

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

ELIANE APARECIDA DE SOUZA FANTON

**PREVALÊNCIA DE CEPAS RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS NO SOLO,
ÁGUA, E VEGETAIS, SOB INFLUÊNCIA DE DEJETOS DE ANIMAIS**

DISSERTAÇÃO

FRANCISCO BELTRÃO

2021

ELIANE APARECIDA DE SOUZA FANTON

Prevalência de cepas resistentes a antibióticos no solo, água, e vegetais, sob influência de dejetos de animais

Prevalence of antibiotic-resistant strains in soil, water and vegetables under the influence of animal waste

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Engenharia Ambiental: Análise e Tecnologia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientador Prof. Dr. Eder da Costa dos Santos.

FRANCISCO BELTRÃO

2021



Esta licença permite que outros remixem, adaptem e criem a partir do trabalho para fins não comerciais, desde que atribuam o devido crédito e que licenciem as novas criações sob termos idênticos. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



ELIANE APARECIDA DE SOUZA FANTON

PREVALÊNCIA DE CEPAS RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS NO SOLO, ÁGUA, E VEGETAIS, SOB INFLUÊNCIA DE DEJETOS DE ANIMAIS.

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestra Em Engenharia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Meio Ambiente.

Data de aprovação: 31 de Março de 2021

Prof Eder Da Costa Dos Santos, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof Marcelo Bortoli, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof.a Silvia Eugenia Barrera Berdugo, Doutorado - Universidad Industrial de Santander

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 01/06/2021.

AGRADECIMENTOS

A Deus, sem Ele não sou ninguém, tenho sempre amparo, proteção, amor, tranquilidade e calma nos momentos difíceis e a certeza de estar sempre muito bem acompanhada,

A meu esposo, pela compreensão, espera e carinho, pelo entendimento e afeto com aceitação de minhas ausências.

Aos meus familiares, sempre apoiando, auxiliando nos momentos de necessidade, eterna gratidão, família é o ponto de partida e de chegada onde tenho certeza de acolhida sempre.

Ao meu Orientador Eder por todo apoio, ensinamentos, compreensão, paciência, por confiar em mim, muito obrigada, jamais esquecerei, gratidão por tudo.

Ao Estagiário Vinicius, que me auxiliou nas análises laboratoriais, muito obrigada.

A minha amiga e colega de mestrado Raoana, me ajudou muito, disponibilizou sua casa e companhia muitas vezes, muito obrigada, és especial.

Aos dirigentes da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus de Francisco Beltrão pelo apoio e disponibilização de todo o aparato laboratorial, muito obrigada, me senti em casa ao estudar, pois possibilitou suporte para realização dessa pesquisa.

A todos os colegas, professores e amigos do curso de mestrado, pois de uma forma ou outra sempre contribuem para nossa formação e aprendizado mesmo fora da sala de aula.

A todos que contribuíram para que essa minha caminhada até aqui fosse possível.

“Repare que a luz não se suja, mesmo quando é refletida no pântano mais obscuro”.
Procure sempre ter pensamentos bons, por que eles não serão manchados;
Mesmo, quando refletidos em ambientes menos “puros”.

RESUMO

Doenças provocadas por microrganismos resistentes a antibióticos já superam 700 mil mortes por ano, esse número poderá subir para mais de dez milhões de mortes ao ano até 2050, causa o aumento com os gastos em saúde, e pode levar mais de 24 milhões de pessoas a pobreza extrema até 2030. A resistência a antimicrobianos é um problema de saúde pública que preocupa lideranças do mundo inteiro e cresce a níveis alarmantes, onde as causas podem ser controladas pelo uso consciente e correto de antibióticos. Um dos efeitos que mais preocupam as lideranças em saúde são o uso de antimicrobianos na dieta animal para promoção de crescimento e prevenção de doenças, esse dado é ainda mais preocupante pelo fato de que 80% desses medicamentos são excretados por não serem metabolizados. O presente estudo verificou a prevalência de microrganismos resistentes à antibióticos em dejetos de animais domésticos (aves, suínos e bovinos), no solo, nos vegetais adubados e nas águas adjacentes pelo método de cultivo microbiológico usando discos de difusão para três fármacos. Dos três fármacos testados para resistência o mais eficiente foi a Tetraciclina 30 ug, seguido pela estreptomicina 10 ug, sendo a penicilina 10 ug o fármaco menos indicado a ser usado, onde 61,11% das amostras analisadas apresentaram resistência a esse antibiótico. A persistência de patógenos resistentes nos hortifrutigranjeiros de consumo *in natura* após limpeza e pré assepsia usando álcool a 70% e hipoclorito de sódio a 2,5%, foi comprovada em pelo menos um dos antibióticos examinados em 100% das amostras testadas.

Palavras-chave: dejetos; resistência; antibióticos; saúde; persistência.

ABSTRACT

Diseases caused by microorganisms resistant to antibiotics already surpass 700 thousand deaths per year, this number could rise to more than ten million deaths per year by 2050, causes the increase in health spending, and can lead more than 24 million people to extreme poverty by 2030. Antimicrobial resistance is a public health problem that worries leaders worldwide and grows at alarming levels, where the causes can be controlled by the conscious and correct use of antimicrobials. One of the effects that most concern health leaders is the use of antimicrobial in the animal diet for growth promotion and disease prevention, this fact is even more worrying because 80% of these drugs are excreted because they are metabolized. The present study verified the prevalence of microorganisms resistant to antibiotics in the waste of domestic animals (birds, swine and cattle), in the soil, in the fertilized vegetables and in the adjacent waters by the microbiologicals culture method using diffusion discs. Of the three drugs tested for resistance, the most efficient was tetracycline at 30 ug, followed by streptomycin 10 ug, with penicillin 10 ug being the least indicated drug to be used, where 61,11% of the analyzed samples showed resistance to this antibiotic. The persistence of resistant pathogens in fresh fruit and vegetables after cleaning and pre-asepsis using 70% alcohol and 2,5% sodium hypochlorite, was proven in at least of the antibiotics examined in 100% of the tested samples

Keywords: waste; resistance; antibiotics; health; persistence.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RAM – Resistência antimicrobianos

OMS – Organização Mundial da Saúde

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

TSA - Teste de sensibilidade a antimicrobianos

CIM - Concentração inibitória mínima

CBM – Concentração bactericida mínima

EUA- Estados Unidos da América

WHO- World Health Organization (Organização Mundial da Saúde)

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária

RNA- Ácido Ribonucleico

SNC- *Stafilococos coagulase* Negativo

DNA- Ácido Desoxirribonucleico

RNase- Ribonuclese

S- Sensível

R- Resistente

S- Sensível com aumento da exposição

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	OBJETIVOS.....	13
2.1	Objetivo Geral	13
2.2	Objetivos específicos.....	13
3	JUSTIFICATIVA	14
4	REVISÃO DE LITERATURA.....	16
4.1	Resistência a antibióticos: O problema Mundial.....	16
4.2	Antibiótico/ antimicrobiano.....	18
4.2.1	Penicilina - β -lactâmicos:	19
4.2.2	Tetraciclina - bacteriostáticos:.....	19
4.2.3	Estreptomicina - Aminoglicosídeos:	20
4.3	Causas da resistência.....	21
4.3.1	Microbiologia do solo e águas residuais – A disseminação de RAM	22
4.3.2	A Produção animal e o uso de medicamentos	23
4.3.3	A avicultura, bovinocultura e suinocultura – o segredo do Sucesso.	24
4.3.4	Substratos, fármacos e patógenos da produção animal com ação na produtividade vegetal.	26
5	MATERIAIS E MÉTODOS	28
5.1	Obtenção das amostras	28
5.1.1	Amostras de solo	28
5.1.2	Amostras de água	30
5.1.3	Amostras de vegetais	31
5.2	Cultivo microbiológico	31
5.2.2	Preparo dos meios de cultura.....	32
5.2.3	Inoculação das amostras de solo/lodo	32
5.2.4	Inoculação das amostras de água.....	32
5.2.5	Preparo e inoculação das amostras de vegetais	33
5.3	Incubação das amostras	33
5.3.1	Seleção dos microrganismos	34
5.4.	Coloração de gram.....	35
5.5	Extração do DNA.....	35

6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
6.1	A análise	38
6.1.2	Solos e dejetos	38
6.2.2	Amostras de água.	39
6.2.3	Amostras de hortaliças adubadas com rejeitos de bovinos.....	39
7	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
7.1	Amostras de solo e lodo.....	40
7.2	Amostras de água e hortaliças.....	49
8	CONCLUSÕES.....	56
9	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	57
	REFERÊNCIAS.....	58

1 INTRODUÇÃO

Uma pesquisa da ONU (Organização das Nações Unidas) revelou: infecções que não respondem aos medicamentos são responsáveis por mais de 700 mil óbitos ao ano, e até 2050 esse número pode subir a dez milhões ao ano pela resistência a antimicrobianos (ONU, 2019).

Um fator preocupante é a introdução de antibióticos na criação animal. Esses medicamentos são utilizados para profilaxia, uso terapêutico no tratamento de infecções, prevenção de doenças e promoção de crescimento como práticas rotineiras à produção agropecuária já a mais de 50 anos (LOAYZA, et. al., 2020), além de oferecer riscos a saúde pública o uso de antibióticos limita a exportação a países com restrição ao uso de antibióticos na criação de animais. O uso de antibióticos na produção animal está disseminando microrganismos resistentes ao meio ambiente com impactos assustadores na saúde humana.

A utilização de medicamentos que promovem resistência, assim como o tratamento dos resíduos excretados pelos animais, são motivos de investigação constante, principalmente pelo uso dos dejetos na melhoria da qualidade do solo para cultivo de vegetais. A associação do uso dos dejetos produzidos pelos animais a fertilidade do solo obtém-se resultados positivos à produtividade vegetal, o que melhora consideravelmente a contribuição econômica do meio rural, proporcionando ainda melhorias nas propriedades biológicas, físicas e químicas de um solo. Essa prática precisa de estudos para propor melhorias no tratamento dos dejetos da produção animal com objetivo de impedir a propagação dos microrganismos resistentes no ambiente.

A incorporação de dejetos para melhoria da fertilidade modificam as variáveis biológicas presentes em suas propriedades, pois, pode conter em sua composição microrganismos potencialmente prejudiciais a saúde humana (MELO, 2007), (WHO, 2015). É o solo a base que sustenta todos os organismos e estruturas, é nele que habitam grande número de espécies microscópicas, agentes de cura e disseminação de doenças. É o solo que armazena e define a qualidade das águas servidas aos animais e humanos, líquido indispensável à vida é fonte de saúde que pode conter patógenos que promovem a doença e até a morte (MELO, 2007), um solo saudável promove a saúde dos vegetais e animais.

A resistência aos antimicrobianos é um dos maiores desafios da saúde pública, segundo os organizadores do Plano de ação nacional de prevenção e controle da resistência aos antimicrobianos. De acordo com Brasil, (2018) embora a resistência seja um fenômeno natural, há maior pressão seletiva e disseminação desses por fatores como: mau uso dos antimicrobianos na saúde humana, programas deficientes ou inexistentes em controle de infecções, antimicrobianos de má qualidade, capacidade laboratorial fraca, vigilância e monitoramento inadequados, fiscalização e regulamentação do uso de antimicrobianos insuficiente.

A preocupação com o tema é de relevância global que além de ocorrer em todo o mundo, está comprometendo a capacidade de tratar doenças infecciosas, além de prejudicar outros avanços em saúde e medicina, enfatiza a Organização mundial da Saúde (WHO, 2015), (DRAMÉ, et. al. 2020). Medidas importantes para conter a problemática estão sendo adotadas, após a normativa da União Européia que desde 2006 proíbe uso de antimicrobianos, vários países vem aderindo a essa alternativa para conter os avanços da resistência, já em 2017 os estados Unidos da América proibiu a utilização de antimicrobianos de importância humana para produção animal, medida esta que restringe a comercialização de carne com uso de antimicrobianos (ICC BRASIL, 2021), o Brasil desde dezembro de 2018 publicou a portaria Nº 171 que proíbe o uso de alguns antimicrobianos na produção animal (MAPA, 2018).

Diante do contexto apresentado, diante da pandemia que o mundo enfrenta no momento, faz-se necessária a investigação para identificar e quantificar os microrganismos resistentes presentes nos solos e águas residuais fertilizados com dejetos de suínos, aves e bovinos, testando 3 fármacos, doses, temperatura e tempo de exposição para identificar agentes e fatores de resistência a medicamentos antimicrobianos no solo, água e nos vegetais produzidos com os dejetos desses animais no ambiente rural de produção agropecuária.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a sensibilidade a antimicrobianos em microrganismos cultiváveis *in vitro*, presentes em solo, água e vegetais, sob influência do despejo de dejetos animais (suínos, aves e bovinos).

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o desempenho de três fármacos no controle de microrganismos cultiváveis *in vitro* oriundos de solo, água, e vegetais, fertilizados com dejetos de animais,
- Identificar nível de contágio microbiológico a suscetibilidade de organismos resistentes nos diferentes substratos (solo e água nos diferentes dejetos).
- Identificar a persistência dos microrganismos resistentes em vegetais,
- Avaliar o risco biológico em águas servidas. (presença de microrganismos resistentes).

3 JUSTIFICATIVA

Em alguns países aproximadamente 80% do uso de antimicrobiano de importância clínica está sendo utilizado para promover o crescimento de animais saudáveis, sabendo que aproximadamente 80% do medicamento consumido não é metabolizado, sendo excretado por estes ao ambiente natural (BRASIL, 2017). Esse número retrata o ambiente que temos de acordo com os resíduos gerados. Nos últimos 60 anos, antimicrobianos são rotineiramente administrados aos animais em pequenas proporções para melhorar a conversão alimentar e assim o desempenho produtivo animal (RABELLO et. al., 2020).

A humanidade vive em momentos atuais uma pandemia, já teve em décadas passadas muitos problemas de saúde sem solução, onde era comum perder membros da família, em qualquer idade, por doenças que foram solucionadas com a descoberta dos antimicrobianos.

O uso excessivo de agentes antimicrobianos, tratamento empírico inadequado tem contribuído para o aumento de infecções por microrganismos multirresistentes, tornando os tratamentos mais complexos, aumentando os custos em hospitalização e tratamentos para esses pacientes (SILVA & ARAUJO, 2019). Sem medicamentos eficazes ou com surtos de cepas resistentes, a saúde nacional e mundial pode sofrer um colapso, onde serão prejudicados os seres humanos em primeiro grau. Muitas pesquisas realizadas demonstram a preocupação com a questão da resistência dos microrganismos enfatizada pelos autores (GHOETEM, et. al., 2018), (KHALED, 2016), (MACHADO, et. al., 2006), (NESME, et. al., 2014), pela organização mundial da saúde (OMS) e pela organização nacional de saúde (NOS), que traçou em 2018 um plano de ação nacional de prevenção e controle da resistência a antimicrobianos no âmbito da saúde única até 2022 (BRASIL, 2018), (WHO, 2015).

A saúde ambiental reflete a saúde dos seres humanos, um exemplo é comprovado pelo estudo recente que demonstra resistência ao antisséptico clorexidina, de uso tópico em ambientes hospitalares (KHAN, 2019), o que justifica maior preocupação relacionada a infecção hospitalar e a responsabilidade de todos os setores envolvidos na promoção da saúde humana e animal.

A resistência a antimicrobianos impactam a morbidade e mortalidade humana e animal, além de aumentar os custos com tratamentos em saúde, (ANVISA, 2020). Nesse contexto torna-se imprescindível investigar a presença de microrganismos

resistentes a fármacos, empregados na medicina curativa humana e veterinária, oriundos de dejetos da cadeia de produção de proteína animal, e sua prevalência no solo e na água.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Resistência a antibióticos: o problema mundial

O tratamento com antibióticos proporcionou ao mundo, aumento da expectativa de vida, reduziu a mortalidade e morbidade, melhorou o conforto, a capacidade de cura, a qualidade de saúde das pessoas, salvando inúmeras vidas. Todavia, essa tecnologia de valor terapêutico imensurável à humanidade encontra-se ameaçada (BINGYUN e WEBSTER, 2018), (WHO, 2015). Dentre os microrganismos patogênicos com efeitos deletérios significativos a saúde humana pode-se destacar: *Enterococcus faecium*; *Streptococcus aureus*; *Klebsiella pneumoniae*; *Streptococcus pneumoniae*; *Salmonella* spp.; *Shigella* spp.; *Neisseria gonorrhoea*; *Escherichia coli*; *Acinetobacter baumannii*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Enterobacter* spp. (BINGYUN e WEBSTER, 2018).

O relatório global publicado pela Organização Mundial de Saúde, (2014) alerta que a resistência antimicrobiana (RAM) já é uma ameaça à prevenção e ao tratamento de infecções causadas por bactérias, parasitas, vírus e fungos, e faz uma advertência séria a medicina moderna onde problemas de infecções comuns e ferimentos leves na atualidade podem matar. O relatório conta com a parceria de países aliados e enfatiza que a RAM atingiu níveis alarmantes em muitas partes do mundo, onde muitas opções de tratamento já são ineficazes.

A introdução de antibióticos melhorou drasticamente o destino de pacientes infectados por *Staphylococcus aureus*, doença antes tratada com a amputação de membros infectados pela bactéria como forma de paralisar a disseminação e evitar a morte por bacteremia. Foi a causa da amputação em 70% dos casos infecciosos da primeira guerra mundial (BINGYUN e WEBSTER, 2018).

Muitos antibióticos são essenciais como tratamentos de último recurso para infecções multirresistentes em humanos (BRASIL, 2017), e a prevalência de agentes de resistência a antimicrobianos no solo representam um alto risco a ecologia do solo e a saúde pública (FANG, et. al., 2015).

Estudos realizados por Bingyun e Webster (2018) revelam que somente nos EUA (Estados Unidos da América) as bactérias resistentes causam ao menos 2 milhões de infecções e 23 mil óbitos, com impacto econômico aproximado de 55 a 70 bilhões de dólares ao ano. Os autores enfatizam a ocorrência de resistência de *S. aureus* a

meticilina, usada para tratamentos clínicos em cirurgias ortopédicas, relacionada a maior morbidade e mortalidade para esses procedimentos. Esses números podem subir em escala geométrica se não forem adotadas medidas como diminuição do uso de antibióticos em animais sadios, uso inadequado de medicamentos pelos pacientes e tratamentos interrompidos (BINGYUN e WEBSTER, 2018).

Para diminuir a resistência é necessário conhecer os microrganismos responsáveis pelo tipo de infecção a ser tratada, utilizar o medicamento apropriado, na dose certa no tempo adequado para eliminar o patógeno (MELO et. al., 2012). Muito importante ainda que toda a população do globo se conscientize sobre as consequências da RAM (WHO, 2015).

A Organização Mundial da Saúde, (2015) salienta que a resistência a medicamentos antimicrobianos está acontecendo em todas as partes do mundo, envolvendo uma ampla gama de microrganismos que ameaçam a saúde humana e animal. As consequências diretas incluem aumento da mortalidade, estadias prolongadas em hospitais, perda de proteção a pacientes submetidos a cirurgias, aumento dos custos em tratamentos de saúde.

A RAM afeta todas as áreas da saúde, impactando todos os setores da sociedade. A Organização mundial de saúde cita ainda as doenças comunitárias associadas a RAM, como exemplo infecções no trato urinário e pneumonia em todas as regiões da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2015), ainda focos de RAM para as doenças malária e HIV.

O uso descontrolado, sem receituário médico e veterinário coloca em risco a “saúde única”, que visa ações para atender a saúde humana e animal com a finalidade de reduzir impactos ambientais unindo as várias áreas de saúde enfatiza a Organização Mundial da Saúde (BRASIL, 2018).

Instituições e profissionais somam esforços para construção, implantação, execução e ação global do plano sobre resistência a antimicrobianos (WHO, 2015), com objetivo de fortalecer o conhecimento, reduzindo a incidência de infecções pela prevenção. Ainda priorizam ações de saneamento com a finalidade de diminuir o uso de antibióticos na saúde preventiva, oportunizando o uso destes aos humanos e animais (BRASIL, 2018, WHO, 2015), visto que microrganismos adquirem mecanismos de resistência pela exposição medicamentosa (WERTH, 2020). Muitas práticas estão sendo adotadas em muitos países para diminuir e, possivelmente banir o uso de antibióticos, incrementando na dieta animal, alternativas como, probióticos, ácido orgânico, enzimas

e óleos essenciais (SÃO PAULO, 2019), essa é uma demanda crescente e necessária, pois, muitos países restringem importações relativas ao uso de antibióticos na alimentação animal.

A grande preocupação com um dos maiores problemas de saúde, uma das causas da resistência é a indevida liberação de medicamentos e substâncias químicas na natureza, pesquisas revelam que ao serem consumidos, até 80% dos antibióticos são excretados, junto com microrganismos resistentes, sem serem metabolizados (ONU BR, 2018), (ALAALI & BIN THANI, 2020).

O Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) promove ações na semana nacional de conscientização e alerta que a resistência aos antimicrobianos, agravada pelo uso incorreto e indiscriminado desses produtos, poderá causar 10 milhões de mortes até 2050 com gastos na ordem de 100 trilhões de dólares (MAPA, 2018), uma ação do Ministério para execução do plano nacional de ação e controle da resistência a antimicrobianos é salientar a obrigação dos produtores em manter a saúde animal pela higiene e prevenção de infecções com medidas sanitárias eficazes, a fim de evitar medicação preventiva e corretiva é uma das ações do órgão.

4.2 Antibiótico/ antimicrobiano

Desde a descoberta da penicilina os antimicrobianos contribuíram para a cura e combate de doenças que até então levavam milhares de pessoas a morte ou deixavam graves sequelas.

Os antimicrobianos são utilizados nos estabelecimentos de saúde, ambientes domésticos e uso agropecuário, no entanto são os fármacos que afetam não somente quem os utiliza, mas todo o ambiente por interferir de forma significativa em alterar a ecologia microbiana (ANVISA, 2001), (ANVISA, 2007).

Os antimicrobianos ou antibióticos são uma classe de medicamentos, substâncias capazes de destruir, inibir o crescimento de microrganismos ou suprimir a sua multiplicação. Podem ser produzidos por bactérias, fungos, podem ser total ou parcialmente sintéticos, o principal objetivo do uso de um antimicrobiano é prevenir ou tratar uma infecção, diminuindo ou eliminando os organismos patogênicos e, se possível, preservando os microrganismos da microbiota normal (MELO et. al., 2012).

Alexander Fleming após voltar da 1ª guerra mundial dedicou-se a estudar a bactéria *Staphiloccocus aureus*, responsável por abscessos em ferimentos abertos por projéteis, após cultivar a bactéria percebeu que onde crescia um mofo não havia crescimento da bactéria. No ano de 1928, a descoberta deu início a uma grande indústria que passou a se dedicar a produção do fármaco que teve o teste no primeiro paciente apenas em 1940. Após a introdução da penicilina e outros fármacos antibióticos a humanidade teve a possibilidade de vida com qualidade para aos pacientes que sofriam de tuberculose, pneumonia, meningite, sífilis, entre outras infecções (SCIELO, 2009), iniciando a era pós antibiótica conhecida como a “bala certa” no combate aos microrganismos patogênicos, abrindo as portas para a medicina moderna com respostas concretas a infecções de origem até então desconhecidas.

Os principais grupos de antibióticos, mais utilizados, são os Beta Lactâmicos, os bacteriostáticos e os aminoglicosídeos, pela grande cobertura de ação, facilidade de acesso, vias de administração e baixo custo (ANVISA, 2019), o que os torna também sensíveis a resistência microbiológica exemplificando nesses grupos a penicilina, tetraciclina e estreptomicina respectivamente.

4.2.1 Penicilina - β -lactâmicos

A grande maioria das penicilinas é derivada do ácido 6-aminopenicilânico, são classificados como β -lactâmicos que confere atividade bactericida. Sua descoberta foi atribuída ao médico Alexander Fleming no ano de 1928, e permanecem uma excelente classe de antimicrobianos divididas em 4 categorias que são: penicilinas naturais ou benzilpenicilinas, aminopenicilinas, penicilinas resistentes às penicilinasases, e penicilinas de amplo espectro que foram desenvolvidas com objetivo de evitar a aquisição de resistência as bactérias (ANVISA, 2019).

Segundo a Anvisa (2019) as penicilinas apresentam baixa toxicidade, hipersensibilidade com frequência em 8% dos pacientes, sensibilidade que pode variar de uma simples urticaria a um choque anafilático. São uma classe de medicamento largamente utilizada na medicina humana, veterinária e também como promotoras de crescimento aos animais a mais de 50 anos (TORRES, et. al., 2015).

4.2.2 Tetraciclina - bacteriostáticos

São antimicrobianos do grupo bacteriostáticos na concentração terapêutica, apresentam ampla ação antimicrobiana que incluem bactérias gram-positivas, gram-negativas, aeróbias e anaeróbias, espiroquetas, requétsias, clamídias, micoplasmas e alguns protozoários. Seu mecanismo de ação é bloqueando a ligação do RNA transportador, entrando na célula por difusão, impedindo a síntese proteica. Esses fármacos ainda atravessam a barreira transplacentária e são excretados no leite materno, seus mecanismos de resistência são pela diminuição de acumulação de resíduos da droga na célula (ANVISA, 2019).

Medicamentos muito utilizados na medicina veterinária e humana, têm amplo espectro de ação, baixa toxicidade, baixo custo, e podem ser, na maioria dos casos, administradas por via oral, também utilizadas como promotoras de crescimento animal (MAIA, et.al., 2010).

4.2.3 Estreptomicina - Aminoglicosídeos:

Pertencente ao grupo dos aminoglicosídeos (gentamicina, tobramicina, amicacina, netilmicina, paramomicina e espectinomicina), estreptomicina é o primeiro e o principal aminoglicosídeo utilizado na clínica humana. Foi obtido a partir da bactéria *Streptomyces griseus* em 1944, são antibacterianos destinados no tratamento de doenças como tuberculose e brucelose (FURP-STREPTOMICINA, 2015), os autores ainda afirmam que os aminoglicosídeos são amplamente utilizados para o combate de septicemias, infecções do trato urinário, respiratório, intra-abdominais, oculares, de articulações, endocardites, meningites em recém-nascidos e osteomielites.

Os aminoglicosídeos ainda têm grande atividade contra bacilos e cocos gram-negativos aeróbios como: *Klebsiella spp.*, *Serratia spp.*, *Citrobacter spp.*, *Haemophilus spp.*, *Acinetobacter spp.* e cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, ainda apresentam atividade contra bactérias gram-positivas, entre elas: *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis* e *Nocardia asteroides*, ativas contra micobactérias.

A estreptomicina é amplamente utilizada no tratamento parental e quando há resistência a outras drogas (ANVISA, 2019). Suas moléculas agem inibindo a síntese

proteica ou produzindo proteínas defeituosas na célula. Esse antibiótico é muito eficiente no combate ao *Mycobacterium tuberculosis* e *M. bovis*, exerce uma ação potente contra organismos Gram-negativos que não são influenciados pela penicilina.

4.3 Causas da resistência

As causas da resistência são muitas, os microrganismos estão por todos os lugares, variedades de alimentos e fontes ambientais estão repletas de microrganismos resistentes de uma ou mais drogas (RASHEED et. al., 2014). O ser humano com suas necessidades contribui para aumentar o número de microrganismos em determinados lugares, de acordo com as ações antrópicas provocadas haverá maior ou menor proliferação de microrganismos, que de acordo com as condições e exposição submetida, exercerá ou não resistência a antimicrobianos (ALAALI e BIN TAHNER, 2020).

Como principais causas temos o uso de antimicrobianos na prevenção de doenças em animais saudáveis, uso de medicamentos sem exames clínicos para verificar o fármaco mais eficaz, utilização inadequada de antimicrobianos, falta ou precariedade de tratamento de rejeitos de animais, exposição direta e indireta de seres humanos aos microrganismos resistentes (WHO, 2018). Muitos estudos são feitos, e muito precisa ser confirmado, sobre a resistência antimicrobiana. O fato é que os animais são veículos e pontos de disseminação de resistência, pela complexidade alimentar a que expõe os humanos (THANNER et. al., 2016).

Essa resistência ocorre quando os microrganismos mudam a resposta aos antibióticos, os agentes resistentes tem maior poder de infecção, tornando mais difícil o tratamento comparado as mesmas infecções por microrganismos não resistentes (WHO, 2018), (AIRES e ASENSI, 2017). A organização Mundial da Saúde enfatiza ainda que a resistência tem várias origens, que novos mecanismos de resistência surgem e espalham-se rapidamente ameaçando a capacidade da medicina em tratar doenças. A comunidade científica entre esses médicos veterinários de bovinos e suínos concordam que a alimentação animal com promotores de crescimento e de forma preventiva é uma das causas da resistência a antibióticos (POZZA et. al., 2020).

4.3.1 Microbiologia do solo e águas residuais – A disseminação de RAM

A microbiota de um solo são importantes degradadores de moléculas químicas e orgânicas, onde os microrganismos proliferam-se de acordo com as condições do ambiente. Locais com deposição de dejetos de animais tendem a concentrar, dentre outras substâncias, grande volume de nitrogênio, elemento altamente nutritivo, junto com outros nutrientes contidos nos dejetos, que serve de substrato para proliferação de microrganismos (VIEIRA, 2017). Estes microrganismos também fazem parte da microbiota do trato digestivo dos animais como as aves, suínos e bovinos que os eliminam naturalmente com os dejetos produzidos diariamente, (MACEDO, et. al., 2020), (NETO et. al., 2007).

Cada indivíduo apresenta uma microbiota “normal” única que devido à interação de fatores genéticos, contato com o ambiente, genótipo, dieta e doença, se desenvolvem o tempo todo. Esses seres microscópicos podem causar muitas doenças em determinadas circunstâncias. A patogenicidade dos microrganismos é definida pelas limitações do meio, em condições alteradas. Estes podem se tornar patogênicos devido as circunstâncias do ambiente e níveis populacionais, (PANIZZON et al., 2015), (WERTH, 2021). Os autores salientam que a liberação de quantidades crescentes de antibióticos nas águas e solos cria uma ameaça potencial a todos os organismos nesses ambientes. A RAM pode se espalhar rapidamente através de bactérias ambientais para bactérias patogênicas pela transferência genética horizontal (MUKHERJEE, et al., 2020), (MORAIS, et. al., 2016).

Cycon, et. al, (2019) relatam sobre a degradação comparada ao tempo de exposição e ao tipo de solo. Se maior a exposição e maior a concentração de animais em um determinado local, unindo ao consumo de medicamentos, maior serão os resíduos para os microrganismos, enfatizando a importância do tratamento adequado dos rejeitos para inativar os microrganismos antes de sua liberação ao ambiente natural.

A contaminação das águas pelo lançamento de efluentes diminuiu nos últimos anos, porém rios e lagos encontram-se poluídos e em processo de poluição por dejetos industriais, domésticos e agropecuários, essas águas estão sendo usadas na irrigação de culturas vegetais sem critério técnico ou tratamento prévio, em consequência são dispersos células, ovos e cistos de microrganismos patogênicos (protozoários), que podem ser consumidos com as frutas e hortaliças *in natura* durante as várias etapas de manipulação, desde a obtenção ao consumo desses alimentos, (EMBRAPA, 2014),

(CORZO-ARIYAMA, et. al., 2018). Os pesquisadores salientam os três fatores de risco à transmissão de doenças pela irrigação de produtos agrícolas que são: Precariedade do saneamento básico, falta de esclarecimento aos agricultores e falta de informação às donas de casa, sobre os processos de sanitização e desinfecção das frutas e hortaliças. (CHECCUCCI et. al., 2020) salientam sobre o uso de esterco de animais na produção vegetal, onde consideram ser essa a principal fonte de disseminação de genes de resistência a antibióticos, contaminantes de solo e água.

Dentre as doenças veiculadas pela água de irrigação contaminada estão cólera, esquistossomose, ancilostomíase, ascaridíase, amebíase, febre tifóide, gastroenterite, giardíase, hepatite infecciosa A, poliomielite, Shigelose, Rotavirose , teníase. Essas são todas doenças preveníveis com higiene ambiental, onde ocorre a destinação correta do lixo, tratamento do esgoto e da água servida (EMBRAPA, 2014). A intimidade água e solo assim como a deposição de rejeitos que modifiquem essa estrutura natural alertam as autoridades de saúde, pois colocam em advertência a eficácia dos antimicrobianos. Os stafilococos coagulase negativa (SNC) são ainda mais perigosos, pois podem abrigar enterotoxinas múltiplas e genes de resistência ameaçando a segurança alimentar de forma emergente em várias regiões da Etiópia, conforme estudo realizado por (GIZAW, et. al., 2020). Estudo recente ainda revela a prevalência de *E. coli* em alimentos preparados com maior predominância em vegetais crus seguidos e cozidos (LIMA et. al., 2017).

4.3.2 A Produção animal e o uso de medicamentos

A produção animal é uma das atividades mais expressivas do agronegócio. Para assegurar a produtividade e a competitividade do setor são utilizados muitos medicamentos antibióticos como profilaxia, finalidade terapêutica e promoção de crescimento. Por esse motivo estudos e análises do comportamento microbiológico nos animais, no ambiente e no ser humano são motivo de preocupação, são muitos microrganismos com RAM (Resistência a Antimicrobianos), (REGITANO & LEAL, 2010), (EMBRAPA, 2017).

Os antimicrobianos são utilizados a muitos anos na criação animal para melhoria do desempenho zootécnico e como profilaxia (NOSCHAG, et. al., 2017). Estudo realizado no estado do Paraná demonstrou o uso das tetraciclinas e olaquinox como promotores de crescimento e, as tetraciclinas como terapêuticas, penicilinas e sulfonamidas

proibidas pelo Ministério da Agricultura na produção de frango de corte (SAÚDE PR., 2005), o relatório cita ainda que esses antibióticos estimulam a conversão alimentar e o ganho de peso animal.

As suspeitas e estudos evidenciam que resíduos em carcaça de animais e nos rejeitos disseminam os RAM aos seres humanos ameaçando o tratamento eficiente com uso de antibióticos mais acessíveis a população em geral (CYCON, et. al., 2019).

4.3.3 A avicultura, bovinocultura e suinocultura – o segredo do Sucesso.

A atividade agropecuária é altamente significativa para a alimentação humana e para a economia do país, a avicultura é uma atividade globalizada no Brasil sendo 30% da produtividade exportada e 70% de seus produtos para o consumo interno (EMBRAPA, 2018), representa alta concentração de animais em pequenos espaços, e alta deposição de dejetos em pequenas áreas.

São mais de 13 milhões de toneladas de carne de frango produzidas, atingindo o consumo médio per capita de 42 kg em 2017. O Paraná foi o estado que mais abateu aves seguido por Santa Catarina e Rio Grande do Sul, sendo o Brasil o segundo maior produtor mundial de proteína de frango e o maior exportador desse produto (ABPA, 2018).

A produção de aves no Brasil representa mais de 15% da produção mundial, enquanto produção total de carne representa mais de 48% da produção no mundo ressalta a revista (AVINEWS, 2020).

Ser um país líder na produção de carne a nível mundial traz muitas preocupações, como poucos dados de vigilância epidemiológica disponíveis sobre a resistência a antibióticos, em especial o Sul do país, por concentrar grande volume de produção de carne, ovos (aves e suínos confinados) (ALVIM, 2019) e leite.

A produção de aves e suínos confinados envolve uma receita de tratamentos aos animais para que estes tenham a máxima conversão alimentar em períodos de tempo determinados, para atender a demanda de consumo; sanidade animal a fim de evitar mortalidade e disseminação de doenças que venham a prejudicar o desenvolvimento do lote.

Em meados da década de 1950 teve início a utilização de antimicrobianos como aditivo alimentar incrementando na dieta de animais com objetivo da melhoria do desempenho zootécnico que ocorre pela ação desses antibióticos sobre a microbiota do

trato digestório, que diminui a competição por nutrientes e reduz a produção de metabólitos que deprimem o crescimento do animal. Nos monogástricos (suínos e aves) mantém o número de bactérias benéficas adequadas ao melhor desempenho na produção de carne (GONZALES et. al., 2012), (SANTOS et. al., 2019).

A atividade avícola na produção de carne de corte requer uma produtividade média de 45 dias para a recria dos pintainhos no sistema de integração, onde os produtores recebem as aves, o alimento e todo o tratamento intermediado pela indústria que terceiriza o cuidado e paga por ele. No alimento, além de energia, proteína e fibra vegetal, são incluídos ingredientes como: antioxidantes, aromatizantes, anticoccidianos, emulsificadores, corantes, conservantes, vitaminas, nucleotídeos, minerais e promotores de crescimento (antimicrobianos). Esses promotores de crescimento provocam o efeito metabólico direto no metabolismo do animal melhorando o desempenho de produção de carne. Esses constituintes da alimentação avícola são estendidos a alimentação suínica com balanceamento adequado ao porte do animal e tempo de crescimento (EMBRAPA, 2019), (GONZALES et. al, 2012).

Na bovinocultura de corte foi desenvolvido em 2005 o programa de boas práticas agropecuárias em bovino de corte. Várias práticas de manejo, gestão e promoção da qualidade geral da propriedade produtora, define e proíbe o uso de hormônios e promotores de crescimento de efeito anabólico, ou que não sejam regulamentados pelo órgão competente, salientando que alguns países importadores não aceitam carne com uso de promotores de crescimento (EMBRAPA, 2007).

No primeiro trimestre de 2018 o Brasil passou a ocupar o primeiro lugar em exportação seguido da Índia e Austrália, sendo responsável por 19,9% das exportações mundiais, sendo Hong Kong o maior importador da carne bovina *in natura* brasileira em 2018 (DEPEC-BRADESCO, 2019) (IBGE, 2018). A maioria da produção de carne e leite bovina acontece em regime semi confinado, ou seja, parte do tempo o gado se alimenta de pastagens tendo suplementação alimentar diária com ração concentrada para melhoria da conversão alimentar em carne e leite (COSTA et. al., 2013). A produção leiteira ultrapassou os 35,1 bilhões de litros em 2017 (EMBRAPA, 2019).

Mas o controle da sanidade animal dos rebanhos leiteiros requer muitos cuidados e práticas constantes de higiene e uso de medicamentos; em estudo realizado em rebanho de 34.000 animais de 306 fazendas em uma área de 12.000 km² (MESQUITA et. al., 2019), detectaram resistência a antimicrobianos em *S. aureus* e *S. agalactiae* aos

medicamentos mais utilizados ao tratamento de mastites com alta prevalência em mais de 47% dos animais testados.

Criadores de gado para abate usam antibióticos na alimentação, muitos sem conhecimento sobre a real ameaça que é a resistência microbiológica. Estudo feito em comunidade africana, na África do Sul, investigou o conhecimento de 70 produtores rurais referente ao uso e implicações do uso de antibióticos, onde foram feitos testes de sensibilidade a antimicrobianos retirando amostras de animais aparentemente saudáveis com swabs retais. Os produtores confessaram ouvir falar sobre resistência microbiológica, mas não entendiam do que se tratava exatamente, os pesquisadores (MUPFUNYA et. al. 2020) obtiveram isolados de *E. coli*, *E. faecium* resistentes a colistina, clortetraciclina, amoxicilina e enrofloxacina. Essa pesquisa é uma amostra da realidade mundial, muitos fármacos com RAM e muitos produtores rurais com pouco conhecimento sobre o assunto.

4.3.4 Substratos, fármacos e patógenos da produção animal com ação na produtividade vegetal.

A prática de uso de fertilizantes orgânicos de origem animal tem sido cada vez maior isso devido a crescentes instalações de unidades produtoras de animais confinados no país, como os bovinos, suínos e aves (EMBRAPA, 2011). A empresa brasileira discorre ainda sobre a diversidade de microrganismos patogênicos contidos nos rejeitos dos suínos e sobre a importância do tratamento para a eliminação ou inativação desses seres microscópicos patogênicos, com a vantagem de entregar ao ambiente um rejeito com controle sanitário que não ofereça riscos a saúde humana e ambiental. Os dejetos animais oriundos de bovinos e aves geralmente passam pelo processo de compostagem e depois são distribuídos ao solo de acordo com a necessidade de adubação requerida. A foto 01 evidenciando despejo eventual de resíduos da lagoa de rejeitos suinícolas.

As concentrações dos resíduos de antibióticos nos dejetos apresentam variações decorrentes do tipo de antibiótico, da duração do tratamento, do metabolismo do fármaco nos animais e tempo da amostragem do resíduo (CYCON et. al., 2019). Na foto 02 duas lagoas de fermentação de rejeitos de suínos. O fato é que o material fecal oriundo de animais e humanos conterão microrganismos em abundância, e entre estes haverá muitos resistentes. Isso devido a fatores variados como a exposição entérica e a

antibióticos usados na medicina humana e em animais (ROMAIN et. al., 2013). Os autores salientam ainda que as concentrações microbiológicas com genes de resistência a antibióticos nos resíduos de dejetos podem ter uma grande mobilidade ao solo com transferência de patógenos aos vegetais, reincidindo o contágio pela ingestão de hortifrutigranjeiros fertilizados com adubação oriunda de dejetos não tratados, potencializando a disseminação de microrganismos indesejáveis pelo consumo desses vegetais *in natura*. Essa situação é real e preocupante, que requer um tratamento diferenciado aos produtos de consumo *in natura* visto que o consumo desses alimentos podem ser uma rota de exposição direta aos microrganismos presentes no solo de cultivo.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Obtenção das amostras

5.1.1 – Amostras de solo

Para coleta das amostras de solo foi utilizado amostrador tipo sonda (foto 03) para amostragem de 1-40 cm, sendo realizadas coletas de 0-20 cm de profundidade. As subamostras de cada tratamento foram homogeneizadas visando a representatividade amostral do local de coleta seguindo orientações constantes no manual para coleta de amostras de solo (EMBRAPA, 2019).

Foto 01 – Área de despejo de dejetos suínos.



Fonte: a autora (2019).

Foto 02 - Resíduos de suínos esterqueira



Fonte: a autora (2019).

Foto 03 – Amostrador tipo sonda, usado para coleta das amostras de solo 1



Fonte: a autora, (2019).

Para compor cada amostra de solo foram coletadas 10 amostras por tratamento. Estas subamostras foram misturadas e representam um tratamento (Foto 05). Os tratamentos são descritos na tabela 01. Sendo que T1 o tratamento controle composto por solo livre de trânsito de animais a mais de 10 anos, onde há plantação de eucalipto e árvores espontâneas que formaram o bosque. T2 solo composto de pastagens perenes fertilizado com dejetos de suínos. T3 dejetos de bovinos em decomposição imediatamente ao lado do galpão de confinamento. T4 solo imediatamente após despejo eventual da esterqueira com cultivo de capineira perene. T5 Solo da horta doméstica adubada com rejeitos fermentados de bovinos (local de cultivo das hortaliças analisadas). T6 dejetos de bovino decomposto pronto para uso na agricultura ao lado do galpão de ordenha. O lodo da esterqueira, T7 (solo 7) foi coletado das duas lagoas e homogeneizados. As amostras de dejetos de aves foram cedidas por outra propriedade rural em regime de integração de aves de corte, sendo amostra solo 8 (T8) coletada da superfície da cama de aves, solo 09 (T9) fundo da cama do aviário e solo 10 (T10) cama de aviário exposta ao solo (foto 04).

Tabela 01- descrição dos tratamentos.

Tratamento	Localização/ descrição da amostra
T1	Controle, solo livre do trânsito de animais a mais de 10 anos.
T2	Solo com pastagens perenes adubadas com dejetos de suínos.
T3	Dejetos de bovinos em decomposição.
T4	Solo que recebe despejo de dejetos suínos da esterqueira
T5	Horta doméstica adubada com dejetos de bovinos decomposto.
T6	Dejetos de bovinos decomposto pronto para uso.
T7	Lodo das lagoas de fermentação de dejetos suínos.
T8	Amostra da superfície da cama de aviário.
T9	Amostra do fundo da cama de aves e solo.
T10	Amostra de cama de aves exposta ao solo.

Fonte: A autora (2021).

Foto 04 - Local de coleta solos 08, 09, 10



Fonte: Vinicius Raffler.(2019).

5.1.2 Amostras de água

As amostras de água foram coletadas obedecendo regras e orientações proposto no manual de orientações para coleta de amostras de água (SUS-LACEN, 2019) em três pontos de coleta para as amostras de água do açude e água do córrego. Para a água da fonte foi feita a coleta em um ponto (na fonte de água). Amostra 01 (A01) água da fonte diretamente na fonte (uma coleta em na saída da fonte protegida), Amostra 02 (A02) água do açude em três pontos (lugares diferentes) no açude e, Amostra 03 (A03)

água do córrego (em três pontos diferentes) no pequeno córrego que nasce na propriedade, identificado na foto 05).

Tabela 02- Descrição das amostras de água.

Tratamento	Localização/ descrição da amostra de água
A01	Água diretamente da fonte.
A02	Água do açude.
A03	Água do córrego.

Fonte: A autora (2021).

5.1.3 Amostras de vegetais

Para compor as amostras de vegetais foram colhidos 5 unidades de cada variedade (alface, beterraba e almeirão) no ponto de consumo cultivadas na horta adubada com dejetos de bovinos.

Após a coleta, cada amostra foi devidamente identificada, acondicionada em caixa térmica contendo gelo artificial, transportadas até o laboratório da UTFPR.

Foto 05 - Foto aérea do local de coleta das amostras - Propriedade rural de Guarujá do Sul, Extremo Oeste de SC.



Fonte: Google Earth (2020).

5.2 Cultivo microbiológico

5.2.1 Preparo do material a ser utilizado em bancada

Foram separados tubos de ensaio, tampas (tubos de ensaio), placas de Petri, alças de drigalski, alças de agulha, pipetas de 1000µl e 20µl.

5.2.2 Preparo dos meios de cultura

Para diluição de todas as amostras foi preparado o meio caldo nutriente com 8 gramas de meio nutritivo para 1000 ml de água destilada, o pH foi ajustado para 6,8. Após esterilização o caldo nutriente foi acondicionado em tubos de ensaio, sendo 9 ml de meio para cada tubo.

Para semeadura em placas foi preparado meio de cultivo caldo nutriente com 8 gramas de meio nutritivo, 12 gramas de ágar puro para cada 1000 ml de água destilada, ajustado o pH para 6,8. O meio preparado foi acondicionado em autoclave para esterilização a 121°C durante 20 minutos. Em seguida o meio de cultura com ágar foi vertido em porções de 20 ml por placas de Petri. Todos os materiais utilizados foram esterilizados em autoclave em temperatura de 121 °C durante 30 minutos.

5.2.3 Inoculação das amostras de solo/lodo

Cada amostra foi devidamente mensurada, onde 1g da amostra foi diluída em 9 ml de solução de meio nutritivo, em tubo de ensaio esterilizado e sem ágar. Essa solução foi agitada durante 1 min. sendo essa amostra a primeira diluição. Em seguida foi retirado dessa diluição 1 ml, esse foi acondicionado ao segundo tubo de cultivo, essa amostra compõe a segunda diluição, foi agitada durante 1 min. Cada procedimento teve três repetições totalizando 6 amostras de cada tratamento para cultura em tubos múltiplos, sendo que foram feitas 2 concentrações 10^{-1} , 10^{-2} , resultando 60 amostras em 3x2 (6 amostras em 2 concentrações em 10 tratamentos de solo).

5.2.4 Inoculação das amostras de água

De cada amostra de água foi inoculado 1 ml, esse foi acondicionado em um tubo de ensaio compondo a amostra na concentração 10^{-1} , e após homogeneização foi retirado 1 ml dessa amostra, acondicionado em outro tubo de ensaio com caldo nutriente compondo a concentração 10^{-2} , em triplicata para todas as amostras de água resultando em 18 amostras de água.

5.2.5 Preparo e inoculação das amostras de vegetais

As amostras de vegetais foram lavadas em água corrente, em seguida foram mergulhadas em solução contendo hipoclorito de sódio a 0,5% durante 5 minutos (foto 06). Após a limpeza e a sanitização foram coletadas partes de cada planta para compor 1g de amostra, nessa foi feita pré-assepsia: mergulhada em solução contendo hipoclorito a 2% durante 1 min. Após foram realizadas três lavagens com água destilada, em seguida as amostras foram mergulhadas em álcool a 70% durante 30 segundos. Após essa pré-assepsia as amostras foram inoculadas em tubo de ensaio na proporção de 1 g para 9 ml de solução compondo a amostra na concentração 10^{-1} , agitadas para homogeneização durante 1 minuto, em seguida foi retirado 1 ml dessa amostra e inoculado outro tubo de ensaio com caldo nutritivo, compondo a amostra com a concentração 10^{-2} em três repetições.

Foto 06 – Amostras de vegetais em limpeza.



Fonte: a autora, (2019).

5.3 Incubação das amostras

Após identificação e armazenagem em prateleiras para tubos, as amostras foram incubadas em estufa controlada durante 23 horas a temperatura de 32°C, após esse procedimento, de todas as 18 amostras de vegetais foram retiradas com micropipeta uma amostra de 100 microlitros que foram acondicionados em placas de Petry com auxílio de alça de drigalski. As amostras foram devidamente fechadas com papel filme, identificadas e incubadas em estufa com temperatura controlada a 33°C durante 23 horas.

5.3.1 Seleção dos microrganismos

Foi feita a seleção dos microrganismos pelo teste de sensibilidade (pela resistência aos antibióticos testados) pelo método padronizado proposto e revisado do NCCLS, método de disco difusão com padrões de interpretação (NCCLS, 2003), onde foram selecionados os microrganismos resistentes aos antibióticos testados, após a seleção os microrganismos serão identificados pela coloração Gram como negativos e positivos, em seguida será feita a extração de DNA para identificação dos microrganismos resistentes aos antibióticos testados.

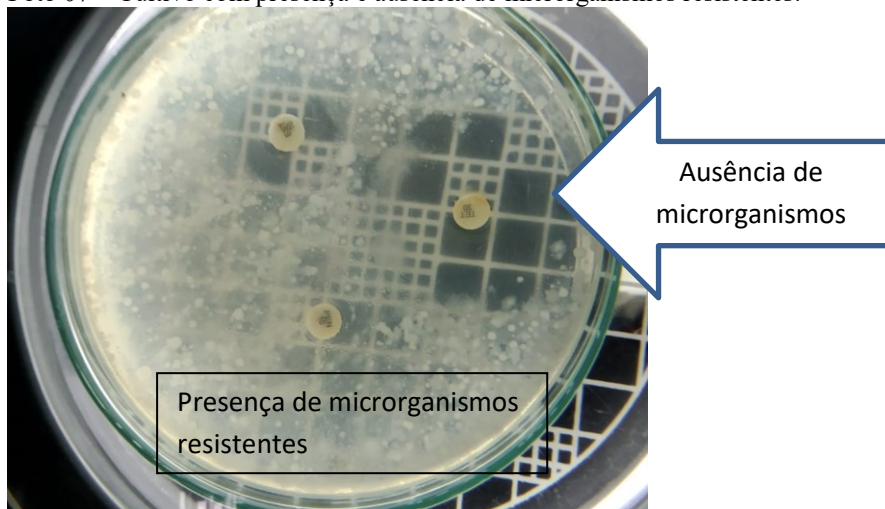
Após diluição das amostras foi feita a inoculação em placas de Petri sendo semeada 1ml de cada amostra por placa, com auxílio da alça de drigalski foi feita a semeadura de cada amostra onde foram acomodados os três discos de difusão por placa contendo os antibióticos penicilina 10 μ g , tetraciclina 30 μ g, estreptomicina 10 μ g, para a seleção dos microrganismos. Todas as placas foram acondicionadas em estufa com temperatura constante a 33°C durante 20 horas (ACUMÉDIA, 2010).

Os microrganismos foram selecionados após crescimento microbiológico nas placas de Petri, onde por observação verificou-se a ausência e presença de microrganismos resistentes em área adjacente ao disco de difusão com antibiótico (Foto 07).

Destas placas devidamente identificadas foram selecionadas amostragens com aspectos diferenciados de cada tratamento (das placas com aspectos “parecidos” foi selecionada apenas uma) para fazer a coloração de Gram e extração de DNA.

Para extração de DNA primeiramente foram (agrupadas semelhanças dos cultivos e destes selecionada uma amostra) inoculadas amostras de cada tratamento com crescimento de microrganismos resistentes em 200 ml meio nutritivo estéril em erlenmeyer devidamente fechado, as amostras foram novamente incubadas em incubadora sob agitação constante durante 18 horas.

Foto 07 – Cultivo com presença e ausência de microrganismos resistentes.



Fonte: a autora, (2019).

5.4 Coloração de gram

A técnica de coloração de Gram desenvolvida em 1884 pelo dinamarquês Hans Christian Joachim Gram permite identificar pela coloração bactérias com diferentes estruturas em sua parede celular, pela coloração que estas adquirem após tratamento com agentes químicos específicos (FIOCRUZ, 2018). É o primeiro passo para caracterizar uma amostra microbiológica. As bactérias Gram positivas são capazes de reter o corante cristal violeta no citoplasma durante o tratamento com etanol-acetona, já os microrganismos gram-negativos não o fazem.

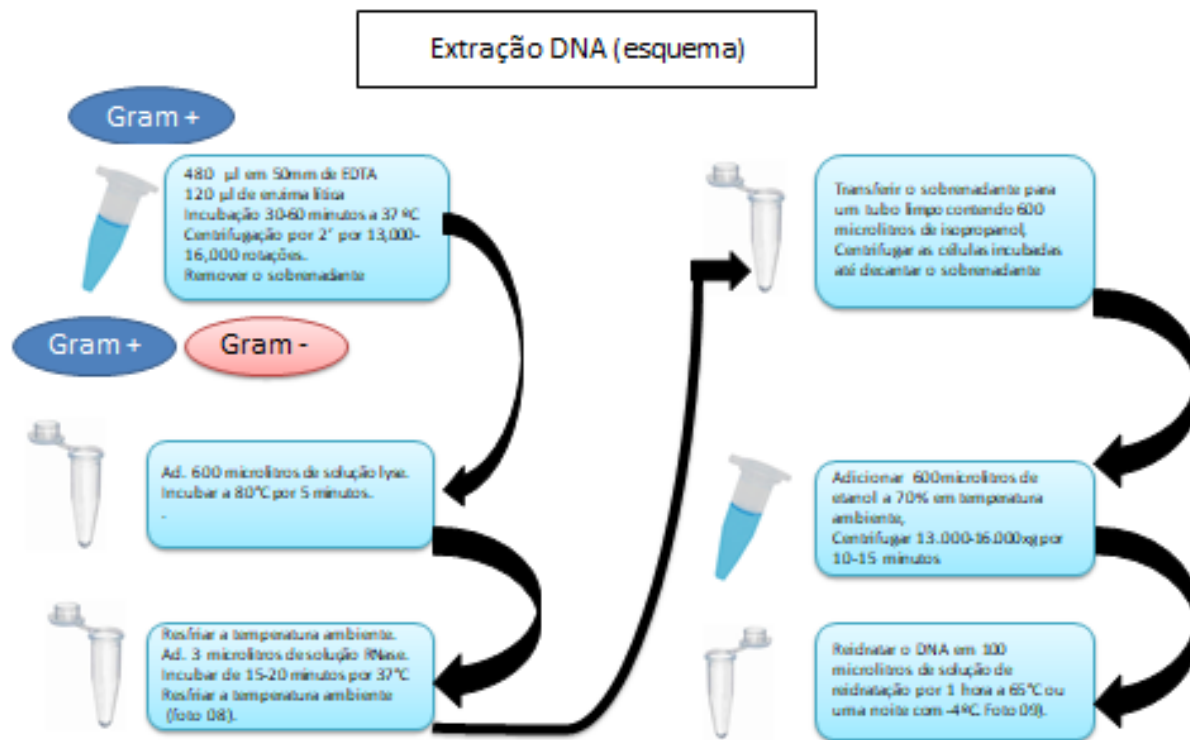
Esse processo permite separar as bactérias com paredes mais espessas ou menos espessas de peptídeoglicano. Em alguns casos somente a coloração de Gram direciona o clínico a proceder a interação medicamentosa como primeira alternativa ao tratamento para o controle microbiológico, pois trata-se de uma análise rápida, simples e econômica, (FIOCRUZ, 2018).

5.5 Extração do DNA

Para extração do DNA dos microrganismos foi coletado 100 ml de cada amostra selecionada para coloração de Gram e extração do DNA. Após obter os resultados da coloração de Gram foi feita a extração do DNA dos microrganismos. Para extração do DNA procedeu-se a metodologia proposta pelo protocolo Wizard Genomic DNA Purification Kit, (PROMEGA, 2020), onde são realizadas três etapas distintas (lise

celular, limpeza e precipitação) para Gram positivas e Gram negativas, as quais podem ser observadas de forma resumida na figura 01.

Figura 01 – Método Extração do DNA kit (PROMEGA, 2020).



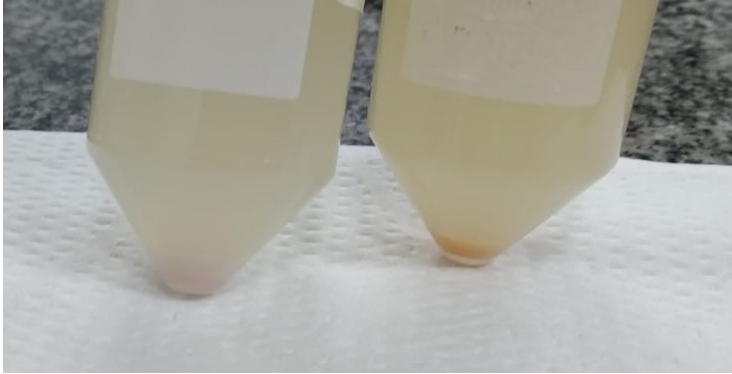
Fonte: A autora (2021).

Foto 08: Resfriamento das amostras a temperatura ambiente



Fonte: a autora, (2019).

Foto 09: DNA precipitado na base do tubo



Fonte: a autora, (2019).

A foto 10 mostra a reidratação do DNA.

Foto 10- Reidratação DNA



Fonte: a autora, (2019).

De todas as amostras selecionadas foram feitas a extração do DNA e armazenado para posterior verificação dos microrganismos presentes nas amostras analisadas.

6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

6.1 A análise

A análise baseou-se no manual antibiograma para determinação de sensibilidade ao antibiótico testado EUCAST (2019) como sensível (S), Sensível aumentando a exposição (I) e resistente (R). Onde o ponto de corte varia de acordo com o antibiótico testado; sendo indicado para a penicilina o ponto de corte em 14 mm, já para a Estreptomicina o ponto de corte fica para 18 mm e para tetraciclina é indicado o ponto de corte quando o diâmetro do halo atingir 18 mm de acordo com as orientações propostas no manual Eucast (EUCAST, 2019).

A definição S, R ou I foi interpretada de acordo com a dimensão do halo o qual tinha o ponto de corte de acordo com o antibiótico e dose testada onde, um microrganismo é considerado sensível (S) quando há chance de sucesso terapêutico com a dosagem padrão indicada e testada. O microrganismo considerado sensível aumentando a exposição ou intermediário (I) quando há chance de sucesso terapêutico com aumento da exposição e ajuste da dosagem e concentração no local da infecção. Considera-se agente resistente (R) quando há alta probabilidade de falha no tratamento mesmo com aumento da exposição. (EUCAST, 2019).

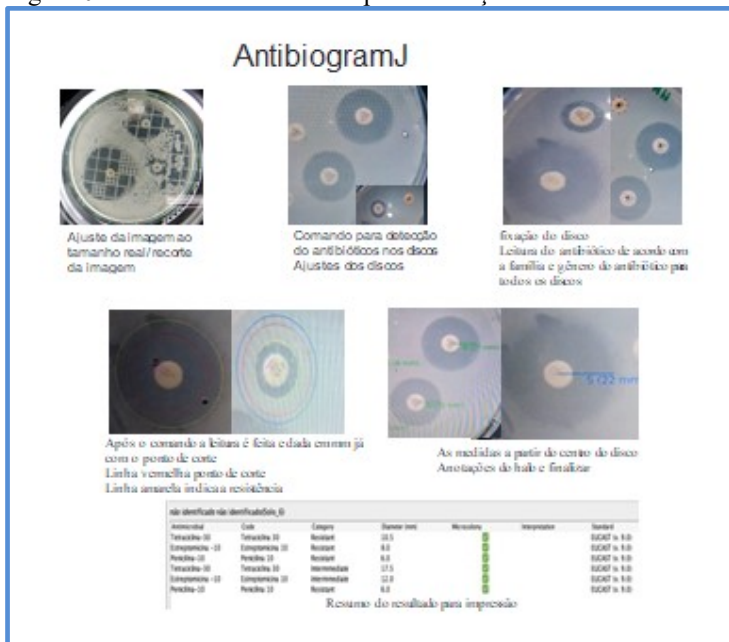
6.1.2 Análises dos solos e dejetos

Para a análise dos resultados encontrados utilizou-se a técnica de medição dos halos, sendo realizadas análises qualitativas dessas amostras.

Na medição dos halos utilizou-se da ferramenta AntibiogramJ, um software livre de código aberto e gratuito, usado para medir, determinar de forma semi automáticas as zonas de inibição de imagens dos discos de difusão em testes de sensibilidade aos antimicrobianos com esquema resumido de comandos demonstrados na figura 02. Dentre muitas facilidades como leituras de qualquer dispositivo fotográfico o software inclui ainda detecção de erros e recursos para corrigir manualmente as medidas inconsistentes detectadas. O AntibiogramJ é uma ferramenta de software completa para análise de antibiograma sem custo e necessidades de investimentos de aparelhagens em laboratório, (ALONSO, et. al., 2017), para categorizar se um microrganismo é resistente

(R), com chance de sucesso se aumentada a dose no local de exposição (I), e suscetível (S) ou seja com chance de êxito no tratamento para o organismo testado segundo padrões (EUCAST, 2019).

Figura 02: Resumo de comandos para execução do software.



Fonte: a autora (2021).

A análise estatística utilizou-se dos dados estatísticos pela posição, dispersão, simetria, cauda e outliers, valores adjacentes, (extremidades (bigodes)) demonstrados em boxplot. O boxplot de Tukey proposto em 1977 é uma ferramenta gráfica para visualizar a distribuição de um conjunto de dados e apontar possíveis outliers (WILCOX, 2017).

6.1.3 Água e hortaliças

Para as amostras de água e hortaliças foi feita apenas identificação visual, considerando ausência e presença de colônias de microrganismos nos halos de inibição dos antibióticos testados, sendo classificadas como sensíveis e resistentes aos antibióticos testados.

7 RESULTADOS E DISCUSSÕES

7.1 Amostras de solo

Serão apresentados gráficos de cada tratamento de solo, sendo que desses tratamentos foram selecionadas placas com aspectos parecidos dentre estas 20 placas com amostras de solos tiveram os halos mensurados pelo método EUCAST, onde os resultados são apresentados em gráficos boxplot. Sendo que:

Gráfico 01- T 1 – Solo sem trânsito de animais a dez anos.



Tabela 03- Resultados amostra solo 01 (T1).

Antimicrobial	Code	Category	Diameter (mm)	Microcolony	Interpretation	Standard
Tetraciclina-30	Tetraciclina 30	Resistant	13.0	✓		EUCAST (v. 9.0)
Estreptomicina -10	Estreptomicina 10	Resistant	9.5	✓		EUCAST (v. 9.0)
Penicilina-10	Penicilina 10	Resistant	8.5	✓		EUCAST (v. 9.0)
Tetraciclina-30	Tetraciclina 30	Susceptible	30.0	✓		EUCAST (v. 9.0)
Estreptomicina -10	Estreptomicina 10	IntermmEDIATE	12.5	✓		EUCAST (v. 9.0)
Penicilina-10	Penicilina 10	Resistant	9.0	✓		EUCAST (v. 9.0)

Medidas (mm) EUCAST, (2019).

O gráfico 01 e a tabela 03 mostram a mediana próxima de 13 mm, o menor valor em 8,5mm e o valor discrepante 30 mm, onde demonstrou todos os halos analisados dentre eles o disco do antibiótico tetraciclina 30 ug é considerado um antibiótico com chance de sucesso no controle ao microrganismo ((sensível) S)) presente no cultivo nesta dosagem onde o halo apresentou eficiência de 30mm (valor discrepante). Já o antibiótico penicilina 10 ug tem chance de sucesso se aumentada sua exposição e concentração no local da infecção (I), apresentando necessidade de aumento da dosagem em 12,5mm de halo. As demais amostras apresentaram resistência (R) aos fármacos nas doses apresentadas para esse microrganismo encontrado segundo as normas do manual (EUCAST, 2019), sendo motivo de escolha clínica para não usar esses medicamentos que oferecem resistência.

Gráfico 02 - T2 Solo adubado com dejetos suíno.

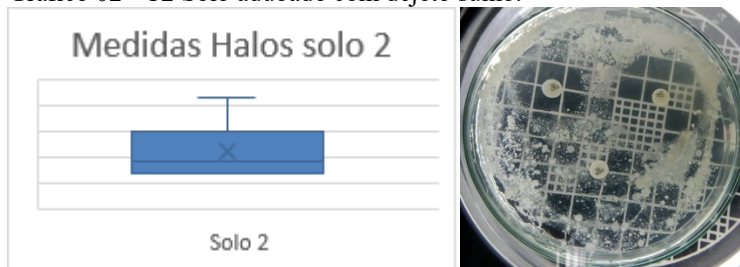


Tabela 04- Resultados amostra solo 02 (T2)

Antimicrobial	Code	Category	Diameter (mm)	Microcolony	Interpretation	Standard
Tetraciclina-30	Tetraciclina 30	Susceptible	21.5	✓		EUCAST (v. 9.0)
Estreptomicina -10	Estreptomicina 10	Intermediate	13.0	✓		EUCAST (v. 9.0)
Penicilina-10	Penicilina 10	Resistant	10.5	✓		EUCAST (v. 9.0)
Tetraciclina-30	Tetraciclina 30	Resistant	8.0	✓		EUCAST (v. 9.0)
Estreptomicina -10	Estreptomicina 10	Resistant	7.0	✓		EUCAST (v. 9.0)
Penicilina-10	Penicilina 10	Resistant	7.0	☐		EUCAST (v. 9.0)

Medidas (mm) EUCAST, (2019).

O gráfico 02 e a tabela 04 indicam que esse tratamento apresenta a mediana próxima a 13 mm, onde o microrganismo apresentou sensibilidade a tetraciclina com o halo no diâmetro de 21,5mm sendo considerado um antibiótico com chances de sucesso para esse microrganismo presente segundo o padrão de interpretação (EUCAST, 2019). Para a estreptomicina o halo apresenta 13mm, considerado com chance de sucesso se aumentar a sua exposição no local de infecção, essa amostra não obteve valor discrepante significativo. Mais de 80% das amostras estão no primeiro quartil, as quais são consideradas resistentes apresentando medidas de 7 a 10 mm de halo, os antibióticos com essas medidas de halos são considerados excluídos do tratamento clínico para essa amostra.

Gráfico 03- T3 Dejetos bovinos em decomposição

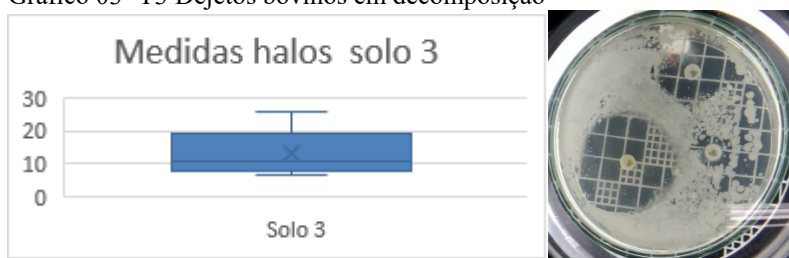


Tabela 05- Resultados amostra solo 03 (T3)

Antimicrobial	Code	Category	Diameter (mm)	Microcolony	Interpretation	Standard
Tetraciclina-30	Tetraciclina 30	Intermediate	17.0	✓		EUCAST (v. 9.0)
Estreptomicina -10	Estreptomicina 10	Resistant	9.0	✓		EUCAST (v. 9.0)
Penicilina-10	Penicilina 10	Resistant	8.1	✓		EUCAST (v. 9.0)
Tetraciclina-30	Tetraciclina 30	Susceptible	25.5	✓		EUCAST (v. 9.0)
Estreptomicina -10	Estreptomicina 10	Intermediate	12.5	✓		EUCAST (v. 9.0)
Penicilina-10	Penicilina 10	Resistant	6.5	✓		EUCAST (v. 9.0)

Medidas (mm) EUCAST, (2019).

Para esse tratamento a mediana está próxima a 13 mm, o valor discrepante desse tratamento ficou em 25,5 mm, o menor valor que apresenta a maior resistência ficou em 6,5 mm de halo de inibição, os resultados são apresentados na tabela 05 e no gráfico 03.

Onde a estreptomicina com sensibilidade (S) em halo de 12,5mm, a tetraciclina com halo de 25,5 mm, apresentam chance de sucesso para tratamento eficaz contra o microrganismo testado, já a tetraciclina na amostra mais concentrada 10^{-1} apresenta chance de sucesso no tratamento para esse microrganismo se aumentada a dose no local de exposição, onde apresentou sensibilidade no halo de 17mm, as demais amostras apresentaram resistência com halos de 6,5 a 12,5mm para os microrganismos presentes nesse cultivo, (EUCAST, 2019).

Gráfico 04 - T4 Solo adubado com dejetos suínos próximo a esterqueira.

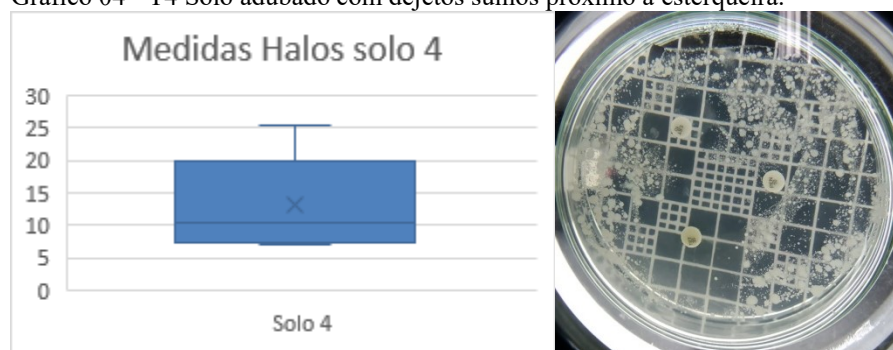


Tabela 06- Resultados amostra solo 04 (T4)

Antimicrobial	Code	Category	Diameter (mm)	Microcolony	Interpretation	Standard
Tetraciclina-30	Tetraciclina 30	Intermmmediate	18.0	✓		EUCAST (v. 9.0)
Estreptomicina -10	Estreptomicina 10	Intermmmediate	13.0	✓		EUCAST (v. 9.0)
Penicilina-10	Penicilina 10	Resistant	8.0	✓		EUCAST (v. 9.0)
Tetraciclina-30	Tetraciclina 30	Susceptible	25.5	✓		EUCAST (v. 9.0)
Estreptomicina -10	Estreptomicina 10	Resistant	7.5	✓		EUCAST (v. 9.0)
Penicilina-10	Penicilina 10	Resistant	7.0	✓		EUCAST (v. 9.0)

Medidas (mm) EUCAST, (2019).

Nos resultados demonstrados no gráfico 04 e tabela 06 para esse tratamento foi mensurado a sensibilidade (S) para tetraciclina que apresentou um halo de 25,5mm demonstrando que há chance de sucesso no tratamento com esse antibiótico para esse microrganismo presente. Já em outra concentração ao agente microbiológico a tetraciclina apresentou halo de 18mm e estreptomicina halo de 13mm, de acordo com o manual de antibiograma ambos apresentam chance de sucesso no tratamento para os microrganismos testados ao aumentar a exposição ao agente no local de infecção. As demais amostras apresentam resistência aos microrganismos testados e não devem ser indicados pela grande possibilidade de falha no tratamento terapêutico, (EUCAST, 2019).

Gráfico 05 - T5 Horta doméstica adubada com esterco bovino

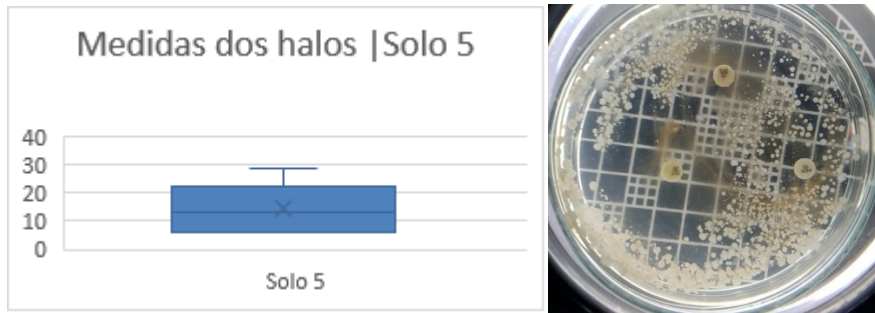


Tabela 07- Resultados amostra solo 05 (T5)

Antimicrobial	Code	Category	Diameter (mm)	Microcolony	Interpretation	Standard
Tetraciclina-30	Tetraciclina 30	Susceptible	29.0	✓		EUCAST (v. 9.0)
Estreptomicina -10	Estreptomicina 10	IntermmEDIATE	13.0	✓		EUCAST (v. 9.0)
Penicilina-10	Penicilina 10	Resistant	6.0	✓		EUCAST (v. 9.0)
Tetraciclina-30	Tetraciclina 30	Susceptible	20.5	✓		EUCAST (v. 9.0)
Estreptomicina -10	Estreptomicina 10	IntermmEDIATE	12.5	✓		EUCAST (v. 9.0)
Penicilina-10	Penicilina 10	Resistant	6.5	✓		EUCAST (v. 9.0)

Medidas (mm) EUCAST, (2019).

Os resultados apresentados no gráfico 05 e tabela 07 são para o T5 onde foi analisado o solo da horta doméstica adubada com dejetos decompostos de bovino a tetraciclina apresentou sensibilidade (S) nas duas concentrações 10^{-1} e 10^{-2} apresentando halos de 20,5 e 29 mm respectivamente, onde seguindo a orientação do manual de antibiograma há chance de sucesso no uso desse antibiótico para o microrganismo presente nesse tratamento. Já a estreptomicina nas duas concentrações apresenta (I) com chance de sucesso com aumento da exposição no local da infecção. A penicilina nas duas concentrações apresenta resistência ao microrganismo presente nesse tratamento com alta probabilidade de falha ao administrar esse antibiótico no controle do microrganismo testado.

Gráfico 06- T6 Dejeito de bovino decomposto

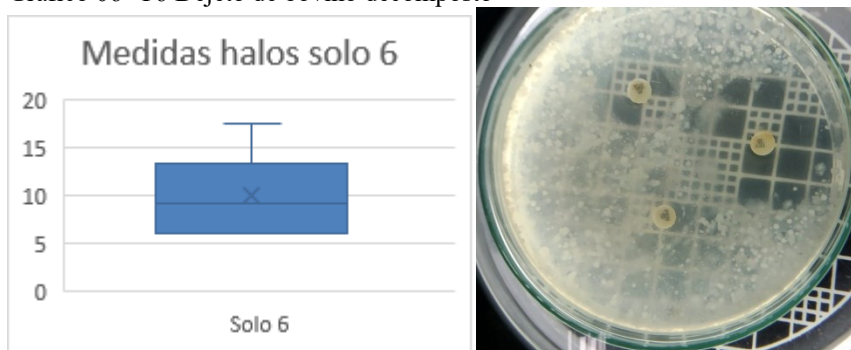


Tabela 08 – Resultados da amostra solo 6 (T6).

Antimicrobial	Code	Category	Diameter (mm)	Microcolony	Interpretation	Standard
Tetraciclina-30	Tetraciclina 30	Resistant	10.5	✓		EUCAST (v. 9.0)
Estreptomicina -10	Estreptomicina 10	Resistant	8.0	✓		EUCAST (v. 9.0)
Penicilina-10	Penicilina 10	Resistant	6.0	✓		EUCAST (v. 9.0)
Tetraciclina-30	Tetraciclina 30	IntermmEDIATE	17.5	✓		EUCAST (v. 9.0)
Estreptomicina -10	Estreptomicina 10	IntermmEDIATE	12.0	✓		EUCAST (v. 9.0)
Penicilina-10	Penicilina 10	Resistant	6.0	✓		EUCAST (v. 9.0)

Medidas (mm) dos halos EUCAST, (2019)

O gráfico 06 e a tabela 08 apresentam os resultados da amostra T06 que são os dejetos de bovinos já decomposto (pronto para uso na adubação do solo) os antibióticos tetraciclina e estreptomicina apresentaram sensibilidade com chance de sucesso com aumento da exposição no local da infecção (I) para o experimento na concentração 10^{-2} com halos de 17,5 e 12mm. Já os demais discos testados nesse tratamento apresentaram resistência dos microrganismos presentes com halos de 6, 8 e 10,5mm, o que oferece probabilidade de falhas no controle e tratamento contra o microrganismo testado para penicilina nas duas concentrações, estreptomicina e tetraciclina na concentração 10^{-1} , de acordo com o manual antibiograma (EUCAST, 2019) que orienta o não uso desses antibióticos para o controle desse patógeno.

Gráfico 07- T7 Lodo das esterqueiras

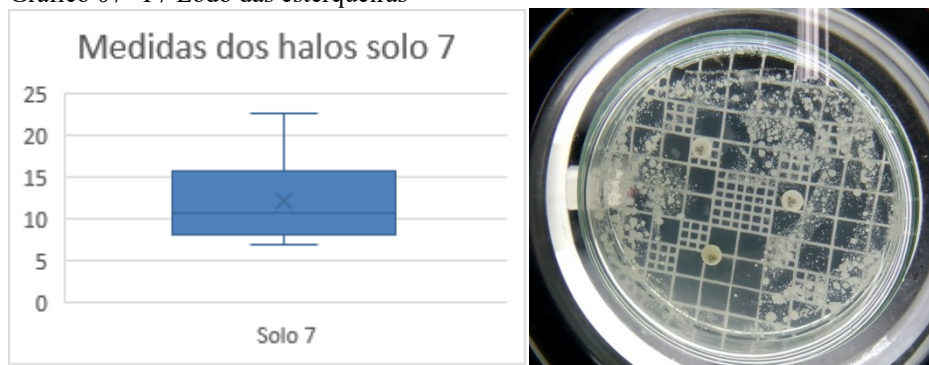


Tabela 09– Resultados da amostra solo 7 (T7).

Antimicrobial	Code	Category	Diameter (mm)	Microcolony	Interpretation	Standard
Tetraciclina-30	Tetraciclina 30	Resistant	13.5	✓		EUCAST (v. 9.0)
Estreptomicina -10	Estreptomicina 10	Resistant	10.0	✓		EUCAST (v. 9.0)
Penicilina-10	Penicilina 10	Resistant	7.0	✓		EUCAST (v. 9.0)
Tetraciclina-30	Tetraciclina 30	Susceptible	22.5	✓		EUCAST (v. 9.0)
Estreptomicina -10	Estreptomicina 10	Intermediate	11.5	✓		EUCAST (v. 9.0)
Penicilina-10	Penicilina 10	Resistant	8.5	✓		EUCAST (v. 9.0)

Medidas (mm) EUCAST, (2019).

Para o lodo de esterco suíno em decomposição a tetraciclina apresentou sensibilidade com halo de 22,5mm na dosagem da amostra na 10^{-2} , oferecendo chance de êxito no tratamento desse antibiótico para esse agente infeccioso testado como apresenta o gráfico 07 e tabela 09. Já para estreptomicina também na concentração da amostra em 10^{-2} que apresentou halo de 13,5mm há chance de êxito com maior exposição do agente antibacteriano no local da infecção. Para penicilina nas duas concentrações testadas, assim como estreptomicina e tetraciclina na concentração 10^{-1} apresentam resistência (R) do agente com probabilidade de falha na administração desses antibióticos para o microrganismo testado nessa concentração seguindo orientações do manual (EUCAST, 2019).

Gráfico 08 -T8 Dejetos de aves superficial na cama de aviário decomposto



Tabela 10– Resultados da amostra solo 8 (T8).

Antimicrobial	Code	Category	Diameter (mm)	Microcolony	Interpretation	Standard
Tetraciclina-30	Tetraciclina 30	Susceptible	24.0	✓		EUCAST (v. 9.0)
Estreptomicina -10	Estreptomicina 10	IntermmEDIATE	14.5	✓		EUCAST (v. 9.0)
Penicilina-10	Penicilina 10	Resistant	9.5	✓		EUCAST (v. 9.0)
Tetraciclina-30	Tetraciclina 30	Susceptible	37.5	✓		EUCAST (v. 9.0)
Estreptomicina -10	Estreptomicina 10	Susceptible	15.5	✓		EUCAST (v. 9.0)
Penicilina-10	Penicilina 10	IntermmEDIATE	13.0	✓		EUCAST (v. 9.0)

Medidas (mm) EUCAST, (2019).

Nesse tratamento (Gráfico 08, tabela 10) a tetraciclina nas concentrações 24mm e 37,5mm, e estreptomicina na concentração 10^{-2} apresentam chance de sucesso no combate ao agente microbiológico presente na cultura, já a estreptomicina e penicilina na concentração do inóculo 10^{-2} apresentam chance de êxito se aumentada a exposição no local de infecção, porém a exposição do agente causal na concentração 10^{-1} oferece resistência ao antibiótico penicilina, nesse caso a chance de falha no tratamento desse microrganismo. Vale salientar aqui: não fosse a metodologia utilizando software antibiogramJ essa cultura era caracterizada sem microrganismos resistentes por não obter colônias de microrganismos na formação do halo.

Gráfico 09- T9 Dejetos de aves no fundo da cama



Tabela 11– Resultados da amostra solo 9 (T9).

Antimicrobial	Code	Category	Diameter (mm)	Microcolony	Interpretation	Standard
Tetraciclina-30	Tetraciclina 30	Susceptible	36.5	✓		EUCAST (v. 9.0)
Estreptomicina -10	Estreptomicina 10	Susceptible	25.5	✓		EUCAST (v. 9.0)
Penicilina-10	Penicilina 10	Resistant	12.0	✓		EUCAST (v. 9.0)

Medidas (mm) EUCAST, (2019).

Para esse tratamento (gráfico 09, tabela 11) os halos de inibição foram maiores, a penicilina apresentou resistência dos microrganismos com halo de 12mm, esses

microrganismos são suscetíveis (S) ao uso de estreptomicina e tetraciclina com halos de inibição microbiológica de 25,5mm e 36,5 mm, nesse caso esses antibióticos oferecem chance de êxito no tratamento contra os agentes microbiológicos presentes segundo manual de antibiograma (EUCAST, 2019) . Nesse tratamento foi mensurada apenas uma placa, por ambas apresentar grande semelhança, sem crescimento microbiológico visível nos halos.

Gráfico 10 - T10 Dejetos de aves em decomposição ao solo fora do aviário



Tabela 12– Resultados da amostra solo 10 (T10).

Antimicrobial	Code	Category	Diameter (mm)	Microcolony	Interpretation	Standard
Estreptomicina -10	Estreptomicina 10	Resistant	8.5	<input type="checkbox"/>		EUCAST (v. 9.C
Penicilina-10	Penicilina 10	Resistant	7.5	<input type="checkbox"/>		EUCAST (v. 9.C

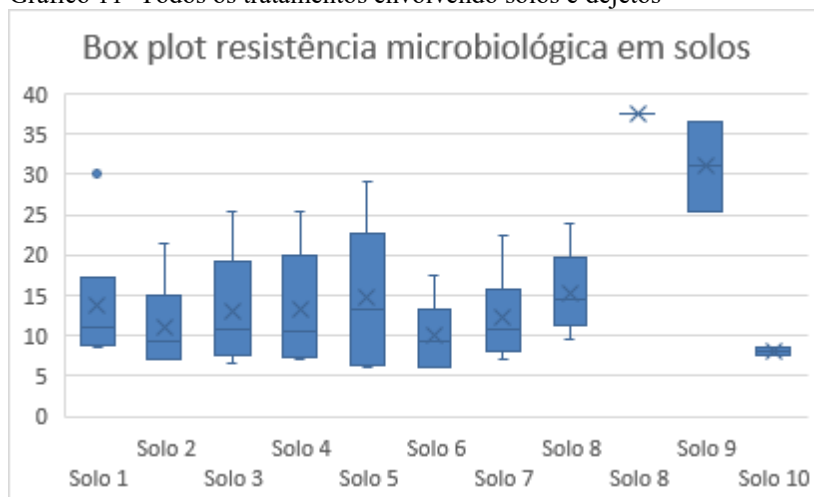
Medidas (mm) EUCAST, (2019).

Nesse gráfico 10 e tabela 12 pode-se observar a resistência do patógeno aos antibióticos estreptomicina e penicilina os quais apresentaram halos de 8,5mm e 7,5mm respectivamente, indicando a chance de falha ou insucesso na administração desses medicamentos para o controle desse agente patogênico, (EUCAST, 2019).

Vale salientar que as amostras de rejeitos de aves foram armazenadas durante 4 meses onde sofreram o processo de fermentação.

Um resumo no gráfico 11 Box plot apresenta o resultado de todas as amostras de solo. O que pode ser visto ainda para melhor compreensão na tabela 13, ainda no gráfico de dispersão gráfico 12.

Gráfico 11- Todos os tratamentos envolvendo solos e dejetos



Fonte: a autora, (2020).

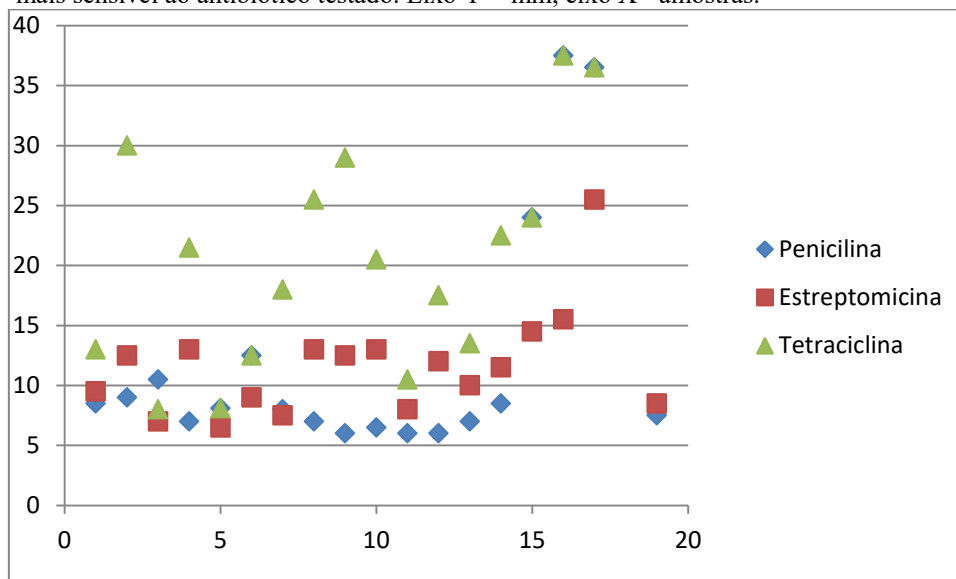
A tabela 13 apresenta os resultados dos halos em milímetros, já o gráfico 12 reforça o resumo de forma a evidenciar os valores dos diferentes antibióticos em eixo x e y.

Tabela 13 – Resumo dos resultados em mm de halo para cada antibiótico

	Penicilina	Estreptomicina	Tetraciclina
solo 1	8,5	9,5	13
	9	12,5	30
Solo 2	10,5	7	8
	7	13	21,5
Solo 3	8,1	6,5	8,1
	12,5	9	12,5
Solo 4	8	7,5	18
	7	13	25,5
Solo 5	6	12,5	29
	6,5	13	20,5
Solo 6	6	8	10,5
	6	12	17,5
Solo 7	7	10	13,5
	8,5	11,5	22,5
Solo 8	24	14,5	24
	37,5	15,5	37,5
Solo 9	36,5	25,5	36,5
Solo 10	7,5	8,5	

Fonte: A autora (2021).

Gráfico 12 - Medida dos halos das amostras de solo - quanto mais distante do eixo X mais sensível ao antibiótico testado. Eixo Y = mm, eixo X= amostras.



Fonte: A autora (2021).

Neste resumo de todas as amostras de solo exposto no gráfico 12, pode-se evidenciar o resultado de forma geral, no qual se verifica a mediana que apresenta halos muito próximos a 10mm na maioria das amostras de solos. Para relatar a resistência (R), sensibilidade (S), I (Sensível com aumento da dose), foram somados os halos mensurados para determinar a percentagem, sendo aqui a amostragem geral de 56 halos (de 10 amostras totais) de 56 discos, desses são 53,57% % das amostras resistentes a algum dos antibióticos testados, desses foram 30,36 % que oferecem resistência a penicilina, 16,07% resistente a estreptomicina, 7,14% com resistência a tetraciclina.

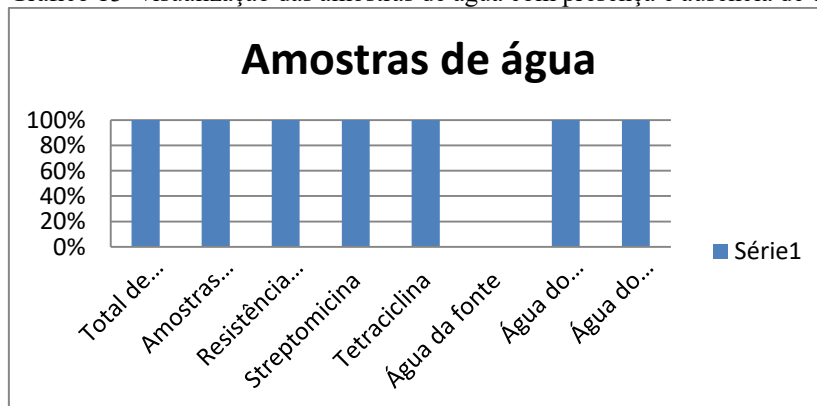
São 21,43% das amostras (56 halos) consideradas I (sendo sensíveis com aumento da exposição) nesse caso há alta probabilidade de sucesso terapêutico ajustando a dose ao local de exposição do agente infeccioso, dessas amostras foram encontradas 7,14% para tetraciclina, 10,71% para estreptomicina e 3,57% para penicilina em interpretação seguindo as normas padrões segundo (EUCAST, 2019), (ANVISA, 2020).

As chances de êxito nos tratamentos terapêuticos para os microrganismos presentes com as dosagens utilizadas nos fármacos apresentados foram encontradas em 25% das amostras analisadas, dessas amostras são 7,14% sensíveis a estreptomicina, 17,86% sensíveis a tetraciclina oferecendo grande probabilidade de êxito no tratamento das infecções causadas pelos microrganismos testados nas dosagens utilizadas seguindo o padrão (EUCAST, 2019).

7.2 Amostras de água

Nas amostras de água e vegetais foram feitas apenas análises visuais qualitativas verificando a presença e ausência de halos em torno dos discos.

Gráfico 13- visualização das amostras de água com presença e ausência de crescimento microbiológico.



Fonte: a autora, (2020).

No gráfico (12) acima é verificado o resultado do total de 18 amostras de água realizadas, sendo que 61,1% apresentaram resistência. Todas essas amostras (61,1%) apresentaram resistência a penicilina, 27,7% apresentaram resistência a estreptomicina, 5,55% resistência a tetraciclina. A água da fonte não teve crescimento microbiológico em nenhuma das 6 amostras. Tanto a água colhida do córrego como a água do açude tiveram todas as amostras com crescimento microbiológico apresentando resistência a pelo menos um antibiótico testado. Nessas amostras não foram mensurados os halos, sendo apenas feita a observação qualitativa pela presença e ausência, como resistente e suscetível respectivamente.

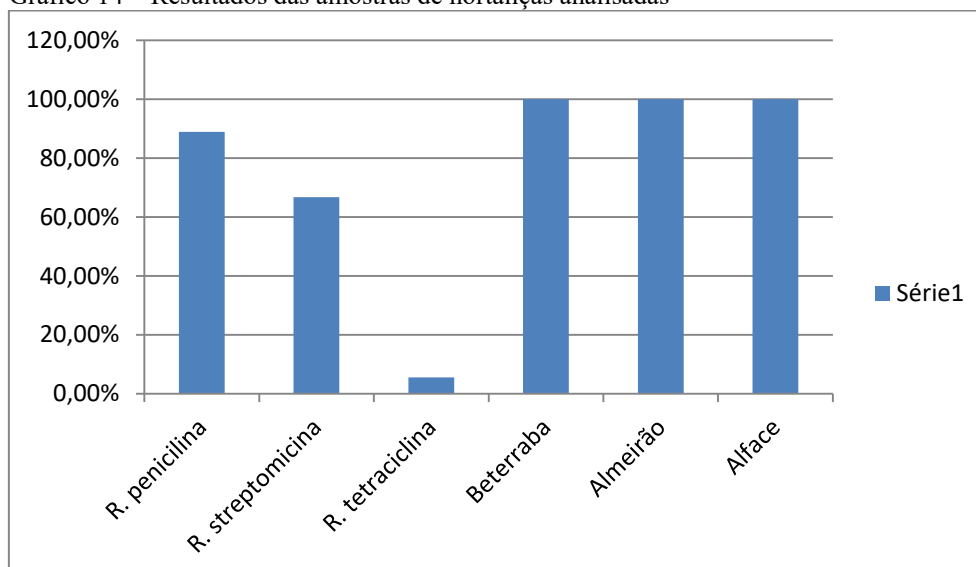
7.3 Amostras de hortaliças adubadas com dejetos de bovinos

Foram semeadas o total de 18 placas, destas 100% apresentaram microrganismos resistentes a algum antibiótico, foram 88,9% das amostras com organismos resistentes a penicilina, 66,7% das amostras obtiveram resistência a estreptomicina, e 5,5% das amostras com microrganismos resistentes a tetraciclina (gráfico 13). Nas amostras de hortaliças não foram mensurados os diâmetros dos halos, sendo feita aqui a observação qualitativa apenas. Identificado como resistente e suscetível pela presença e ausência de colônias de microrganismos próximas aos discos de antibióticos.

Nesse gráfico é possível identificar o quanto a RAM está disseminada, após limpeza e pré-asepsia mais rigorosa comparada a limpeza feita quando para consumo *in natura*, observa-se a persistência de microrganismos com resistência microbiológica em mais de um antibiótico, esse gráfico mostra os motivos da preocupação dos vários órgãos de saúde.

As hortaliças como alface e almeirão são consumidas *in natura* sempre, e por mais que seja feita uma limpeza e pré-asepsia com cloro a 2% e álcool 70%, após lavagem os microrganismos resistentes ainda sobrevivem nos substratos que servem de alimentos para pessoas que poderão adquirir pela alimentação microrganismos resistentes sem o menor contato direto com animais, seus dejetos ou antibióticos.

Gráfico 14 – Resultados das amostras de hortaliças analisadas



Fonte: a autora, (2020).

Estudos a cerca da disseminação de RAM, identificação de antibióticos com maior prevalência de resistência são feitos em todo o mundo. A insegurança com relação a administração medicamentosa e ainda a segurança alimentar são motivos de indagações de autoridades em saúde, donas de casa, manipuladores de alimentos e vigilância sanitária e epidemiológica, corroborando com as análises efetivadas nesse estudo (ALAALI & BIN THANI, 2020) que analisaram vários artigos (66 de 2010 a 2019) onde salientam a disseminação de microrganismos resistentes em vários ambientes como alimentos, águas residuais e animais. Esses microrganismos adquirem genes de resistência, e são disseminados por meio de lançamentos de águas com resíduos de antibióticos, ou uso inadequado desses medicamentos, comprovando nesse

estudo onde foram encontrados microrganismos resistentes em todos os ambientes analisados, reforçando a importância dos cuidados com os alimentos de consumo *in natura* que após limpeza e pré-asepsia, houve persistência de microrganismos resistentes em todos os alimentos citados a pelo menos um antibiótico estudado. Fortalecendo os resultados aqui encontrados salienta-se a pesquisa onde foram analisadas mais de 400 amostras de alimentos crus e cozidos por (LIMA et. al., 2017) onde comprovaram a disseminação de RAM pelo consumo de alimentos vegetais em pelo menos 9 antimicrobianos testados para *E. coli*. Comprovada ainda o aumento da RAM pelas ações antrópicas humanas demonstrado em estudo sobre a disseminação de organismos resistentes pelo desmatamento na Amazônia, onde os pesquisadores identificaram mecanismos de resistência em microrganismos nos ambientes desmatados e intactos, porém em áreas desmatadas análises apresentaram grande riqueza de microrganismos resistentes em áreas com as propriedades ambientais alteradas (LEMOS, et. al., 2021), acredita-se que os microrganismos desenvolvem as defesas de acordo com suas necessidades e ameaças, em ambientes onde não há ameaças e competições existe “equilíbrio”.

O grupo de pesquisadores KHAN et. al., (2019) isolou o patógeno *salmonella* onde comprovaram a RAM em estudo feito com mais de 600 amostras oriundas de granjas avícolas, carne e processados de mercados para 15 antibióticos diferentes, onde obtiveram resultados positivos com 15% de prevalência de RAM nos mercados e 37,2% nas granjas avícolas e prevalência geral de 12% para salmonela entérica. A salmonela é um gênero Gram negativos fermentadores, apresenta resistência aos aminoglicosídeos e outros antibióticos como cefalosporinas e cefuroxina (nesse estudo aqui apresentado a estreptomicina) são organismos preferencialmente causadores de infecções gastrointestinais, que segundo ANVISA, (2020) são fermentadores juntamente com *E. coli*, bactérias também Gram negativas que apresentam resistência a vários antibióticos inclusive penicilina G.

Estudos realizados no Canadá identificaram microrganismos do gênero *Compylobacter* resistentes a pelo menos um antimicrobiano em 53% das amostras testadas em diferentes regiões geográficas com 1460 amostras de frango de corte de estabelecimentos registrados no âmbito federal, mercado e varejo. Desses isolados 39% foram resistentes a tetraciclina e 6,6% resistentes a quinolona-tetraciclina (DRAMÉ, et. al., 2020). Pode haver também microrganismos do gênero *Compylobacter* no estudo apresentado, onde houve resistência a tetraciclina. A resistência a tetraciclina entre

outras drogas também foi verificada em estudo conduzido por MUKHERJEE, et. al. em 2020, onde foi verificada resistência de *E. coli* a múltiplas drogas em escoamento de águas pluviais e amostras de solo de três bacias hidrográficas no Texas. O grupo de pesquisadores enumerou, isolou e analisou para padrões de resistência em *E. coli* que em todos os locais, independentemente do uso do solo, exibiu a presença de AMR /MDR (resistência a antimicrobiano e resistência a múltiplas drogas), sendo a tetraciclina a segunda droga a qual esses microrganismos apresentaram maior resistência.

A disseminação de microrganismos pode ocorrer de diversas formas, uma delas é a cadeia alimentar salientam os autores (LOAYZA, et. al., 2020) que descrevem vários fatores negligenciados durante investigações sobre a RAM, onde o ser humano também é um potencial vetor. Já o estudo feito por CORZO-ARIYAMA, et. al., (2019) em uma fazenda de hortifrutigranjeiros conduzida no país do México, isolaram cepas resistentes de *E. coli* das mãos dos agricultores, do solo e da água, identificaram todas as amostras apresentando alta resistência a tetraciclina e ampicilina, fortalecendo a preocupação com a higienização dos alimentos consumidos *in natura* que passam pelas mãos dos produtores rurais e por tantas mãos nas bancas de supermercados, alimentos já prontos para o consumo também apresentaram microrganismos resistentes como *E. coli* entérica na análise feita por LIMA et. al. (2017) em estabelecimentos como restaurantes, e hotéis no município de Salvador, em 446 amostras de alimentos entre eles vegetais cozidos e crus. *E. coli* pode também ser um dos prováveis patógenos presentes nos cultivos aqui realizados.

Em fazendas leiteiras e matadouros foram analisadas carcaças bovinas e leite do úbere de bovinos, de pessoal e equipamentos onde, comprovou-se a prevalência de estafilococos coagulase-negativos (SNC). Esses microrganismos são uma ameaça à segurança alimentar, pois podem abrigar múltiplas enterotoxinas e genes de resistência antimicrobiana por (GIZAW et. al., 2020). Os SNC causam também mastite bovina com uma perda econômica significativa na indústria de laticínios e pode introduzir esses genes na cadeia alimentar, apesar de não ser identificado (análise em processamento) os microrganismos que ofereceram resistência no estudo aqui apresentado, o estudo realizado por GIZAW et. al. (2020) evidencia a presença de SNC em rejeitos, onde está incluso o leite oriundo de mastite bovina (que não pode ser comercializado), o qual é compostado juntamente com os dejetos bovinos, em carcaças bovinas, os pesquisadores citam também a frequência desses patógenos em subprodutos de origem animal como

aves, suínos e bovinos, também nos manipuladores e tanques de armazenagem de leite nesse estudo.

As variáveis que causam a resistência são muitas e o uso abusivo, inadequado e sem recomendação médica de medicamentos é uma importante porta de entrada para a resistência se instalar em um ser humano, essa preocupação é tema de pesquisa proposto por CHOLVI (2017) que alerta uma possível epidemia de superbactérias pela automedicação com antibióticos. A resistência ameaça o controle e o tratamento de muitas doenças em todo o mundo salienta RUBIO, (2017) abordando origem e possíveis soluções dessa polêmica em análise mundial sobre o assunto.

A prevalência de resistência microbiana a antibióticos também é confirmada por MESQUITA et. al. (2019), que conduziram um estudo envolvendo 34.000 vacas leiteiras abrangendo uma área de mais de 12.500 km² no sul do Estado de Minas Gerais, os resultados mostram a prevalência de *S. aureus* em 70,3%, e *S. agalactiae* em 67,0% nas propriedades leiteiras estudadas, com 47,7% dos rebanhos apresentando ambos os patógenos, principais causadores de mastite bovina.

Os *S. aureus* além de causar mastite bovina é uma bactéria Gram positiva resistente a alguns antibióticos inclusive a penicilina, são produtores de penicilinasas, o primeiro achado de resistência ocorreu ainda na década de 1940 principalmente em pacientes hospitalizados. Esses microrganismos causam ainda infecções de pele, algumas infecções agudas podem disseminar e provocar focos metastáticos, episódios mais graves, como bacteremia, pneumonia, osteomielite, endocardite, miocardite, pericardite e meningite, também podem ocorrer devido a esses patógenos (ANVISA, 2020).

Os *S. agalactiae* são organismos cocos Gram positivos resistentes ao medicamento bacitracina, ANVISA (2020). Estudos realizados por FREY et. al., (2011) e LEMOS, (2020) salientam que *S. agalactiae* são organismos presentes na microbiota humana, são colonizadores de tecidos moles, especialmente no sistema gastrointestinal e urinário, a bactéria por oportunismo causa infecções mais frequentemente em gestantes, recém-nascidos e idosos acima de 60 anos de idade e portadores de doenças crônicas.

Em estudo realizado na China, pesquisadores isolaram cepas resistentes de *S. agalactiae*, *S. aureus*, *E. coli* em amostras de 27 fazendas leiteiras a fim de verificar microrganismos resistentes a mastite bovina, as cepas encontradas demonstraram resistência a vários fármacos como: tetraciclina, canamicina, gentamicina, vancomicina,

clindamicina e eritromicina (ZHANG et. al., 2019). Baseado nas características fenotípicas dos microrganismos estudados possibilita a especular que esses microrganismos podem também fazer parte dos microrganismos resistentes nesse trabalho, pois todos são frequentemente encontrados em rejeitos de bovinos e suínos, analisando principalmente que a mastite bovina é um grande entrave na sanidade da produção de leite, gerando custos que podem variar de 15 a 24% da renda bruta na produtividade leiteira, (VISSIO et. al. 2015), essa é uma realidade da maioria das propriedades leiteiras altos custos em prevenção e tratamento das mastites clínicas e subclínicas.

No Brasil foi realizado um estudo compilando dados de pesquisadores a partir de 2009, envolvendo o uso de promotores de crescimento, o desempenho animal e a resistência a antimicrobianos. A fim de atualizar e discutir dados disponíveis sobre esse tema, relacionado a produção de aves, suínos e bovinos, envolvendo organismos como *Salmonella* não tifóide, *E. coli*. e *S. aureus*. Como demonstração de preocupação estão os fatos de que muitas regulamentações foram construídas nos últimos anos, ainda citam os autores sobre a concentração dos rejeitos, da preocupação e investigação em regiões com maior concentração de produção animal, (RABELLO, et. al., 2020).

Muitas investigações devem ser feitas, com indicações de manejo e uso de antibióticos no controle microbiológico em geral, bem como seu uso e implicações a cerca da resistência pelo consumo destes por animais saudáveis. Ainda que, como visto aqui e também analisado por outros pesquisadores como CORZO ARYIAMA, et. al., (2019), alguns vegetais consumidos *in natura* conseguem permanecer com microrganismos resistentes mesmo após limpeza com agentes de controle como álcool a 70% e hipoclorito de sódio a 2,5%, ambos altamente eficientes na limpeza e pré-asepsia em geral. Já em Mgungundlovu, na África do Sul, foi realizado um estudo por AMOAKO, et. al. (2019) que analisaram 384 amostras de aves e produtos avícolas da fazenda ao garfo, abrangendo toda malha de transmissão, onde a taxa geral de prevalência de *S. aureus* foi de 31,25%, envolvendo amostras da fazenda, transporte, matadouro e pontos de varejo. Os isolados foram resistentes a vários medicamentos entre esses a Tetraciclina em 61,7%, penicilina G em 55,8%, em primeiro e segundo lugar respectivamente. Os pesquisadores relatam ainda a sensibilidade em 100% das amostras à tigeciclina, teicoplanina, vancomicina, nitrofurantoína, cloranfenicol e linezolida. Salientam sobre a taxa de multirresistência em 39,17% a múltipla resistência a antibióticos em 0,23% das cepas estudadas.

Estudiosos como Yassin, et. al. (2017) investigaram a resistência microbiana em *E. coli* isoladas de animais como galinhas, patos, suínos e vacas em Jiangsu na China, usando o método de disco difusão, analisaram 862 isolados clínicos, e determinaram a suscetibilidade a 18 agentes antimicrobianos, entre os anos de 2004 e 2012, onde verificaram a suscetibilidade a pelo menos um antibiótico em 94 dos isolados, onde 83% desses a três classes diferentes de antimicrobianos, onde o antibiótico mais comum dentre os medicamentos que oferecem resistência foi a tetraciclina. Não obstante, no estudo aqui apresentado, a tetraciclina foi o medicamento que ofereceu menor índice de resistência na concentração utilizada, o que talvez possa ser explicado pelo seu menor uso como promotor de crescimento na região do estudo.

Para coloração de Gram foram analisadas somente as placas selecionadas pelo aspecto visual sendo feitas coloração Gram em 20 placas.

Desse total 5 placas coraram para Gram positivo e 15 coraram para Gram negativo ou seja, 25% das placas coradas apresentaram o crescimento microbiológico com organismos Gram positivos e 75% das culturas coradas e analisadas apresentaram crescimento microbiológico resistente com organismos Gram negativos. Os organismos Gram negativos podem ser fermentadores como exemplo as *Enterobacteriaceae* (*Salmonella typhi*, *utras Salmonellas*, *Shigella spp.* *Serratya*, *Proteus*, *Yersinia enterocolitica* e vários sorotipos de *Escherichia coli*) e não fermentadores temos os gêneros: *Pseudomonas*, *Acinetobacter*; organismos do do Complexo *Burkholderi*, as *Stenotrophomonas*, as *Chryseobacterium*, essas são consideradas oportunistas sendo que a principal dessas é a *Pseudomonas aeruginosa*, (ANVISA, 2021). Os microrganismos Gram positivos são os gêneros: *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.* e *Enterococcus spp.*, todos os gêneros são causadores de enfermidades em humanos, frequentemente isolados de amostras humanas, (ANVISA, 2021).

Os resultados da extração de DNA, que possibilitaria a identificação das cepas estudadas, não foi finalizado. Com o advento da pandemia muitos serviços pararam e essa identificação não pôde ser efetivada. A expectativa é que nos próximos meses, com o sequenciamento do DNA e a identificação, seja possível relacionar gêneros e espécies prevalentes no ambiente estudado e a resistência antimicrobiana, corroborando com informações presente na literatura internacional.

8 CONCLUSÕES

O antibiótico mais eficiente nesse estudo foi tetraciclina 30 ug,

O antibiótico menos eficiente nesse estudo foi penicilina 10 ug,

Houve persistência de microrganismos resistentes em hortaliças após pré assepsia e desinfecção com hipoclorito de sódio a 2% e álcool a 70%

A seguridade para consumo de alimentos vegetais *in natura* pode estar comprometida se usados dejetos sem decomposição adequada no cultivo de hortícolas,

Estudos devem ser realizados a fim de substituir e/ ou diminuir o uso de antibióticos na produção animal,

Mais estudos ainda devem ser efetivados para verificar quais os microrganismos envolvidos na resistência a antimicrobianos no estudo analisado com o sequenciamento do DNA,

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Maiores estudos devem ser feitos com conclusões mais acertadas após identificação, sequenciamento do DNA dos patógenos presentes, resistentes aos antibióticos testados.

REFERÊNCIAS

ABPA - Associação Brasileira de Proteína Animal – **Relatório anual de atividades 2017**. Disponível em: bpa-br.com.br/storage/files/relatorio-anual-2018.pdf. Acesso em: 01 maio 2019.

ACUMEDIA - **Caldo Nutriente - Nutrient Broth 7146** . Disponível em: PI7146, Rev 02, Novembro 2010. acesso em: 22 maio 2019.

AIRES, C. A. M.; ASENSI, M. D. **Resistência bacteriana aos antibióticos: o que você deve saber e como prevenir** / – Rio de Janeiro : IOC/Fiocruz, 2017. 15 p. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/ioc>. Acesso em: 06 maio 2019.

ALAALI, Z.; BIN THANI, A. S. -Patterns of antimicrobial resistance observed in the Middle East: Environmental and health care retrospectives. Journal homepage: Science of the Total Environment 740 (2020) 140089 www.elsevier.com/locate/scitotenv.

ALONSO, C.A.; DOMÍNGUEZ, C.; HERAS, J.; MATA, E.; PASCUAL, V. TORRES, C.; ZARAZAGA, M.- **Antibiogramj: A tool for analysing images from disk diffusion tests**. Computer Methods and Programs in Biomedicine.Elsevier. V. 143, May 2017, P. 159-169. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cmpb.2017.03.010>

ALVIM, Mariana- **Por que uso de antibióticos na agropecuária preocupa médicos e cientistas**. Disponível em: <https://www.bbc.com/portuguese/geral-50119820>, Acesso em: 12 de outubro de 2020.

AMOAKO, D. G.; SOMBORO, A. M.; ABIA, A. L. K.; MOLECHAN, C.; PERRETT, K.; BESTER, L. A.; ESSACK, S. Y. - **Antibiotic Resistance in Staphylococcus aureus from Poultry and Poultry Products in uMgungundlovu District, South Africa, Using the “Farm to Fork” Approach**. Microbial Drug resistance, Volume 26, Number 4, 2020. Mary Ann Liebert, Inc. DOI: 10.1089/mdr.2019.0201.

ANVISA - **Antibióticos, Conceitos gerais: bases teóricas e uso clínico**- Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede>. Acesso em: 05 maio 2019.

ANVISA - **Consenso sobre o uso racional de antimicrobianos/ Ministério da Saúde**, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. – Brasília: 2001 36p. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br>. Acesso em: 06 maio 2019.

ANVISA- Tratamento das principais infecções comunitárias relacionadas a assistência a saúde e a profilaxia antimicrobiana em cirurgia. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede_rm/cursos/atm_racional. Acesso em: 09 de outubro de 2020.

ANVISA – **Resistência microbiana- mecanismos e impacto clínico**. Acesso em: 11 de novembro de 2020. Disponível em: https://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede_rm/cursos/rm_controlere/opas_web/modulo3/gramp_staphylo.htm.

ANVISA – Gram negativos não fermentadores . Acesso em: 20 de fevereiro de 2021.
Disponível em:
https://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo3

ANVISA – Gram positivos – Acesso em: 21 de fevereiro de 2021. Disponível em:
https://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo4.

ANVISA – Gram negativos Fermentadores- Acesso em: 20 de fevereiro de 2021.
Disponível em:
https://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo2

AVINEWS = Produção Brasileira de carne de frango deverá crescer 4% diz USDA-
Revista avinews, set. 2020. Acesso em: 12 de dezembro de 2020. Disponível em:
<https://avicultura.info/pt-br/2021-incertezas-mercado-proteina-usda/>

BINGYUN, L.; WEBSTER, T. J. ; - **Bacteria Antibiotic Resistance: New Challenges and Opportunities for Implant-** Associated Orthopaedic Infections. J Orthop Res. 2018 Jan; 36(1): 22–32. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso em: 24 de abril de 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de vigilância em saúde. Departamento de vigilância das doenças transmissíveis. **Plano de ação nacional de prevenção e controle da resistência aos antimicrobianos no âmbito da saúde única 2018-2022.** (PAN – BR)/ Ministério da saúde. Secretaria de vigilância em saúde. Departamento de vigilância em doenças transmissíveis. Brasília: Ministério da Saúde, 2018.

BRASIL. **Ministério da Saúde.** Novo relatório da OMS revela diferenças no uso de antibióticos entre 65 países. Brasília: Ministério da Saúde, 2017.

BRASIL - OMS recomenda que agricultores e indústria alimentar parem de usar antibióticos em animais saudáveis para evitar resistência a esses medicamentos. Disponível em: <https://www.paho.org/bra/index.php>. Acesso em 12. 10.2018.

CARDOSO, E. J. B. N.; ANDREOTE, F. D.;- **Microbiologia do solo.** 2ª Ed. Cap.2-3, Piracicaba, Esalq, 2016, 221pg.

CHECCUCCI, A.; TREVISI.; LUISE, D.; MODESTO, ; BLASIOLI, S. ,BRASCHI, I.; MATTARELLI.,P. - **Exploring the animal Waste resistome: The Spread of Antimicrobial Resistance Genes Through the Use of Livestock Manure. Frontiers in Microbiology** | www.frontiersin.org. July 2020 | Volume 11 | Article 1416

CHOLVI, MARIA - La automedicación con antibióticos puede provocar una epidemia de “superbacterias”- Elsevier, outubro, 2017. Acesso em: 22 de abril de 2020. Disponível em: <https://www.elsevier.com/es-es/connect/actualidad-sanitaria/la-automedicacion-con-antibioticos-puede-provocar-una-epidemia-de-superbacterias>

COSTA, R. P. da.; SPISSO, B. F.; PEREIRA, M. U.; MONTEIRO, M. A.; FERREIRA, R. G.; CARLOS, B. de S.; OLIVEIRA, A. C. de.- **Tilosina: um importante antibiótico não monitorado em leite no Brasil**. Segurança Alimentar e Nutricional, Campinas, 20(2):245-259, 2013. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br>. Acesso em: 14 maio 2019.

CORZO-ARYAMA, H. A. C.; GARCIA-HEREDIA, A.; HEREDIA, N.; GARCIA, S.; LEÓN, Juan L.; JAYKUS, L. A.; SOLIS-SOTO, L.- **Phylogroups, pathotypes, biofilm formation and antimicrobial resistance of Escherichia coli isolates in farms and packing facilities of tomato, jalapeño pepper and cantaloupe from Northern Mexico**, International journal of Food Microbiology, 290 (2019) 96-104. Disponível em: www.elsevier.com/locate/foodmicro. Acesso em: 01 de outubro de 2020.

CYCON, M. MROZIK, A.; PIOTROWSKA-SEGET, Z.; - **Antibiotics in the Soil Environment—Degradation and Their Impact on Microbial Activity and Diversity**. Microbiol., 08 March 2019, Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00338>, Acesso em: 25 abril 2019.

DEPEC- BRADESCO – **Pecuária. Departamento de pesquisas e estudos econômicos**. Fevereiro, 2019. Disponível em: www.economiaemdia.com.br. Acesso em: 30 abril 2019.

DRAMÉ, O.; LECLAIR, D.; PARMLEY, E. J.; DECKERT, A.; OUTTARA, B.; DAIGNAULT, D.; RAVEL, A.- **Antimicrobial Resistance of Campylobacter in Broiler Chicken Along the Food Chain in Canada**. Foodborne pathogens and disease. Volume 17, Number 8, 2020. Mary Ann Liebert, Inc.

EMBRAPA - BILOTTA, P.; KUNZ, A. - **Uso de Processos Químicos no Controle do Risco Biológico de Dejetos Suínos**. 1ª edição Versão Eletrônica: (2011). Disponível em: http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_publicacoes Acesso em: 27 abril 2019.

EMBRAPA – MORÉS, N.; MORES, M. A. Z.; - **Brasil está preparado para restringir o uso de antimicrobianos?**. Revista Industrial.com.br, ed. 277. 4/Nº2017.

EMBRAPA – MAROUELLI, A. W.; MALDONADE, R. I.; BRAGA, B. M.; SILVA, R. H. – **Qualidade e segurança sanitária da águas para fins de irrigação** – circular técnica 134. Brasília. DF, outubro 2014.

EMBRAPA – **Anuário 2018 da avicultura industrial – uma ano para o setor avícola comemorar** – nº 11/ 2017, ano 109, edição 1272. Disponível em: <https://www.embrapa.br/documents>. Acesso em: 01 maio de 2019.

EMBRAPA - **Anuário leite 2018 - Indicadores, tendências e oportunidades para quem vive no setor leiteiro**. Disp. ainfo.cnptia.embrapa.br/digital . Acesso em: 17 maio 2019.

EMBRAPA – BELLAVER, C. – **Utilização de melhoradores de desempenho na produção de suínos e aves**. http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_publicacoes. Acesso em: 01 maio 2019.

EMBRAPA – **Boas práticas agropecuárias bovino de corte**. Embrapa Gado de Corte Campo Grande, MS 2007. Disponível em: www.infoteca.cnptia.embrapa.br. Acesso em: 29 abril 2019.

EMBRAPA, Filizola, H. F.; Gomes, M. A. F.; Souza, M. D. de. - **Manual de procedimentos de coleta de amostras em áreas agrícolas para análise da qualidade ambiental: solo, água e sedimentos**. Embrapa Meio Ambiente Jaguariúna, SP 2006. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br>. Acesso em: 15 maio 2019.

EUCAST, BRCAST - **Manual de Antibiograma 2019** –Ver. 06/2019. Acesso em: 12 de set. 2020. Disponível em: <https://www.laborclin.com.br/wp-content/uploads/2019/05/Manual-Antibiograma-BRCAST-2019.pdf>

FANG, H.; WANG, H.; CAI, L.; YU, Y. **Prevalence of antibiotic resistance genes and bacterial pathogens in long-term manured greenhouse soils as revealed by metagenomic survey**. Environmental Science & Technology, v. 49, n. 2, p.1095-1104, 2015.

FIOCRUZ – Procedimento operacional padrão –Técnica de coloração de Gram para coleção de bactérias da Amazônia. Disponível em: https://amazonia.fiocruz.br/doc/gq/ilmd_scol_pop_001.pdf. Acesso em: 14 de agosto de 2019.

FREY, M. N.; IOPPI, A. E. E.; BONAMIGO, R. R.; PRADO, G. P. – **Streptococcus agalactiae como agente etiológico de Doença Sexualmente Transmissível**. Acesso em: 12 de novembro de 2020. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-05962011000600025

FURP- STREPTOMICINA – **1g pó para solução injetável sulfato de streptomicina-Bula para profissional de saúde**. ANVISA, 30 novembro 2015. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula. Acesso em: 10 maio 2019.

GIZAW, F.; KEBEBA, T.; TESHOME, F.; KEBEBE, M.; ABREHAM, T.; HAYISHE, H.; WAKTOLE, H.; BEYENE TUFO, T.; EDAO MAMMO, B.; AYANA, D.; ABUNNA, F.; BEYI, A. F.; ABDI, R. D.- **Distribution and antimicrobial resistance profile of coagulase-negative staphylococci from cattle, equipment, and personnel on dairy farm and abattoir settings**. Heliyon. 2020 Mar. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso em: 01 de outubro 2020.

GOETHEM, V. M. W.; PIERNEEF, R.; BEZUIDT, O. K.; COWAN, D. A.; MAKHALANYANE, T.; PEER, Y. V.; **A reservoir of ‘historical’ antibiotic resistance genes in remote pristine Antarctic soils**. Microbiome v. 6. Fevereiro de 2018. : 10.1186 / s40168-018-0424-5

GONZALES, E.; MELLO, H. H. de C.; CAFÉ, M. B. – **Uso de antibióticos promotores de crescimento na alimentação animal** – Dossiê pecuária - Revista UFG / Dezembro 2012 / Ano XIII nº 13. Disponível em: www.proec.ufg.br. Acesso em: 30 abril 2019.

IBGE – Instituto Brasileiro de geografia e estatística - Indicadores IBGE Estatística da Produção Pecuária. Jan-mar, 2018. Disponível em: <ftp.ibge.gov.br/producao>. Acesso em: 30 abril 2019.

ICC BRASIL - Restrição do uso de antibióticos na produção animal. Acesso em: 20.01.2021. disponível em: <http://www.iccbrazil.com/restricao-do-uso-de-antibioticos-na-producao-animal/#:~:text=%E2%80%9CO%20uso%20dos%20antimicrobianos%20tilosina,%C3%B3rg%C3%A3os%20internacional>

KHAN, A. - **New Gene Variant is Even More Resistant to Hospital Antiseptic** – American Society for Microbiology, april, 2019. Disponível em: <https://www.asm.org/Press-Releases/2019/April/New-Gene-Variant-is-Even-More-Resistant-to-Hospita>. Acesso em: 21 de abril de 2019.

KHAN, S. B.; KHAN, M. A.; AHMAD, I.; UR REHMAN, T.; ULLAH, S.; RAHIM, D.; SULTAN, A.; MEMON, A. M.- **Phentotypic, gentotypic antimicrobial resistance and pathogenicity of Salmonella enterica serovars Typimurium and Enteriditis in poultry and poultry products**. Acesso em: 20 de setembro de 2020. Disponível em: www.elsevier.com/locate/micpath

KHALED, S. B. -**Microbial contamination of vegetable crop and soil profile in arid regions under controlled application of domestic wastewater** - Saudi J Biol Sci. 2016 Jan; 23(1): S83–S92.

LEMOS, MARCELA - **Streptococcus agalactiae: principais sintomas e como é feito o tratamento**. Acesso em: 12 de novembro de 2020. Disponível em: <https://www.tuasaude.com/streptococcus-agalactiae/>

LEMOS, L. N.; PEDRINHO, A.; VASCONCELOS, T. R.; TSAI, S. M.; MENDES, L. W.- **Amazon deforestation enriches antibiotic resistance genes**. Elsevier, vol. 153, february, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.108110>

LIMA, C. M.; SOUZA, I. E. G. L.; ALVES, T. Dos S.; LEITE, C. C.; BARRETO, N. S. E.; ALMEIDA, R. C. de C. - **Antimicrobial resistance in diarrheagenic Escherichia coli from ready-to-eat foods. 2017**. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29051656/>. Acesso em: 02 de outubro de 2020.

LOAYZA, F.; GRAHAM, J. P.; TRUEBA, G.- **Factors Obscuring the Role of E. coli from Domestic Animals in the Global Antimicrobial Resistance Crisis: An Evidence-Based Review**- Int. J. Environ. Res. Public Health **2020**, 17, 3061. www.mdpi.com/journal/ijerph

MACHADO, D. C.; MAIA, C. M.; CARVALHO, I. D.; SILVA, N. F. da; DANTAS, M. C.; BORGES, A. P.; SERAFINI, Á. B. – **Micro;iological quality of organic vegetables produced in soil treated with different types of manure and mineral fertilizer**. Braz. J. Microbiol. vol.37 no.4 São Paulo Oct./Dec. 2006, disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822006000400025> . acesso em: 20 de abril de 2019.

MACEDO, G.; HERNANDEZ LEAL, L.; VAN DER MAAS, P.; HEEDERIK, D.; MEVIUS, D.; SCHMITT, H. - **The impact of manure and soil texture on antimicrobial resistance gene.** Science of the Total Environment 737 (2020) 139563 levels in farmlands and adjacent ditches

MAIA, E. C. P.; SILVA, P. P.¹; ALMEIDA, W. B. de; SANTOS, H. F. dos; MARCIAL, B. L.; RUGGIERO, R.; GUERRA, W. - **Tetraciclinas e gliciliclinas: uma visão geral.** Scielo, Quím. Nova vol.33 no.3 São Paulo 2010.

MAPA - **Mapa promove ações na Semana Mundial de Conscientização do Uso Racional de Antibióticos 2018** – Saúde humana e animal – notícias 13/11/2018. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/noticias/mapa>. Acesso em: 28. Abril.2019.

MARC, W. V. G., PIERNEF, R.; BEZUIDT, O. K. I.; VAN DE PEER, Y.; COWAN, D. A.; THULANI P. M. - **A reservoir of ‘historical’ antibiotic resistance genes in remote pristine Antarctic soils** Journal list Microbiome v.6 2018PMC5824556 (US National Library of Medicine National Institute of Health).

MELO, W. J. de. **Uso de resíduos na agricultura e qualidade ambiental.** Cap. 15. Campinas - SP 2007 (Microbiota do Solo 2. Qualidade Ambiental. I. Silveira, Adriana Parada Dias da II. Freitas, Sueli dos Santos III. Campinas. Instituto Agrônômico IV. Título) LIVRO que tem os dois capítulos

MELO, V. V.; DUARTE, I. de P.; SOARES, A. Q.- **Guia Antimicrobianos** /– 1.ed. - Goiânia, 2012. Disponível em: <https://farmacia hc.ufg.br>. Acesso em: 12 maio 2019.

MESQUITA, A. A.; ROCHA, C. M.B.M.; BRUHN, F. R.P.; CUSTÓDIOS, D. A.C.; BRAZ, M. S.; PINTO, S. M.; SILVA, D. B.; COSTA, G. M.- **Staphylococcus aureus and Streptococcus agalactiae: prevalence, resistance to antimicrobials, and their relationship with the milk quality of dairy cattle herds in Minas Gerais state, Brazil.** Pesq. Vet. Bras. 39(5):308-316, May 2019.

MORAIS, M. A.; FERREIRA NETO, M.; SILVA, G. DE F.; LIRIA, R. B. DE; BRITO, R. F. DE; MIGUEL, L. C. V.- **Contaminação microbiológica no perfil do solo por águas residuárias.** HOLOS, Ano 32, Vol. 3. Maio 2016.

MUPFUNYA, C. R.; NENENE, D. Q.; NAIDOO, V. - **Antimicrobial use practices and resistance in indicator bacteria in communal cattle in the Mnisi community, Mpumalanga, South Africa.** Veterinary Medicine and Science. 01 de agosto de 2020. disponível em: wileyonlinelibrary.com/journal/vms3.

MUKHERJEE, M.; GENTRY, T.; MJELDE, H.; BROOKS, J. P.; HARMEL, D.; GREGORY, L.; WAGNER, K. - **Escherichia coli Antimicrobial Resistance Variability in Water Runo and Soil from a Remnant Native Prairie, an Improved Pasture, and a Cultivated Agricultural Watershed.** Water 2020, 12, 1251; doi:10.3390/w12051251. IN: www.mdpi.com/journal/water.

PROMEGA – Techinal manual Wizard® Genomic DNA Purification Kit Instructions for Use of Products A1120, A1123, A1125 and A1620 revised 2019. Acesso em:

21.08.2020.disponível em:
[wizard%20Genomic%20DNA%20Purification%20Kit%20TM050.pdf](#)

NCCLS. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard**— Eighth Edition. NCCLS document M2-A8 [ISBN 1-56238-485-6].

NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 02 maio 2019.

NESME, J.; CÉCILLION, S.; DELMONT, T. O.; MONIER, J. M.; VOGEL, T. M.; SIMONET, P. **Large-scale metagenomic-based study of antibiotic resistance in the environment**. *Curr Biol.* 2014 May 19;24(10):1096-100. doi: 10.1016/j.cub.2014.03.036. Epub 2014 May 8. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24814145>, Acesso em: 21 de abril de 2019.

NETO, P. F.; FERNANDES, S. A. P.; JAHNEL, M. C.; **Microbiota do solo como indicadora da poluição do solo e do ambiente. Microbiota do solo e qualidade ambiental**. Instituto Agronômico Campinas (SP), 2007. Cap. 14.

NOSCHANG, J. P.; DE MORAES, R. E.; CARPINELLI, N. A.; SCHMIDT, P. I.; DE OLIVEIRA, V. D.; SILVEIRA, R. F.; SILVEIRA, I. D. B.- **Promotores de crescimento (antibióticos) na alimentação de suínos** – Revisão de Literatura. *REDVET Rev. Electrón. vet.*, Disponível em: <Http://www.veterinaria.org/revistas/redvet> 2017 Volumen 18 N° 9 -. Acesso em: 14 de outubro de 2020.

ONU BR - **Poluição provoca evolução de bactérias resistentes a remédios**, Tags, Bactérias resistentes, ONU, poluição 2018. Disponível em: <ww.tratamentodeagua.com.br>. Acesso em: 23 de abril de 2019.

OPAS – BRASIL – Disponível em: <https://www.paho.org/bra/index>. Em: 12 de abril de 2020.

PANIZZON, P. J.; HARRY, L.P. J.; KNAAK, N.; RAMOS, R. C.; ZIEGLER, L. M. - **Microbial Diversity: Relevance and Relationship Between Environmental Conservation And Human Health**. *Braz. arch. biol.technol.* vol.58 no.1 Curitiba Jan./feb. 2015, disponível em: <http://dx.doi.org>

PELCZAR JR, M. J. **Microbiologia; conceitos e aplicações**, v. 1, 2 ed. Cap. 5 São Paulo. Pearson Makron Books, 1997.

POZZA, G.; PINTO, A.; CROVATO, S.; MASCARELLO, G.; BANO, L.; DACASTO, M.; BATTISTI, A.; BARTOLI, B.; RAVAROTTO, L. & MARANGON, S.- **Antimicrobial use and antimicrobial resistance: standpoint and prescribing behaviour of Italian cattle and pig veterinarians**. *Italian journal of animal Science* 2020, Vol. 19, N°. 1, 905–916 <https://doi.org/10.1080/1828051X.2020.1807419>

RABELLO, R.; BONELLI, R. R.; PENNA, B. A.; ALBUQUERQUE, J. P.; SOUZA, R. M.; CERQUEIRA, A. M. F. - **Antimicrobial Resistance in Farm Animals in Brazil:**

An Update Overview. *Animals* 2020, 10, 552; doi:10.3390/ani10040552.
www.mdpi.com/journal/animals

RASHEED, M. U.; THAJUDDIN, N.; AHAMED, P.; TELEMARIAM, Z.; JAMIL, K.-
Antimicrobial drug resistance in strains of *Escherichia coli* isolated from food sources - *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* vol.56 no.4 São Paulo July/Aug. 2014.
Disponível em: <http://www.scielo.br/sciel>. Acesso em: 16 maio 2019.

REGITANO, B. J.; LEAL, P. M. R. – **Comportamento e impacto ambiental de antibióticos usados na produção animal Brasileira.** – *Ver. Bras. Ciência do Solo*, 34: 601-616, 2010. Disponível em:
www.scielo.br/pdf/rbcs/v34n3/02.pdf. Acesso em: 20 abril 2019.

ROMAIN, M. SCOTT, A.; TIEN, Yuan-Ching.; MURRAY, R.; SABOURIN, L.; ZHANG, Y.; TOPP, E.- **Impact of Manure Fertilization on the Abundance of Antibiotic-Resistant Bacteria and Frequency of Detection of Antibiotic Resistance Genes in Soil and on Vegetables at Harvest.** *Applied and environmental microbiology* p.5701-5709. September 2-13. Volume 79, number 18. Disponível em:
<https://aem.asm.org/content/79/18/5701>. Acesso em: 03 maio 2019.

RUBIO, JAVIER - **“La resistencia a los antimicrobianos está amenazando al control y tratamiento de un gran número de enfermedades en todo el mundo”.** Elsevier, novembro de 2017. Acesso em: 12 de fevereiro de 2020, disponível em: <https://www.elsevier.com/es-es/connect/medicina/elseviertalks-la-resistencia-a-los-antimicrobianos-esta-amenazando-al-control-y-tratamiento-de-un-gran-numero-de-enfermedades-en-todo-el-mundo>.

SÃO PAULO- **Cientistas de SP pesquisam diversas aplicações para os óleos essenciais - Secretaria de Agricultura do Estado analisa produtos para serem usados em áreas como agropecuária, indústria e gastronomia.** Acesso em: 14 de outubro de 2020. Disponível em: <https://www.saopaulo.sp.gov.br/ultimas-noticias/cientistas-de-sp-pesquisam-diversas-aplicacoes-para-os-oleos-essenciais/>

SANTOS, I. C. . dos; SOUSA, R. V. de; SANTANA, G. de C.- **Princípios da antibióticoterapia em medicina veterinária.** *Boletim 39 UFLA - MG*. Disponível em: www.livraria.editora.ufla.com.br. Acesso em: 15 maio 2019.

SAÚDE PR. PAMvet-PR / 2005 Levantamento do Uso e Comercialização de Medicamentos Veterinários em Frango de Corte. Disponível em:
www.saude.pr.gov.br/sites/default/arquivos_restritos/files/documento/2020-04/relatorio_levantamento_frango.pdf. Acesso em: 12 de outubro de 2020.

SCIELO - **Alexander Fleming e a descoberta da penicilina-** *J. Bras. Patol. Med. Lab.* vol.45 no.5 Rio de Janeiro Oct. 2009 Disponível em: <http://dx.doi.org/>. Acesso em: 06 maio 2019.

SILVA, M. M. M.; ARAUJO, D. T. S. A. - Análise de sensibilidade/resistência microbiana: Resistência microbiana em infecções primárias do trato respiratório e urinário confirmadas laboratorialmente associadas à internação da clínica médica hospitalar e sensibilidade microbiana da parte física de setores do hospital. **Congresso-**

Mineiro-de-Epidemiologia. Acesso em: 20 de abril de 2021. Disponível em: https://ameci.org.br/wp-content/uploads/2019/12/068_JIC_SUP01_2019

SUS - LACEN - Laboratório central de saúde pública - Florianópolis - SC. Disponível em: <http://lacen.saude.sc.gov.br>. Acesso em: 20 maio 2019.

THANNER, S.; DRISSENER, D.; WALSH, F. **Antimicrobial Resistance in Agriculture. American society for microbiology.** March/April 2016 Volume 7. Disponível em: <https://mbio.asm.org>. Acesso em: 16 maio 2019.

TORRES, R. de N. S.; DREHER, A.; SIMIONI, T. A. - **Uso de antibióticos como promotor de crescimento e seus possíveis substitutos ao seu uso em frangos de corte.** Nutritime, Vol. 12, Nº 06, nov/dez de 2015. Disponível em: https://www.nutritime.com.br/arquivos_internos/artigos/336_-_4348-4358_-_NRE_12-6_nov-dez_2015.pdf. Acesso em: 12 de julho de 2020.

WERTH, J. BRIAN - **considerações gerais sobre antibióticos.** University of Washington School of Pharmacy. Rev. Jul. 2020. Acesso em: 16 de fevereiro de 2021. Disponível em: <https://www.msdmanuals.com/pt/casa/infec%C3%A7%C3%B5es/antibi%C3%B3ticos/considera%C3%A7%C3%B5es-gerais-sobre-antibi%C3%B3ticos>

WORLD HEALTH ORGANIZATION – **Global action plano n antimicrobial resistance- WHO,** 2015. www.who.int, or can be purchased from WHO Press, World Health Organization, 20 Avenue Appia, 1211 Geneva 27, Switzerland, disponível em: <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/global-action-plan/en/>, acesso em: 21 de abril de 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - **Antimicrobial resistance: global report on surveillance** – WHO, 2014. www.who.int, Acesso em: 24 de abril de 2019. Disponível em: www.who.int.

WORLD HEALT ORGANIZATION – **Antibiotics resistance** – Kay facts. News. 5 february 2018. Disponível em: www.who.int/news-room/fact-sheets. Acesso em: 06 maio 2019.

WILCOX, RAND - Introduction to Robust Estimation and Hypothesis Testing (Fourth Edition). **Chapter 3 - Estimating Measures of Location and Scale.** Statistical Modeling and Decision Science 2017, Pages 45-106. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804733-0.00003-2>

VIEIRA, Rosana Faria – **Ciclo do nitrogênio em sistemas agrícolas** – Brasília, DF: Embrapa, 2017. 163 p.

VISSIO. C.; AGÜERO, D. A.; RASPANTIB, C. G.; ODIERNOB, L. M.; LARRIESTRA, A. J. - **Pérdidas productivas y económicas diarias ocasionadas por la mastitis y erogaciones derivadas de su control en establecimientos lecheros de Córdoba, Argentina.** Arch Med Vet 47, 7-14 (2015). Acesso em: 18 de fevereiro de 2021. Disponível em: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/amv/v47n1/art03.pdf>.

ZHANG, Z.; YANG, YANG, F.; LI, X.; LUO, J. Y.; LIU, L.; WANG, D.; ZANG, Y.; LI, H.-S. **Distribution of Serotypes, Antimicrobial Resistance and Virulence Genes among *Streptococcus agalactiae* Isolated from Bovine in China.** Acta Scientiae Veterinariae, 2019. 47: 1699.

YASSIN, A. K.; GONG, J.; KELLY, P.; LU, G.; GUARDABASSI, L.; WEI, L.; HAN, X.; QIU, H.; PRICE, S.; CHENG, D. WANG, **Antimicrobial resistance in clinical *Escherichia coli* isolates from poultry and livestock, China.** 21 of sep. 2017; 12 (9): e0185326. DOI: 10.1371 / journal.pone.0185326.