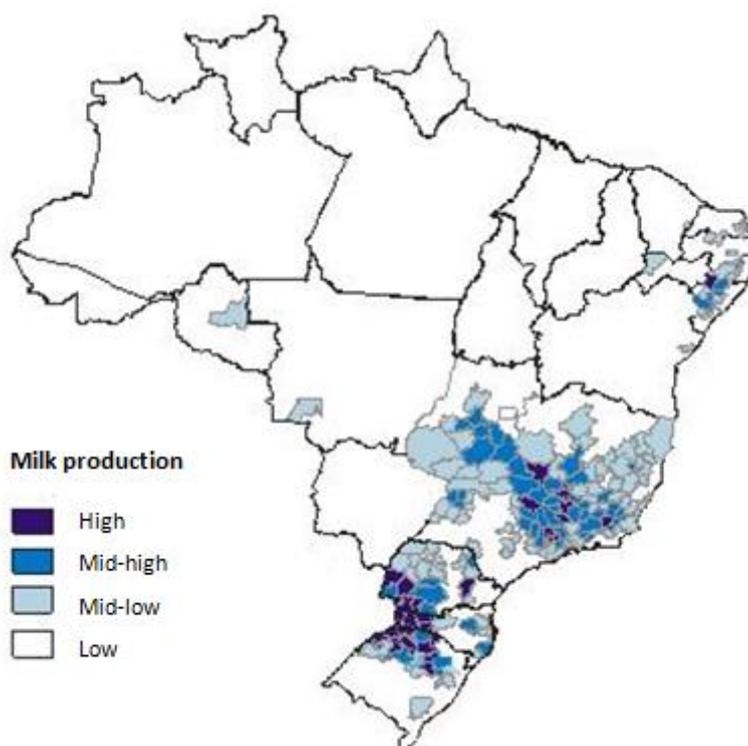


Figure 2 Milk acquisition growth in Brazilian States between 1980 and 2012 ( $\times 10^3\text{L}$ )  
(adapted from Milk Point/ IBGE, 2012)

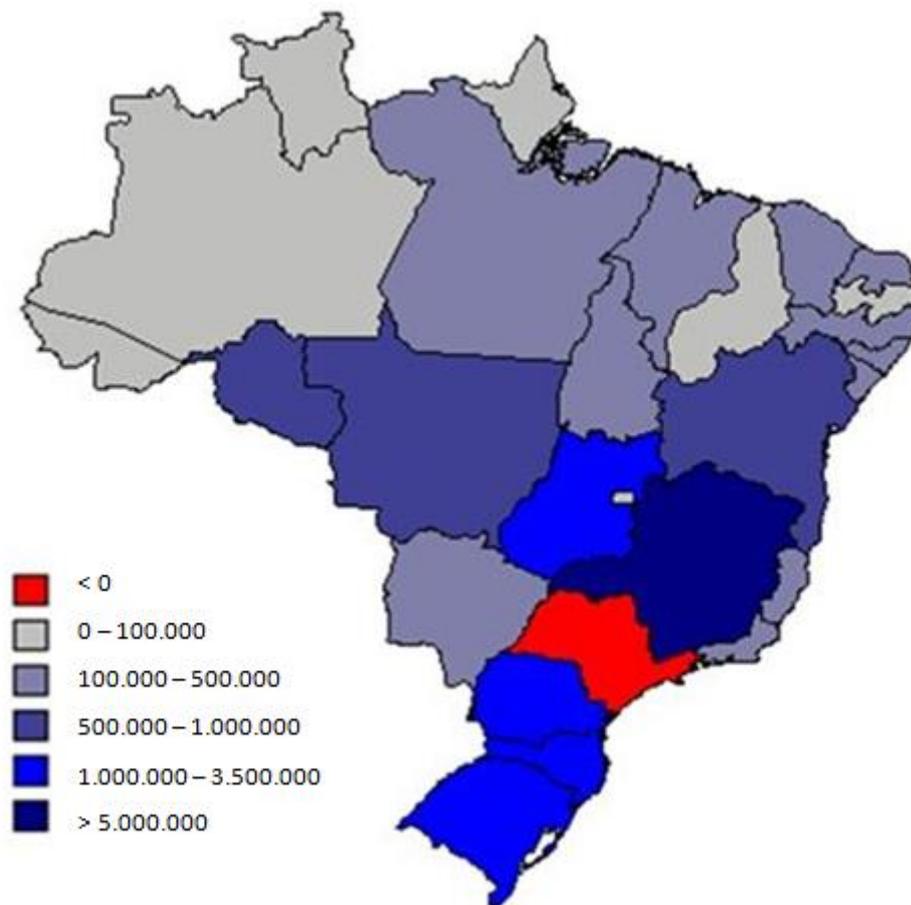


Table 1. Production characteristics from milk basins studied

Milk basin	Herd characteristics				
	Number of herds	Mean milk production/day (L)/ Herd	Mean Dry Cows/ Herd	Mean Lactating Cows/ Herd	Number of isolates
Juiz de Fora	11	707.3	13.7	43.2	486
Lavras	10	685.0	11.1	42.7	767
Agreste Meridional	10	618.9	19.4	32.1	441
Oeste Paranaense	19	102.0	3.6	9.4	469
Vale do Taquari	18	223.3	2.9	13.3	446
Oeste Catarinense	15	392.5	4.1	22.3	360
Pirassununga	12	375.2	9.3	29.3	537

Table 2. Main bacteria prevalence and multiple-resistance at herd level by milk basin (with 95% confidence interval)

Milk basin (region) <sup>a</sup>	Prevalence			
	Coagulase negative staphylococci	Coagulase positive staphylococci <sup>b</sup>	<i>S. agalactiae</i>	Overall Multi-drug resistance
Juiz de Fora (SE)	28.1 (27.2-29.1)	54.4 (53.6-55.1)	9.3 (9.2-9.4)	19.5 (11.9-27.2)
Lavras (SE)	31.9 (31.4-32.4)	43.8 (43.6-43.9)	14.9 (14.7-15.2)	20.3 (15.8-24.8)
Agreste Meridional (NE)	27.0 (24.5-29.5)	46.5 (42.2-50.9)	13.7 (12.4-15)	10.8 (6.4-15.2)
Oeste Paranaense (S)	54.6 (53.4-55.7)	41.2 (40.1-42.3)	1.8 (1.6-1.9)	10.5 (7.0-14.0)
Vale do Taquari (S)	59.1 (53.6-64.6)	35.4 (32.1-38.7)	1.3 (1.1-1.4)	13.5 (7.7-19.4)
Oeste Catarinense (S)	60.0 (53.8-66.2)	32.7 (29.3-36.1)	3.1 (2.8-3.4)	21.0 (14.0-28.0)
Pirassununga (SE)	40.7 (37.2-44.1)	46.8 (42.8-50.7)	4.9 (4.5-5.3)	14.2 (8.5-19.9)

<sup>a</sup>Brazilian regions: NE – northeast; SE – southeast; S – south; <sup>b</sup>Coagulase-positive *Staphylococcus* include *S. aureus*

Table 3. Resistance percentual from all bacteria sampled from composite milk samples and tested to different antimicrobials in Brazilian dairy herds (n = 3506), with the number of isolates discriminated between parenthesis

ANTIMICROBIAL	<i>E. coli</i>	Enterobacteriaceae	<i>Pseudo monas aeru- ginosas</i>	CNS	CPS	<i>S. aureus</i>	ENS	EPS	<i>S. agalac- tiae</i>	<i>S. dysga- lactiae</i>	<i>S. equi</i>	<i>S. uberis</i>
Ampicillin	-	15% (2)	-	40% (577)	42% (86)	54% (740)	13% (3)	10% (1)	4% (10)	12% (6)	24% (5)	14% (13)
Cephalotine	-	62% (8)	100% (1)	4% (52)	8% (16)	2% (33)	4% (1)	-	1% (3)	8% (4)	24% (5)	1% (1)
Ceftiofur	-	23% (3)	100% (1)	3% (46)	5% (10)	1% (18)	8% (2)	-	1% (3)	4% (2)	5% (1)	-
Clindamycin	67% (2)	85% (11)	100% (1)	15% (216)	15% (31)	9% (118)	33% (8)	30% (3)	33% (89)	45% (23)	38% (8)	45% (42)
Erythromycin	-	69% (9)	-	9% (131)	5% (11)	10% (138)	17% (4)	-	34% (93)	8% (4)	19% (4)	35% (33)
Enrofloxacin	100% (3)	69% (9)	100% (1)	15% (217)	15% (31)	15% (205)	25% (6)	10% (1)	28% (76)	37% (19)	33% (7)	15% (14)
Gentamycin	33% (1)	46% (6)	-	2% (33)	3% (7)	2% (23)	25% (6)	20% (2)	39% (105)	10% (5)	19% (4)	16% (15)
Oxacillin	-	-	-	14% (203)	15% (31)	5% (72)	-	-	-	-	-	-
Penicillin	67% (2)	46% (6)	-	47% (678)	48% (97)	62% (836)	25% (6)	20% (2)	7% (18)	14% (7)	29% (6)	24% (22)
Sulfonamide.	33% (1)	100% (13)	-	16% (229)	11% (22)	21% (280)	46% (11)	50% (5)	26% (71)	16% (8)	52% (11)	57% (53)
Sulf + Trimeth.	33% (1)	23% (3)	100% (1)	5% (70)	2% (4)	4% (55)	4% (1)	-	6% (17)	2% (1)	14% (3)	2% (2)
Tetracycline	33% (1)	46% (6)	-	21% (297)	25% (51)	22% (296)	58% (14)	30% (3)	56% (153)	75% (38)	62% (13)	47% (44)
MDR	67% (2)	100% (13)	100% (1)	17% (251)	16% (32)	15% (209)	50% (12)	20% (2)	40% (109)	31% (16)	43% (9)	47% (44)
Percentage of isolates from total	0% (3)	0,4% (13)	0% (1)	41% (1447)	6% (204)	39% (1358)	0,7% (24)	0,3% (10)	8% (271)	1,4% (51)	0,5% (21)	2,6% (93)

CNS – coagulase negative staphylococci; CPS – coagulase positive staphylococci, except *S. aureus*; EPS – esculine positive streptococci; ENS – esculine negative streptococci; MDR – multiple drug resistance (to more than three antimicrobial classes)

\* *Streptococcus alactolyticus* (n = 2) and *Streptococcus acidominimus* (n = 8).performed 0% of isolates tested and were omitted

Table 4 Descriptive statistics of univariate association results with  $p < 0.25$ 

Subset	Variables	N/ mean	%/ SD	Estimate	AIC	$p$ type 3	lsmeans(%)	95%ci
<b>Herd composition and milk production</b>	<b>Number of cows with one calf (continuous)</b>	5.9	6.6	0.004607	-75.28	0.0125		
	<b>Number of cows with two calves (continuous)</b>	5.2	6.3	0.00534	-83.33	0.0053		
	<b>Number of cows with three calves (continuous)</b>	5.2	6.6	0.00624	-84.86	0.0006		
	<b>Number of cows with more than three calves (continuous)</b>	7.3	7.6	0.00573	-74.03	0.0004		
	<b>Number of cows at milking (continuous)</b>	24.8	23.6	0.001717	-112.97	0.0003		
	<b>Number of cows at dry period (continuous)</b>	7.9	8.6	0.004225	-100.36	0.0026		
	<b>Gir (<i>Bos indicus</i>) presence</b>							
	No	341	97.43	0.09892	-93.92	0.1599	15.6	11.29 19.9
	Yes	9	2.57	0	-93.92	0.1599	5.7	-8.5 19.9
	<b>Crossbreed presence</b>							
	No	221	63.14	0.03906	-92.09	0.1353	16.85	12.22 21.47
	Yes	129	36.86	0	-92.09	0.1353	12.94	7.63 18.25
	<b>Milking production (L/day) (continuous)</b>	399.2	511.3	0.08702	-96.11	0.0234		
	<b>Milk production (L/day) (categorized per quartile)</b>							
	Below 110	100	26.9	-0.1006	-104.86	0.01	12.5	7.4 17.7
	Between 111 and 235	89	23.1	-0.08821	-104.86	0.01	13.8	8.8 18.8
	Between 236 and 500	109	29.3	-0.08252	-104.86	0.01	14.4	9.8 18.9
	Above 500	77	20.7	0	-104.86	0.01	22.6	17.4 27.8
<b>Milking pro-</b>	<b>Presence of calves at milking</b>							

<b>cedures and installations</b>	No	272	72.34	0.03618	-110.09	0.1562	16.7	13	20.3
	Yes	104	27.66	0	-110.09	0.1562	13	8.2	17.9
<b>Pre dipping</b>									
	No	216	57.45	-0.04658	-112.21	0.0353	13.46	9.6	17.3
	Yes	160	42.55	0	-112.21	0.0353	18.12	14.1	22.1
<b>Post dipping</b>									
	No	161	42.82	-0.07211	-118.99	0.0008	11.41	7.4	15.4
	Yes	215	57.18	0	-118.99	0.0008	18.62	15	22.3
<b>Wash teats</b>									
	No	70	19.44	-0.06743	-102.68	0.0203	10.6	5	16.2
	Yes	290	80.56	0	-102.68	0.0203	17.4	13.6	21.1
<b>Milking place</b>									
	Pen/ barn	196	52.13	-0.03004	-109.73	0.1549	14.1	10.2	18
	Milking parlor	180	47.87	0	-109.73	0.1549	17.1	13.2	21
<b>Material used to dry teats</b>									
	None	79	22.2	-0.04844	-92.16	0.1392	13.3	8.1	18.6
	Common cloth	105	29.5	-0.05047	-92.16	0.1392	13.1	7.9	18.3
	Paper towel	172	48.3	0	-92.16	0.1392	18.2	14.1	22.2
<b>Milking system</b>									
	Open	220	67.5	-0.06128	-77.42	0.0145	14.5	10.7	18.3
	Closed	106	32.5	0	-77.42	0.0145	20.6	16	25.3
<b>Production system</b>									
	Extensive	205	54.52	-0.142	-114.91	0.0032	13.97	10.02	17.93
	Semi-intensive	143	38.03	-0.1321	-114.91	0.0032	14.96	10.75	19.18
	Intensive	28	7.45	0	-114.91	0.0032	28.17	20.19	36.15
<b>Milk evaluation against a dark surface</b>									
	No	207	55.05	-0.03078	-109.74	0.1573	14.1	10.3	18



<b>records and antimicrobial principle used</b>	No	343	92.2	-0.08211	-108.89	0.0468	15.13	11.66	18.61	
	Yes	29	7.8	0	-108.89	0.0468	23.35	15.02	31.64	
	<b>Antimicrobials protocol</b>									
	No	245	65.16	-0.02795	-109.33	0.2351	14.5	10.8	18.3	
	Yes	131	34.84	0	-109.33	0.2351	17.3	12.9	21.87	
	<b>Mastitis treatments record</b>									
	No	299	80.38	-0.04522	-106.92	0.0939	14.7	11.3	18.2	
	Yes	73	19.62	0	-106.92	0.0939	19.3	13.9	24.6	
	<b>Immediate mastitis treatment</b>									
	No	67	17.82	-0.1001	-121.32	0.0003	13.02	1.91	13.02	
	Yes	309	82.18	0	-121.32	0.0003	21.06	13.89	21.06	
	<b>Dry cow therapy</b>									
	None	73	19.62	-0.0691	-108.22	0.0074	11.81	6.44	17.18	
	Selective	103	27.69	-0.06246	-108.22	0.0074	12.48	7.57	17.38	
	Blanket	196	52.69	0	-108.22	0.0074	18.72	14.81	22.64	
	<b>Number of clinical mastitis treatment in the last month (continuous)</b>									
		1.3	1.8	0.03282	-118.45	<.0001				

Table 5. Multidrug resistance final multivariable mixed model by least square means (LSM)

Variables	Level	LSM (%)	95%CI		p
<b>Production System (con-founder)</b>	Extensive	13.1	8.6	17.5	<0.0001
	Semi-Intensive	13.7	8.3	19.0	<0.0001
	Intensive	Non-est	-	-	-
<b>Immediate Mastitis Treatment*</b>	No	Non-est	-	-	-
	Yes	Non-est	-	-	-
<b>Professional assistance to antimicrobial purposes</b>	Producer itself	30.32	22.1	38.5	<0.0001
	Agro technician	Non-est	-	-	-
	Veterinarian	12.36	7.7	17.0	<0.0001
<b>Production System*Professional assistance</b>	Extensive*Producer	12.8	6.5	19.0	<0.0001
	Extensive*Agro Tech.	17.9	10.8	25.0	<0.0001
	Extensive*Veterin.	8.6	3.6	13.6	0.0009
	Semi*Producer	14.6	5.9	23.2	0.0011
	Semi*Agro Tech.	14.3	3.2	25.5	0.0121
	Semi*Veterin.	12.1	7.0	17.2	<0.0001
	Intensive*Producer	63.6	44.0	83.2	<0.0001
Intensive*Veterin.	16.4	7.56	25.2	0.0003	

\* Beta estimate of 'not doing mastitis treatment immediately' = -0.082 (95%CI -0.135, -0.028);  $p = 0.0028$

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo foram estabelecidos dois objetivos principais: levantamento dos níveis de resistência das bactérias colonizadoras do úbere de bovinos aos principais compostos antimicrobianos utilizados na pecuária leiteira; e avaliação de fatores associados com a ocorrência de resistência múltipla, em nível animal e em nível de rebanho. Foram observados níveis moderados de resistência múltipla em *Staphylococcus* sp. de amostras de leite de bovinos. Evidências da distribuição etária de resistência múltipla nos bovinos, e de sua relação com sistemas de produção, uso de antimicrobianos e suporte técnico, demonstram que tanto produtores e veterinários, bem como legisladores e órgãos de saúde devem promover alternativas para evitar seu uso. Quando necessário, o uso de antimicrobianos deverá ser receitado e orientado por um médico veterinário a par da situação epidemiológica do rebanho. Por outro lado, consumidores devem exigir alimentos de maior qualidade sanitária e que prezem pelo bem-estar animal e pela sustentabilidade ambiental, visando a segurança alimentar das gerações futuras. Em nível nacional, o conhecimento do montante de antimicrobianos utilizados é importante para elucidar os níveis de resistência encontrados.

O manejo geral e nutricional de rebanhos leiteiros deve ser comprometido em prevenir doenças nos animais e preservar o bem-estar animal. Sistemas intensivos geram maior risco de desequilíbrio e perda da homeostase dos bovinos, com conseguinte amparo por químicos que geram resíduos e promovem resistência em algumas populações bacterianas. Nestes ambientes o diagnóstico breve e preciso, somado a medidas de parâmetros de bem-estar são necessários. Com testes laboratoriais preditivos de última geração já é possível avaliar a adaptação ambiental dos bovinos e identificar animais em risco. Muitos tratamentos antimicrobianos de casos crônicos não são justificados por uma análise de custo/ benefício, pois o desfecho de saúde esperado não é correspondido por administrações repetidas de drogas para algumas formas de mastite, e cabe a um médico veterinário avaliar caso a caso. O descarte sistemático de casos crônicos, potenciais reservatórios de isolados resistentes, deve ser aplicado no rebanho quando necessário. Alternativas promissoras começam a ser discutidas a medida que o conhecimento deste processo vai se aprofundando, como por exemplo os imunomoduladores, focados em aumentar a imunocompetência e resistência às doenças dos bovinos. Também, a combinação de peptídeos antimicrobianos naturais, pre e probióticos, assim como um microbioma adequado, podem promover a redução do uso de antimicrobianos a partir de um controle de doenças de todo o rebanho.

Por fim, a abordagem multinível em saúde pública é útil quando consideramos que os desfechos clínicos estão contextualizados por grupos sociais, indivíduos, órgãos, células e genes. O entendimento de um fenômeno biológico só é completo com a integração de várias áreas do saber, que contribuem reciprocamente para a formação de teorias e realização de testes empíricos.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- AARESTRUP, F. M., and JENSEN, N. E. Prevalence and duration of intramammary infection in Danish heifers during the peripartum period. **Journal of Dairy Science** 80: 307-312, 1997.
- ASHBOLT, N. J., AMÉZQUITA, A., BACKHAUS, T. Human Health Risk Assessment (HHRA) for environmental development and transfer of antibiotic resistance. **Environ. Health Perspect**; 121:993-1001, 2013.
- BABA, T., TAKEUCHI, F., KURODA, M., ITO, T., YUZAWA, H., HIRAMATSU, K. **The *Staphylococcus aureus* genome**. Harwood Publishing Limited, West Sussex, England, 2004.
- BAKER, M. D., ACHARYA, K. R. Superantigens: structure-function relationships. **International Journal of Medical Microbiology** 293: 529-537, 2004.
- BARKEMA, H., SCHUKKEN, Y.H., ZADOKS, R.N. Invited review: the role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. **Journal of Dairy Science**. 89: 1877-95, 2006.
- BOS, M. E. H., GRAVELAND, H., PORTENGEN, L., WAGENAAR, J. A., HEEDERIK, D. J. J. Livestock-associated MRSA prevalence in veal calf production is associated with farm hygiene, use of antimicrobials, and age of the calves. **Preventive Veterinary Medicine**. 105: 155-159, 2012.
- BRAEM, G., DE VliegHER, S., VERBIST, B., PIESSENS, V., VAN COILLIE, E., DE VUYST, L., LEROY, F., 2013. Unraveling the microbiota of teat apices of clinically healthy lactating dairy cows, with special emphasis on coagulase-negative staphylococci. **Journal of Dairy Science** 96: 1499-1510.
- CATRY, B., VAN DUIJKEREN, E., POMBA, M. C., GREKO, C., MORENO, M. A., PYORALA, S., RUZAUSKAS, M., SANDERS, P., THRELFALL, E. J., UNGEMACH, F., TORNEKE, K., MUÑOZ-MADERO, C. and TORRENEDO, J. Reflection paper on MRSA in food-producing and companion animals: epidemiology and control options for human and animal health. **Epidemiology and Infection** 138: 626–644, 2010.
- CHANTZIARAS, I., BAYEN, F., CALLENS, B. & DEWULF, J. Correlation between veterinary antimicrobial use and antimicrobial resistance in food-producing animals: a report on seven countries. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 69(3):827-834, 2014.
- CONSTABLE, P.D., PYORALA, S., SMITH, G.W. Orientações para o uso de antimicrobianos em bovinos. **Guia de antimicrobianos em Veterinária**, Guardabassi et al., Artmed, Porto Alegre, pp 189-195, 2010.

COMPTON, C. W. R., HEUER, C., PARKER, K. I., MCDOUGALL, S. Epidemiology of mastitis in pasture-grazed peripartum dairy heifers and its effects on productivity. **Journal of Dairy Science** 90: 1457-1470, 2007.

COSTA, E. F., SANTIAGO NETO, W., POETA, A. P. S., MELLO, J. R. B., CORBELLINI, L. G. Resistência de *Staphylococcus aureus* a antimicrobianos em rebanhos bovinos leiteiros com mastite: uma meta-análise. (não publicado)

CRAGO, B., FERRATO, C., DREWS, S. J., SVENSON, L. W., TYRRELL, G. AND LOUIE, M. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) in food samples associated with foodborne illness in Alberta, Canada from 2007 to 2010. **Food Microbiology** 32: 202–205, 2012.

CUNY, C., FRIEDRICH, A., KOZYTSKA, S., LAYER, F., NUBEL, U., OHLSEN, K., STROM-MENGER, B., WALTHER, B., WIELER, L. AND WITTE, W. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in different animal species. **International Journal of Medical Microbiology** 300: 109–117, 2010.

DAIRY. In: ESTADOS UNIDOS. Department of Agriculture. **PSD: production, supply and distribution online**. Reports. Washington, D.C.: United States Department of Agriculture - USDA, 2013. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/psdonline>>. Acesso em: set. 2013.

DE VISSCHER, A., SUPRÉ, K., HAESBROUCK, F., ZADOKS, R. N., PIESSENS, V., COILLIE, E. V., PIEPERS, S., DE VliegHER, S. Further evidence for the existence of environmental and host-associated species of coagulase-negative staphylococci in dairy cattle. **Veterinary Microbiology** 172: 466-474, 2014.

DENDANI, Z., ARCANGIOLI, M. A., BEZILLE, P. et al. Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis by Pulse-Field Gel Electrophoresis (PFGE). **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 9, n. 1, p.5-11, 2010.

DEVRIESE LA, VAN DAMME LR, FAMEREE L. Methicillin (cloxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis cases. **Zentralbl Veterinarmed B** 1972; 19: 598–605.53.

DIEZ-ROUX, A. V. Bringing context back into epidemiology: variables and fallacies in multilevel analysis. **American Journal of Public Health** 88:216–22, 1998.

DIEZ-ROUX, A. V. Multilevel Analysis in Public Health Research. **Annu. Rev. Public Health**, 21: 171-92, 2000.

- DUFOUR, S., DOHOO, I. R., BARKEMA, H. W., DESCÔTEAUX, L., DEVRIES, T. J., REYHER, K. K., SCHOLL, D. T. Manageable risk factors associated with the lactational incidence, elimination, and prevalence of *Staphylococcus aureus* intramammary infections in dairy cows. **Journal of Dairy Science** 95:1283-1300, 2011.
- DUNCAN, C., JONES, K., MOON, G. Context, composition, and heterogeneity: using multilevel models in health research. **Soc. Sci. Med.** 46:97–117, 1998.
- FOSTER, T. J. Immune evasion by staphylococci. **Nat Rev Microbiol** 3: 948-958, 2005.
- FOSTER, A. P. Staphylococcal skin disease in livestock. **Veterinary Dermatology** 23: 342–63, 2012.
- FOWLER JR., V. G., OLSEN, M. K., COREY, G. R., WOODS, C. W., CABELL, C. H., RELLER, L. B., CHENG, A. C., DUDLEY, T., ODDONE, E. Z. Clinical identifiers of complicated *Staphylococcus aureus* bacteremia. **Archives of Internal Medicine** 163: 2066-2072, 2003.
- FREEDMAN, D. From association to causation: some remarks on the history of statistics. **Statistical Science** 14: 243-258, 1999.
- GARCIA-GRAELLS, C., ANTOINE, J., LARSEN, J., CATRY, B., SKOV, R., DENIS, O. Livestock veterinarians at high risk of acquiring methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398. **Epidemiol Infect**; 140: 383–389, 2012.
- GARZONI, C., KELLEY, W. L. *Staphylococcus aureus*: new evidence for intracellular persistence. **Trends in Microbiology** 17 (2): 59-65, 2009.
- GILLESPIE, B. E., HEADRICK, S. I., BOONYAYATRIA, S., OLIVER, S. P. Prevalence and persistence of coagulase-negative *Staphylococcus* species in three dairy research herds. **Veterinary Microbiology** 134: 65-72, 2009.
- GORDON, R. J. & LOWY, F. D. Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. **Clinical Infectious Disease** 46 (Suppl 5): S350-S359, 2008.
- GRAVELAND H, WAGENAAR JA, HEESTERBEEK H, MEVIUS D, VAN DUIJKEREN E, HEEDERIK D. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in veal calf farming: human MRSA carriage related with animal antimicrobial usage and farm hygiene. **PLoS ONE**; 5: 10990, 2010.
- GREKO, C. 2013. Part 4: The interface between people and animals. In: Laxminarayan, R. et al., Antibiotic Resistance – the need for global solutions. **The Lancet Infectious Disease Commission**, pp 12-15, 2013.

HALASA, T., HUIJPS, K., OSTERAS, O., HOGEVEEN, H. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: A review. **Veterinary Quarterly** 29, 18–31, 2007.

HEBERT, A. et al. Demonstration of intracellular *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis alveolar cells and macrophages isolated from naturally infected cow milk. **FEMS Microbiol. Lett.** 193, 57-62, 2000.

HEYMAN, D. Control of Communicable Diseases Manual 18<sup>th</sup> edn. **American Public Health Association**, Washington DC, 2004.

HUIJPS, K. & HOGEVEEN, H. Stochastic modeling to determine the economic effects of blanket, selective, and no dry cow therapy. **Journal of Dairy Science** 90: 1225-34, 2007.

HUIJPS, K., LAM, T.J., HOGEVEEN, H. Costs of mastitis: Facts and perception. **Journal of Dairy Research** 75, 113–120, 2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE), 2012. Diferença entre leite adquirido e industrializado - Unidades da Federação e Brasil - primeiro trimestre de 2012. Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, Pesquisa Trimestral do Leite, 1<sup>o</sup> trimestre de 2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE), 2013. Indicadores IBGE, Estatística da Produção Pecuária, Dezembro de 2013, pp. 20-24, 31; 33; 37-38; 45.

ITO, T., KATAYAMA, Y., HIRAMATSU, K. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire mec DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. **Antimicrobials Agents Chemotherapy** 43: 1449-1458, 1999.

JAY, J. M. Gastreenterite estafilocócica. In: JAY, J. M. Microbiologia de Alimentos. 6a ed., Porto Alegre: Artmed, cap. 23, p.471-489, 2005.

JUHÁSZ-KASZANYITZKI, E., JÁNOSI, S., SOMOGYI, P., DÁN, A., VAN DER GRAAF-VAN BLOOI, L., VAN DUIJKEREN, E., WAGENAAR, J. A. MRSA transmission between cows and humans. **Emergent Infectious Disease** 13: 630-632, 2007.

KECHRID, A., PEREZ-VAZQUEZ, M., SMAOUI, H., HARIGA, D., RODRIGUEZ-BANOS, M., VINDEL, A., BAQUERO, F., CANTON, R., DEL, C.R. Molecular analysis of community-acquired methicillin-susceptible and resistant *Staphylococcus aureus* isolates recovered from bacteraemic and osteomyelitis infections in children from Tunisia. **Clinical Microbiology and Infection** 17, 1020-1026, 2011.

KHALIL, H. et al. Invasion of bone cells by *Staphylococcus epidermidis*. **Microbes Infect.** 9, 460-465, 2007.

KHANNA, T., FRIENDSHIP, R., DEWEY, C., WEESE, J.S. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* colonization in pigs and pig farmers. **Veterinary Microbiology** 128, 298-303, 2008.

KLUYTMANS, J., VAN LEEUWEN, W., GOESSENS, W. et al. Food-initiated outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* analyzed by phenotypic and genotyping. **J Clin Microbiol**; 33: 1121–1128, 1995.

KRUT, O. Antibiotic-induced persistence of cytotoxic *Staphylococcus aureus* in non-phagocytic cell. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 53, 167-173, 2004.

KOHANSKI, M. A. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. **Cell** 130:797-810, 2007.

KUBICA, M. et al. A potential new pathway for *Staphylococcus aureus* dissemination: the silent survival of *S. aureus* phagocytosed by human monocyte-derived macrophages. **PLoS One** 3, e1409, 2008.

LEE, J. H., KIM, M. S., PARK, S. G. Analysis of foodborne disease outbreaks for improvement of food safety programs in Seoul, Republic of Korea, from 2002 to 2006. **Journal of Environmental Health** 71, 51-55, 2009.

LEVY, S. B. The antibiotic paradox: How miracle drugs are destroying the miracle. New York. Plenum Press, 1992.

LIU, G. Y., ESSES, A., BUCHANAN, J. T., DATTA, V., HOFFMAN, H. M., BASTIAN, J. F., et al. *Staphylococcus aureus* golden pigments impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity. **Journal of Experimental Medicine** 202: 209-215, 2005.

MARSHALL, B. M. & LEVY, S. B. Food animals and antimicrobials: impacts on human health. **Clin. Microbiol. Rev.**; 24:718-33, 2011.

MAZEL, D., DAVIES, J. Antibiotic resistance in microbes. **Cell Mol Life Sci** 56: 742-754, 1999.

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. Phenotypic and genetic antibiogram of methicillin-resistant staphylococci isolated from bovine mastitis in Korea. **Journal of Dairy Science** 90: 1176-1185, 2007.

MUÑOZ, M. A., WELCOME, F. L., SCHUKKEN, Y. H., ZADOKS, R. N. Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* mastitis outbreaks on a dairy farm in New York State. **Journal of Clinical Microbiology** 45: 3964-3971, 2007

NEAVE, F. K., DODD, F. H., KINGWILL, R. G., WESTGARTH, D. R. Control of mastitis in the dairy herd by hygiene and management. **Journal of Dairy Science** 52: 696-707, 1969.

NICHOL, K. A., ADAM, H. J., HUSSAIN, Z., MULVEY, M. R., MCCRACKEN, M., MATASEJE, L. F., THOMPSON, K., KOST, S., LAGACE-WIENS, P. R., HOBAN, D. J., ZHANEL, G. G. Comparison of community-associated and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Canada: results of the CANWARD 2007-2009 study. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease** 69, 320-325, 2011.

NORMANNO, G., CORRENTE, M., LA, S.G., DAMBROSIO, A., QUAGLIA, N.C., PARISI, A., GRECO, G., BELLACICCO, A.L., VIRGILIO, S., CELANO, G.V. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin product in Italy. **International Journal of Food Microbiology** 117, 219-222., 2007a

NORMANNO, G., LA, S.G., DAMBROSIO, A., QUAGLIA, N.C., CORRENTE, M., PARISI, A., SANTAGADA, G., FIRINU, A., CRISSETTI, E., CELANO, G.V. Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. **International Journal of Food Microbiology** 115, 290-296, 2007b.

NOVICK, R. P., & GEISINGER, E. Quorum sensing in staphylococci. **Annu Rev Genet** 42:541-564, 2008.

O'CONNOR, A. M., SARGEANT, J. M. 2014. Meta-analysis including data from observational studies. **Preventive Veterinary Medicine** 113, 313-322.

OIE. 2008. World Organization for Animal Health. Harmonisation of national antimicrobial resistance surveillance and monitoring programs. In: OIE. **Terrestrial animal health code**. Paris: OIE, 2008. (Capítulo 6.5. p. 1-7). Disponível em [http://www.oie.int/eng/nor-mes/Mcode/en\\_sommaire.htm](http://www.oie.int/eng/nor-mes/Mcode/en_sommaire.htm). Acesso em 20/11/2011.

OIE International Committee, The. **List of Antimicrobial Agents of Veterinary Importance** at its 75th General Session in May 2007, 2014.

PAGEL, S. W., GAUTIER, P. Use of antimicrobial agents in livestock. **Rev. Sci Tech.** 31: 148-88, 2012.

PEAK N., KNAPP, C. W., YANG, R. K., HANFELT, M. M., SMITH, M. S., AGA, D. S. AND GRAHAM D. W. Abundance of six tetracycline resistance genes in wastewater lagoons at cattle feed-lots with different antibiotic use strategies. **Environmental Microbiology** 9:143-151, 2007

PERSSON WALLER, K., ASPÁN, A., NYMAN, A., PERSSON, Y. & GRÖNLUND ANDERSSON, U. CNS species and antimicrobial resistance in clinical and subclinical bovine mastitis. **Veterinary Microbiology** 152:112-116, 2011.

PIEPERS, S., PEETERS, K., OPSOMER, G., BARKEMA, H. W., FRANKENA, K., DE VliegHER, S. Pathogen group risk factors at herd, heifer and quarter levels for intramammary infections in early lactating dairy heifers. **Preventive Veterinary Medicine** 99: 91-101, 2011.

PLATA, K., ROSATO, A. E., WEGRYZYN, G. *Staphylococcus aureus* as an infectious agent: overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity. **Acta Biochimica Polonica** 56 (4): 597-612, 2009.

PORTA, M. **Dictionary of epidemiology**, 5<sup>th</sup> Edit, Oxford University Press, pp 218-219, 2008.

PRICE, L. B., STEGGER, M., HASMAN, H. et al. *Staphylococcus aureus* CC398: host adaptation and emergence of methicillin resistance in livestock. **MBio**; 3: 305–311, 2012.

PROCTOR, R. A., VON EIFF, C., KAHL, B. C., BECKER, K., MCNAMARA, P., HERRMANN, M., PETERS, G. Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. **Nat Rev Microbiol** 4: 295-305, 2006.

PYÖRÄLÄ, S., TAPONEN, S. Coagulase-negative staphylococci – Emerging mastitis pathogens. **Veterinary Microbiology** 134, 3–8, 2009.

RADOSTITS O. M., LESLIE, K. E. & FETROW, J. Mastitis control in dairy herds, p.229-276. In: Radostits O.M., Leslie K.E. & Fetrow J. (Eds), **Herd Health Food Animal Production Medicine**. Philadelphia: W. B. Saunders, Philadelphia, 1994.

RAJALA-SCHULTZ, P. J., SMITH, K. L., HOGAN, J. S. & LOVE, B. C. Antimicrobial susceptibility of mastitis pathogens from first lactation and older cows. **Veterinary Microbiology** 102:33-42, 2004.

RAYMOND, M. J., WOHLRE, R. D., CALL, D. R. Assessment and promotion of judicious antibiotic use on dairy farms in Washington State. **Journal of Dairy Science** 89:3228-40, 2006.

ROBERT, A., SEEGER, H., BAREILLE, N. Incidence of intramammary infections during the dry period without or with antibiotic treatment in dairy cows – a quantitative analysis of published data. **Veterinary Research** 37: 25-48, 2006.

RUEGG, P. L. New perspective in udder health management. **Vet. Clin. North Am., Food Anim. Pract.** 28:149-163, 2012.

SAMPIMON, O. C., BARKEMA, H. W., BERENDS, J. M. G. A., SOL, J., LAM, T. J. G. M. Prevalence and herd-level risk factors for intramammary infection with coagulase-negative staphylococci in Dutch dairy herds. **Veterinary Microbiology** 134, 37-44, 2009.

SAMPIMON, O. C., ZADOKS, R. N., DE VliegHER, S., SUPRÉ, K., HAESEBROUCK, F., BARKEMA, H. W., SOL, J., LAM, T. J. G. M. Performance of API Staph ID 32 and Staph-Zym for identification of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine milk samples. **Veterinary Microbiology** 136, 300–305, 2009b.

SAWANT, A.A., GILLESPIE, B. E., OLIVER, S. P. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative *Staphylococcus* species isolated from bovine milk. **Veterinary Microbiology** 134: 73-81 2009.

SCALLAN, E., HOEKSTRA, R. M., ANGULO, F. J., TAUXE, R. V., WIDDOWSON, M. A., ROY, S. L., JONES, J. L. AND GRIFFIN, P. M. Foodborne illness acquired in the United States-major pathogens. **Emerging Infectious Diseases** 17: 7–15, 2011.

SCHEPHARD, R. W., MALMO, J., PFEIFFER, D. U. A clinical trial to evaluate the effectiveness of antibiotic treatment of lactating cows with high somatic cell counts in their milk. **Australian Veterinary Journal** 78: 763-8, 2000.

SCHWARZ, S., SILLEY, P., SIMJEE, S., WOODFORDS, N., VAN DUIJKEREN, E., JOHNSON, A.P. & GAASTRA, W. Assessing the susceptibility of bacteria obtained from animals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 65: 601-604, 2010.

SEFTON, A.M. Mechanisms of antimicrobial resistance: their clinical relevance in the new millennium. **Drugs** 62:557-566, 2002. (Apud RajalaSchultz et al., 2004)

SHATALIN, K. et al. H<sub>2</sub>S: a universal defense against antibiotics in bacteria. **Science** 334: 986-990, 2011.

SCHUKKEN, Y. H., GONZÁLEZ, R. N., TIKOFSKY, L. L., SCHULTE, H. F., SANTISTEBAN, C. G., WELCOME, F. L., BENNETT, G. J., ZURAKOWSKY, M. J., ZADOKS, R. N. CNS mastitis: Nothing to worry about? **Veterinary Microbiology** 134: 9-14, 2009.

SIMOR, A. E., GILBERT, N. L., GRAVEL, D., MULVEY, M. R., BRYCE, E., LOEB, M., MATLOW, A., MCGEER, A., LOUIE, L., CAMPBELL, J. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization or infection in Canada: National Surveillance and Changing Epidemiology, 1995-2007. **Infection Control and Hospital Epidemiology** 31, 348-356, 2010.

SNIJDERS, T. A. B. & BOSKER, R. J. Multilevel Analysis: An introduction to basic and advanced multilevel modeling 2<sup>nd</sup> Edition. SAGE Publication, London. pp. 247-248, 2012.

SORDILLO, L. Factors affecting mammary gland immunity and mastitis susceptibility. **Livestock Production Science** 98: 89-99, 2005.

SWITALSKI, L. M., PATTI, J. M., BUTCHER, W., GRISTINA, A. G., SPEZIALE, P., HOOK, H. A collagen receptor on *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with septic arthritis mediates adhesion to cartilage. **Molecular Microbiology** 7: 99-107, 1993.

SZABADOS, F. et al. *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 15305 is internalized into human urinary bladder carcinoma cell line 5637. **FEMS Microbiol. Lett.** 285, 163-169, 2008.

TALAN, D. A., KRISHNADASAN, A., GORWITZ, R. J., FOSHEIM, G. E., LIMBAGO, B., ALBRECHT, V., MORAN, G. J. Comparison of *Staphylococcus aureus* from skin and soft-tissue infections in US Emergency department patients, 2004 and 2008. **Clinical Infectious Diseases** 53, 144-149, 2011.

TAPONEN, S., DREDGE, K., HENRIKSSON, B., et al. 2002. Efficacy of intramammary treatment with procaine penicillin G vs. procaine penicillin plus neomycin in bovine clinical mastitis caused by penicillin-susceptible, gram-positive bacteria – a double blind field study. **Journal of Veterinary Pharmacological Therapy.** 26: 193-8.

TAPONEN, S., SIMOJOKI, H., HAVERI, M., LARSEN, H.D., PYÖRÄLÄ, S.. Clinical characteristics and persistence of bovine mastitis caused by different species of coagulase-negative staphylococci identified with API or AFLP. **Veterinary Microbiology** 115, 199–207, 2006.

TAPONEN, S., KOORT, J., BJÖRKROTH, J., SALONIEMI, H., PYÖRÄLÄ, S. Bovine intramammary infections caused by coagulase-negative staphylococci may persist throughout lactation according to amplified fragment length polymorphism based analysis. **Journal of Dairy Science** 90, 3301-3307, 2007.

TAPONEN, S., BJÖRKROTH, J., PYÖRÄLÄ, S. Coagulase-negative staphylococci isolated from bovine extramammary sites and intramammary infections in a single dairy herd. **Journal of Dairy Research** 75, 422–429, 2008.

TEUBER, M. Veterinary use and antibiotic resistance. **Current Opinion in Microbiology** 4: 493-499, 2001.

TIKOFISKY, L. L., & ZADOKS, R. N. Cross-infection between cats and cows: origin and control of *Streptococcus canis* mastitis in a dairy herd. **Journal of Dairy Science** 88: 2707-2713, 2005.

U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Bacteriological Analytical Manual, eighth ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, 1998.

U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Report of the FDA Retail Food Program Database of Foodborne Illness Risk Factors. U. S. Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, Washington, D. C., 2000.

VANDERHAEGHEN, W., PIEPERS, S., LEROY, F., VAN COILLIE, E., HAESEBROUCK, F., DE VLIEGHER, S. Effect, persistence, and virulence of coagulase-negative *Staphylococcus* species associated with ruminant udder health. **Journal of Dairy Science** 97, 5275–5293, 2014.

VON KORFF, M., KOESELL, T., CURRY, S., DIEHR, P. Multi-level research in epidemiologic research on health behaviors and outcomes. **American Journal of Epidemiology**. 135:1077–82, 1992.

VOSS, A., LOEFFEN, F., BAKKER, J., KLAASSEN, C., WULF, M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. **Emerging Infectious Diseases**; 11: 1965–1966, 2005.

WEESE, J. S., AVERY, B. P., REID-SMITH, R. J. Detection and quantification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clones in retail meat products. **Letters in Applied Microbiology** 51, 338-342, 2010.

WEGNER, C., HUBNER, N.O., GLEICH, S., THALMAIER, U., KRUGER, C.M., KRAMER, A., 2013. One-day point prevalence of emerging bacterial pathogens in a nationwide sample of 62 german hospitals in 2012 and comparison with the results of the one-day point prevalence of 2010. **GMS Hygiene and Infection Control** 8, DOC12.

WEGRZYN, G. What does “plasmid biology” currently mean? Summary of the Plasmid Biology 2004 Meeting. **Plasmid** 53: 14-22, 2005.

WELLINGTON, E. M., BOXALL, A. B., CROSS, P., et al.; 2013. The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in gram-negative bacteria. **Lancet Infectious Disease**; 13: 155-65.

WHO, 2011. Critically important antimicrobials for human medicine. 3<sup>rd</sup> revision. [http://www.who.int/foodborne\\_disease/resistance/cia/en](http://www.who.int/foodborne_disease/resistance/cia/en) (acessado em 1º nov 2013).

WILSON, D. J., GONZALEZ, R. N., CASE, K. L., GARRISON, L. L., GROHN, Y. T. Comparison of seven antibiotic treatments with no treatment for bacteriological efficacy against bovine mastitis pathogens. **Journal of Dairy Science** 82: 1664-70, 1999.

WISPLINGHOFF, H., BISCHOFF, T., TALLENT, S. M., SEIFERT, H., WENZEL, R. P., EDMOND, M. B. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: Analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Clinical Infectious Disease** 39: 309-17, 2004.

WULF, M. W. H., MARKESTEIN, A., VAN DER LINDEN, F. T., VOSS, A., KLAASSEN, C., VERDUIN, C. M. First outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in a Dutch hospital, June 2007. **Euro Surveill**; 13: 8051, 2008.

WULF, M. W., SØRUM, M., VAN NES, A. et al. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among veterinarians: an international study. **Clinical Microbiology and Infections**; 14: 29–34, 2008.

WULF, M., & VOSS, A. MRSA in livestock animals – An epidemic waiting to happen? **Clinical Microbiology and Infections** 14: 519-521, 2009.

YILDIRIM, A. O., LÄMMLER, C., WEISS, R., KOPP, P. Pheno- and genotypic properties of streptococci of serological group B of canine and feline origin. **FEMS Microbiology Letters** 212: 187-192, 2002.

ZADOKS, R. N., VAN LEEUWEN, W. B., KREFT, D., FOX, L. K., BARKEMA, H. W., SCHUKKEN, Y. H., VAN BELKUM, A. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine and human skin, milking equipment, and bovine milk by phage typing, pulsed-field gel electrophoresis, and binary typing. **Journal of Clinical Microbiology** 40: 3894-3902, 2002.

ZADOKS, R. N., MIDDLETON, J. R., MCDUGALL, S., KATHOLM, J., SCHUKKEN, Y. H. Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and comparative relevance to humans. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia** 16, 357–372, 2011.

ZIEBUHR, W. et al., 2006. Nosocomial infections by *Staphylococcus epidermidis*: how a commensal bacterium turns into a pathogen. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 28 (supple 1), S14-S20.

## APÊNDICIE A Questionário

**Formulário**

Código do rebanho: GL

Proprietário:

Telefone:  e-mail:

**1. LOCALIZAÇÃO DO REBANHO**

1.1. Coordenadas geográficas: Latitude:  Longitude:

1.2. Endereço:

1.3. Cidade:

1.4. Micro-região:

1.5. Meso-região:

1.6. Estado:

**2. CARACTERÍSTICAS GERAIS DO REBANHO**

2.1. Número de vacas em lactação:

2.2. Número de vacas de primeira cria:

2.3. Número de vacas de segunda cria:

2.4. Número de vacas de terceira cria:

2.5. Número de vacas com mais de 3 crias:

2.6. Número de vacas secas:

2.7. Produção total de leite por dia:  litros.

2.8. Sistema de produção:

2.9. Raça do rebanho:

2.10. Tipo de ordenha:

2.11. Presença do bezerro no momento da ordenha:

Record: 1 of 20 | No Filter | Search

Novo  
Atualizar  
Excluir  
↑ ↓ ← →

**3. INFRA-ESTRUTURA DA PROPRIEDADE**

3.1. Local de ordenha:

3.2. Ordenha mecânica:

3.3.

3.4. Armazenamento do leite:

**4. PROGRAMA DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE MASTITE**

4.1. Há acompanhamento do rebanho por um técnico?

4.2. Examina os primeiros jatos de leite (teste da caneca de fundo escuro)?  teste\_caneca

4.3. Lava os tetos com água antes da ordenha?

4.4. Desinfeta os tetos antes da ordenha?

4.5. O que usa para secar os tetos?

4.6. Desinfeta os tetos depois da ordenha?

4.7. Realiza o tratamento imediato de todos os casos clínicos de mastite?

4.8. Realiza o tratamento da vaca seca (tratamento a secagem)?

4.9. Qual o critério para descarte de animais?

4.10. Envia amostra de leite de animais para exames microbiológicos?

4.11. Se envia, qual é a finalidade dos exames microbiológicos?

4.12. Faz contagem de células somáticas:

4.13. Anotar as três últimas contagens de células somáticas obtidas no rebanho:

4.14. Observa e respeita o período de carência quando trata as vacas em lactação com antimicrobianos?

4.15. Qual é o destino do leite com resíduos de antimicrobianos?

**5. APLICAÇÃO DE ANTIBIÓTICOS**

5.1. Quais os casos em que usa tratamento com antimicrobianos das vacas?

5.2. Há um protocolo de uso de antimicrobianos para tratamento de mastite?

5.3. Se a resposta do item 5.2 for afirmativa, anotar o protocolo usado:

5.4. Quem recomenda os medicamentos para tratamento da mastite?

5.5. Há registro (anotação) dos tratamentos para mastite?

5.6. Há registro (anotação) dos tratamentos para outras doenças?

5.7. Utiliza alguma maneira visual para marcar os animais tratados com antimicrobianos?

5.8. Utiliza algum antimicrobiano da linha não-veterinária para tratamento da mastite?

5.9. Quantos tratamentos de mastite clínica foram realizados nos último mês?

5.10. Anote o nome comercial e as bases dos antimicrobianos utilizados na propriedade. - Verificar na farmácia da propriedade quais medicamentos consta no estoque: (Em caso de produção orgânica, enumere os produtos)

**6. QUESTÕES PARA VERIFICAR A DISSEMINAÇÃO DA RESISTÊNCIA**

6.1. Existe o hábito de consumir leite (leite cru) na propriedade?

6.2. O leite produzido é usado para preparação de derivados lácteos na própria fazenda?

6.3. Se a resposta do item 6.2 for afirmativa, o leite é pasteurizado?

6.4. Vende animais para outras propriedades?

6.5. Se a resposta do item 6.4 for afirmativa, qual a categoria dos animais vendidos?

Observações (caso haja alguma observação relacionada a alguma questão do questionário, usar o número da questão para identificação da observação):

4.6 - Não desinfeta os tetos após ordenha  
4.11 - "vazio"  
4.15 - "Outro destino"  
6.4 - Não é frequente  
Não respondidos: 4.13 e 5.3

Data da entrevista: 03/05/2011

Entrevistador: Thais Campos

## APÊNDICE B Comandos do modelo misto de resistência múltipla no SAS®

```

/*proc corr*/
proc corr data=atb;
var antimicrobiano_ nao_veterinaria bezerro_ordenha desinfeta_tetos_antes
desinfeta_tetos_depois gir idade lava_tetos local_ordenha mastite materi-
al_seca_tetos mestico nao_tem_ordenha_mecanica ordenhas_dia perio-
do_carencia_antimicrobianos producao_leite_dia categoria protoco-
lo_antimicrobianos registro_tto_mastite sistema_producao suinos tecni-
co_rebanho teste_caneca tipo_ordenha tratamento_imediato_mastite tratamen-
to_secagem tratamentos_mastite_clinica vacas_1cria vacas_2cria vacas_3cria
vacas_acima_3cria vacas_lacta vacas_secas;

/*colinearidade*/
proc reg data=atb;
model MR_1 = antimicrobiano_ nao_veterinaria bezerro_ordenha desinfe-
ta_tetos_antes gir idade lava_tetos mastite material_seca_tetos mestico
nao_tem_ordenha_mecanica ordenhas_dia periodo_carencia_antimicrobianos
protocolo_antimicrobianos registro_tto_mastite suinos tecnico_rebanho tes-
te_caneca tipo_ordenha tratamento_imediato_mastite/ tol VIF collin;
run;

/*modelo final*/
proc mixed data=atb;
class estado coleta tratamento_imediato_mastite sistema_producao tecni-
co_rebanho;
model MR_1= tratamento_imediato_mastite sistema_producao tecnico_rebanho
sistema_producao*tecnico_rebanho / solution cl ddfm= satterth;
random intercept/ subject=estado*coleta type=UN solution cl;
lsmeans sistema_producao tratamento_imediato_mastite tecnico_rebanho siste-
ma_producao*tecnico_rebanho /cl;
run;

```

## Relação da idade na presença de bactérias resistentes a antimicrobianos em rebanhos leiteiros no Rio Grande do Sul<sup>1</sup>

Waldemir Santiago-Neto<sup>2,3\*</sup>, Gustavo Machado<sup>2,3</sup>, Daniel S. Paim<sup>3</sup>, Thais de Campos<sup>3</sup>, Maria A.V.P. Brito<sup>4</sup>, Marisa R.L. Cardoso<sup>3</sup> e Luís G. Corbellini<sup>2,3</sup>

**ABSTRACT.** Santiago-Neto W, Machado G, Paim D.S., Campos T, Brito M.A.V.P., Cardoso M.R.L. & Corbellini L.G. 2014. [Age related to the presence of antimicrobial resistant bacteria in twenty one dairy herds in Rio Grande do Sul, Brazil.] Relação da idade na presença de bactérias resistentes a antimicrobianos em rebanhos leiteiros no Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 34(7):613-620. Laboratório de Epidemiologia Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 91540-000, Brazil. E-mail: [wal\\_sanet@hotmail.com](mailto:wal_sanet@hotmail.com)

Bovine mastitis is an important disease in dairy cattle due to its high incidence and economic losses associated mainly with reduced milk production and treatment costs. The use of antimicrobials to treat clinical cases and at dry off raises the concern of selection of resistant bacterial strains. This may also reflect on public health, since resistant bacteria, such as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), may be transmitted to humans by direct contact with infected animals or by dairy products. The resistance of bacteria to antimicrobials has risen, in general, due to ineffective therapy. Studies in Brazil with non-random samples show increase in resistance pattern, mainly in *S. aureus*. The exposition to repeated antimicrobial treatment throughout the consecutive lactations of cows may be a predisposing factor to development of antimicrobial resistance in bacteria that infect the udder. Thus, the aim of this study was to determine the possible causal association between antimicrobial resistance in bacteria isolated from bovine udder milk and animal data such as age and lactation period. Milk samples were collected from 21 randomly selected dairy herds from Rio Grande do Sul, southernmost Brazilian state, from the target population of 1656 semi-intensive dairy farms, stratified by her size. The sample unit was considered the bacteria, and for the prevalence estimation a frequency of 35% *Staphylococcus* sp. penicillin resistant; an absolute precision of 12%; and 90% confidence level were used. Bacteria were isolated from composite milk samples obtained from all quarters of each cow after discarding the initial three or four streams of milk. To access potential risk factors, animal characteristics were obtained through an interview with the producers. Laboratory tests were done according to National Mastitis Council recommendations. A total of 242 isolates was obtained from 195 cows out of 251 cows sampled. The prevalence of animal infections was described in groups according to the epidemiological profile: environmental, contagious and other bacteria. These were 57.3%, 26.3% and 11.2%, respectively of the sampled animals. Antimicrobial susceptibility tests against 12 different antimicrobials were performed in 159 isolates. Altogether, 30% of the isolates tested showed resistance to at least three different antimicrobial groups and were classified as multidrug-resistant. Higher frequencies of resistance were observed against ampicillin to coagulase-negative sta-

<sup>1</sup>Recebido em 8 de março de 2014.

Aceito para publicação em 7 de maio de 2014.

<sup>2</sup> Laboratório de Epidemiologia Veterinária (EPILAB), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 91540-000, Brasil. \*Autor para correspondência: [wal\\_sanet@hotmail.com](mailto:wal_sanet@hotmail.com)

<sup>3</sup> Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 91540-000.

<sup>4</sup> Embrapa Gado de Leite, Rua Eugênio do Nascimento 610, Dom Bosco, Juiz de Fora, MG 36038-330, Brasil.