

Resistansi Antibiotik Secara Fenotip Dan Deteksi Gen TetA pada Sampel Hati Ayam di Pasar Dukuh Kupang Surabaya

Phenotypic Antibiotic Resistance And Detection of TetA Gene in Chicken Liver Samples At Dukuh Market, Kupang Surabaya

Reina Puspita Rahmani^{*}, Dyah Widhowati, Nurul Hidayah

Fakultas Kedokteran Hewan, Jl. Dukuh Kupang XXV No. 54, Universitas Wijaya Kusuma Surabaya

Article history

Received: Feb 24, 2021;

Accepted: Aug 18, 2021

* Corresponding author:

E-mail:

puspita.reina@gmail.com

DOI:

10.46549/jipvet.v11i3.244



Abstract

The purpose of this study was to determine the resistance of several antibiotics phenotypically and genotypically to detect the tetA gene from broiler chicken liver samples at Dukuh Kupang market, Surabaya. A total of 30 samples were taken and then prepared aseptically and sterile. Isolation on Eosin Methylene Blue Agar (EMBA) media, then microscopic examination using gram staining and biochemical tests of Triple Sugar Iron Agar (TSIA), Sulfide Indole Motility (SIM), Methyl Red (MR), Voges Prouskauers (VP) and Simons Citrate Agar (SCA). The identified *Escherichia coli* colonies were tested for antibiotic sensitivity using the Kirby Bauer method, then isolates that were proven to be resistant to tetracycline antibiotics were followed by genetic testing using the Polymerase Chain Reaction (PCR) method. The results showed that 20 of the 30 samples were positive for *Escherichia coli*. *Escherichia coli* isolates from chicken liver samples showed resistance to 30 µg tetracycline antibiotics by 85% (17 of 20 samples). Researchers also compared with other antibiotics, the highest resistance to ampicillin 10 µg was 90% (18 out of 20 samples), gentamicin resistance was 10 µg by 50% (10 of 20 samples) and 30 µg chloramphenicol antibiotic resistance by 30% (6 of 20 samples). The isolates that were resistant to tetracycline were confirmed by Polymerase Chain Reaction to detect the tetA gene with the final product in the form of a band with a length of 210 bp. Bacterial isolates resistant to Tetracycline antibiotics did not always show TetA gene expression in the PCR test.

Keywords: Antibiotic Resistance; *Escherichia coli*; Market; TetA gene

Abstrak

Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mengetahui resistansi beberapa antibiotik secara fenotip dan secara genotip mendeteksi gen tetA dari sampel hati ayam broiler di pasar Dukuh Kupang Surabaya. Sebanyak 30 sampel diambil kemudian dipreparasi secara aseptis dan steril. Isolasi pada media *Eosin Methilene Blue Agar* (EMBA), selanjutnya dilakukan pemeriksaan mikroskopis menggunakan pewarnaan gram dan uji biokimiawi *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA), *Sulfide Indol Motility* (SIM), *Methyl Red* (MR), *Voges Prouskauers* (VP), dan *Simons Citrat Agar* (SCA). Koloni *Escherichia coli* yang teridentifikasi dilakukan uji sensitifitas antibiotik dengan metode *Kirby bauer*, selanjutnya isolat yang terbukti resistan terhadap antibiotik tetrasiplin dilanjutkan pemeriksaan genetik dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Hasil penelitian menunjukkan bahwa 20 dari 30 sampel positif *Escherichia coli*. Isolat *Escherichia coli* asal sampel hati ayam menunjukkan resistansi terhadap antibiotik Tetrasiplin 30 µg sebesar 85 % (17 dari 20 sampel). Peneliti juga melakukan perbandingan dengan antibiotik lainnya, resistensi tertinggi pada antibiotik ampisilin 10 µg sebesar 90 % (18 dari 20 sampel), resistensi gentamisin 10 µg sebesar 50 % (10

dari 20 sampel) dan resistensi antibiotik kloramfenikol 30 µg sebesar 30 % (6 dari 20 sampel). Isolat yang resisten terhadap tetrasiplin dikonfirmasi dengan Polymerase Chain Reaction untuk mendeteksi gen *tetA* dengan produk akhir berupa *band* dengan panjang 210 bp. Isolat bakteri yang resistan terhadap antibiotik Tetrasiplin tidak selalu menunjukkan ekspresi gen *tetA* pada uji PCR.

Kata kunci: *Escherichia coli*; Gen TetA; Pasar; Resistansi Antibiotik.

PENDAHULUAN

Resistansi antibiotik menjadi salah satu masalah kesehatan masyarakat terbesar di berbagai negara. Penggunaan antibiotik yang tidak tepat menjadi faktor paling penting dalam mendorong penyebaran mikroorganisme yang resistan terhadap antibiotik baik dalam kedokteran hewan maupun manusia (Sarker et al., 2019). Pemberian antibiotik secara terus menerus untuk pengobatan dan pakan aditif dalam jangka waktu yang lama dapat mengembangkan gen resistansi baru yang dapat disebarluaskan antar populasi bakteri (Ibrahim et al., 2019).

Frekuensi resistansi antimikroba pada pathogen yang berasal dari bahan makanan asal hewan mengalami peningkatan, khususnya bakteri *Escherichia coli*. Bakteri tersebut merupakan pathogen penting pada ayam broiler, karena genus dari famili enterobactericeae ini merupakan bakteri komensal di usus manusia dan hewan dan menjadi sumber kontaminan feses pada makanan (Chuppava et al., 2019).

Resistansi dapat ditularkan ke manusia melalui konsumsi produk unggas yang terkontaminasi bakteri dan penggunaan antibiotik yang sama dalam pengobatan penyakit infeksi pada manusia maupun penyakit unggas (Bakhshi et al., 2017). Penggunaan agen antimikroba untuk tujuan pengobatan yang tidak tepat merupakan penyebab penularan strain yang resistan terhadap antibiotik dan penyakit menjadi sangat sulit diobati dengan antibiotik yang biasa digunakan (Hizlisoy et al., 2017).

Tetrasiplin merupakan salah satu antibiotik yang paling umum digunakan dalam industri perunggasan dalam pencegahan maupun pengobatan kolibacilosis unggas (Jaoudeh et al.,). Mekanisme utama terjadinya resistansi tetrasiplin pada bakteri golongan Enterobacteriaceae yaitu akuisisi gen *Tet* yang

menghasilkan protein baru yang terkait dengan plasmid dan transposon (Karami et al., 2006).

Permasalahan resistansi antibiotik pada industri perunggasan cukup memprihatinkan dan *World Health Organization* (WHO) telah melarang penggunaan antibiotik pada ternak sebagai *growth promotor*. Oleh karena itu penelitian ini penting untuk dilakukan untuk mengetahui resistansi antibiotik dan gen penyandi resistensi tetrasiplin dari sampel ayam di pasar Dukuh Kupang Surabaya.

MATERI DAN METODE

PREPARASI SAMPEL, ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI

Sampel hati ayam yang diambil dari pasar Dukuh Kupang Surabaya ditempatkan pada plastik steril dan dibawa menggunakan *coolbox*. Sampel dipreparasi dan disterilisasi permukaannya menggunakan spatel kemudian dilakukan isolasi bakteri dengan metode streak pada media *Eosin Methilen Blue Agar* (EMBA). Pemeriksaan morfologi sel bakteri secara mikroskopis dilakukan dengan pewarnaan gram, diawali dengan pembuatan preparat bakteri kemudian diberikan zat warna secara berurutan kristal violet, lugol, alkohol aseton dan safranin. Hasil diamati dibawah mikroskop menggunakan pembesaran 1000 X dengan menggunakan minyak emersi. Tahap selanjutnya dilakukan identifikasi dengan melakukan uji biokimia pada media *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA), *Sulfide Indol Motility* (SIM), *Methyl Red* (MR), *Voges Proskauer* (VP) dan media *Simons Citrate Agar* (SCA). Semua media yang digunakan untuk Isolasi dan identifikasi menggunakan merek OXOID®

PENGUJIAN SENSITIVITAS ANTIBIOTIK

Pengujian sensitivitas antibakteri menggunakan metode *Kirby Bauer*. Tahap pertama diambil biakan murni dari media EMBA, tahap berikutnya dibuat suspensi

bakteri dengan mengambil kurang lebih 10 koloni bakteri dan dilarutkan dalam lima mililiter *Phosphat Buffer Saline* (PBS) dan dihomogenkan dengan vortex, kemudian dibandingkan kekeruhannya dengan standart *Mc Farland* 0,5 (Setara dengan $1,5 \times 10^8$ CFU/ml). Suspensi bakteri yang kekeruhannya sudah sesuai selanjutnya diinokulasikan pada media *Mueller Hinton Agar* (MHA) sebanyak 0,1 ml dengan metode *Spread*. Cakram antibiotik disk Ampisilin 10 µg, Tetrasiklin 30 µg, Gentamisin 10 µg dan Kloramfenikol 30 µg ditempelkan pada media tersebut dengan cara ditekan selama 10 detik. Tahap akhir, media diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil uji sensitivitas dapat diamati dengan melakukan pengukuran zona hambat menggunakan jangka sorong atau penggaris dan dibaca sesuai dengan CLSI (*Clinical Laboratory Standard Institute*, 2018).

PENGUJIAN RESISTENSI SECARA GENETIK

Pengujian resistensi secara genetik dilakukan dengan menggunakan Teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*) untuk mendeteksi adanya gen *tetA*. Tahap awal yaitu ekstraksi DNA menggunakan dua µl *DNAzol® direct*, dilakukan penambahan ±1/2 koloni bakteri lalu didiamkan selama 15 menit. Larutan tersebut siap digunakan sebagai *DNA template*. Reagen untuk amplifikasi PCR terdiri dari *DNA template*, *Taq DNA polymerase*, *Gotaq PCR reaction buffer*, *PCR nucleotide mix* dan *primers*. Campuran reagen PCR tersebut kemudian dimasukkan dalam *thermocycler*, dengan suhu inkubasi awal 94°C selama lima menit diikuti dengan 34 siklus terdiri dari 94°C untuk denaturasi selama 25 detik, *annealing* pada 55°C selama 30 detik, elongasi 72°C selama 50 detik. Diikuti dengan ekstensi akhir pada 72°C selama lima menit (Zishiri *et al.*, 2016). Masing-masing tiga µl produk amplifikasi dicampur dengan tiga µl larutan *loading dye* kemudian dimasukkan dalam sumur gel agarosa 1,5% yang terendam dalam tanki yang berisi TE buffer, dimasukkan juga *marker* ke dalam sumur gel agarosa untuk mengetahui ukuran DNA produk PCR, kemudian elektroforesis dijalankan selama 40 menit dengan tegangan konstan 100 volt. Elektroforesis dihentikan dan gel diangkat

untuk diamati di bawah sinar Ultra Violet (UV) setelah 40 menit.

Hasil yang diperoleh berupa pola pita DNA (band DNA) dengan fragment size 210 bp. *Primer Forward* yang digunakan: GCTACATCCTGCTTGCCTTC. *Primer Reverse*: CATAGATGCCGTGAAGAGG (Zishiri *et al.*, 2016 ; Francesco *et al.*, 2021)

ANALISIS DATA

Data yang didapatkan dibuat dalam bentuk tabel dan prosentase kemudian dilakukan Analisa secara diskriptif

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil isolasi dan identifikasi bakteri *Escherichia coli* dari hati ayam terdeteksi sebanyak 20 dari 30 sampel positif *Escherichia coli*. Isolat *Escherichia coli* asal sampel hati ayam menunjukkan resistansi terhadap antibiotik tetrasiklin 30 µg sebesar 85 % (17 dari 20 sampel) Peneliti juga melakukan perbandingan dengan antibiotik lain, resistensi tertinggi pada antibiotik ampisilin 10 µg sebesar 90 % (18 dari 20 sampel), resistensi gentamisin 10 µg sebesar 50 % (10 dari 20 sampel) dan resistensi antibiotik kloramfenikol 30 µg sebesar 30 % (6 dari 20 sampel). Isolat yang resisten terhadap antibiotik tetrasiklin dikonfirmasi dengan PCR untuk mendeteksi gen *TetA*. Hasil menunjukkan bahwa 5,8 % atau satu dari 17 isolat mengekspresikan gen resistensi *TetA* dengan produk berupa band 210 basepair (**Gambar 3**).

Berdasarkan pemeriksaan morfologi koloni pada media EMBA, koloni *Escherichia coli* berbentuk bulat, permukaan mengkilat dan berwarna hijau metalik (**Gambar 1**). Kemampuan bakteri dalam menghasilkan asam yang tinggi akibat fermentasi laktosa membentuk precipitat *metallic sheen* kehijauan yang dihasilkan oleh *Escherichia coli* (Nuraini *et al.*, 2020). Morfologi sel secara mikroskopis berbentuk *coccobasil*, berwarna merah dan susunan menyebar, Hasil TSIA positif dengan reaksi asam/asam yang berarti bahwa bakteri mampu memfermentasi laktosa, sukrosa dan glukosa dan media TSIA terangkat ke atas membentuk retakan yang mengartikan bahwa bakteri membentuk gas, hasil uji SIM menunjukkan indol positif terdapat cincin

berwarna merah, bakteri motil dengan adanya pertumbuhan koloni yang menyebar di sekitar tusukan, hasil uji SCA negatif, hasil uji MR positif dan hasil uji VP negatif. Adanya bakteri *Escherichia coli* menunjukkan bahwa lingkungan sekitar kurang bersih dan terdapat

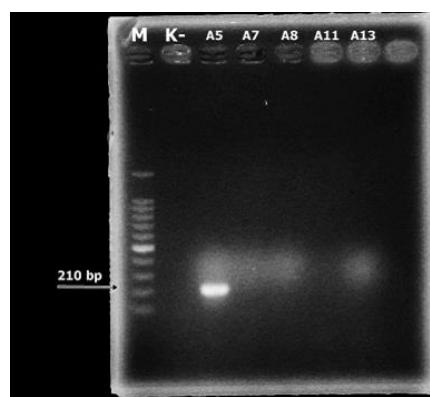
kontaminasi bakteri yang berasal dari feses. *Escherichia coli* menjadi indikator sanitasi lingkungan dan bakteri ini termasuk *Enterobacter* yang habitatnya pada saluran pencernaan (Putri et al., 2018)



Gambar 1. *Escherichia coli* on Eosin Methilen Blue Agar



Gambar 2. Hasil uji sensitivitas antibiotik



Gambar 3. Gen tetA 210 bp

Hasil uji sensitifitas antibiotik dihitung berdasarkan zona hambat yang terbentuk di sekitar antibiotik disk kemudian diukur dan dicocokkan dengan (CLSI, 2018) kemudian dikelompokkan ke dalam kategori Resistan,

Sensitif dan Intermediet (Gambar 2). Hasil prosentase pengujian sensitivitas antibiotik tertera pada Tabel 1.

Resistensi tertinggi yaitu pada antibiotik ampicillin 10 μ g dan Tetrasiklin 30 μ g, hasil

serupa pada penelitian lain juga menunjukkan resistensi tertinggi dari terdeteksi pada antibiotik Tetrasiklin sebesar 91,9 % dari isolat

Escherichia coli pada sampel swab kloaka dan daging broiler di daerah Dar es Salaam, Tanzania (Mgaya et al., 2021).

Tabel 1. Resistensi *Escherichia coli* terhadap beberapa antibiotik

	Ampisilin 10 µg	Tetrasiklin 30 µg	Gentamisin 10 µg	Kloramfenikol 30 µg
eSensitif	5% (1/20)	15% (3/20)	50% (10/20)	70% (14/20)
Intermediet	5% (1/20)	0% (0/20)	0% (0/20)	0% (0/20)
Resisten	90% (18/20)	85% (17/20)	50% (10/20)	30% (6/20)

Tetrasiklin dan sulfametoksazol adalah antibiotik umum yang diresepkan untuk perawatan unggas dan umumnya digunakan dengan aditif pakan dan kadang-kadang sebagai promotor pertumbuhan (Sarker et al., 2019). Hasil penelitian pada ayam komersial di kabupaten Blitar juga menunjukkan prevalensi *multidrug resistance* yang cukup tinggi sebesar 72,5 % (Wibisono et al., 2020).

Gen tetA dan tetB paling umum bertanggung jawab terhadap resistensi Tetrasiklin, penelitian tahun 2010 - 2011 menunjukkan gen resistensi tertinggi yaitu pada gen tetA (Skočková et al., 2012). Gen tetA memiliki kemampuan menyebar secara bebas pada hewan ternak daripada gen tetB, sehingga dapat disimpulkan bahwa gen tetA dapat menyebar lebih mudah di lingkungan daripada gen tetB, sedangkan gen tetC dan tetD terletak pada *conjugative plasmid* dari kelompok kompatibilitas yang berbeda dengan gen tetA, gen tetE terletak pada kromosom sehingga tidak mudah menyebar dengan yang lainnya (Olowe et al., 2013)

Isolat bakteri yang resisten terhadap antibiotik Tetrasiklin tidak selalu menunjukkan ekspresi gen tetA pada uji PCR. Beberapa isolat *Escherichia coli* tidak mengekspresikan gen resistensi TetA dikarenakan isolat mengandung gen resistensi lain seperti Tet B, TetC atau kemungkinan mengalami mekanisme resistensi lainnya (Zhang et al., 2012). Bakteri memperoleh resistensi terhadap tetrasiklin, mulai dari *efflux*, modifikasi obat dan terjadinya mutasi. Terdapat banyak ulasan mengenai mekanisme resistensi tetrasiklin. Salah satunya, mekanisme bawaan dari beberapa bakteri yang secara alami lebih tahan terhadap tetrasiklin karena perbedaan permeabilitas membran sel. Misalnya, bakteri Gram-negatif secara alami

resisten terhadap beberapa antibiotik karena adanya lipopolisakarida pada bagian dinding sel (Nguyen et al., 2014).

Penelitian yang dilakukan oleh Jahantigh et al., (2020) juga menunjukkan bahwa semua isolat memiliki gen resistensi yang berbeda, prevalensi gen tetA sebesar 96,7%, gen tetB 38,3 %, gen tetC 31,7 % dan gen tetD 8,3 %. Skočková et al., (2012) juga menyatakan bahwa dalam isolat yang resisten secara fenotip dapat menunjukkan hasil yang negatif terhadap salah satu gen tet, resistensi tetrasiklin dapat dikodekan oleh gen lain yang tidak dideteksi dalam penelitian.

KESIMPULAN

Masih banyak ditemukan isolat bakteri yang resisten terhadap antibiotik secara fenotip, resistensi terbesar pada antibiotik Ampicillin 10 µg (90 %) dilanjutkan dengan antibiotik Tetrasiklin 30 µg yang mengalami resistensi sebesar (85 %). Hasil uji gen Tet A berupa band pada 210 basepair. Isolat bakteri yang resisten terhadap antibiotik Tetrasiklin tidak selalu menunjukkan ekspresi gen *TetA* pada uji PCR.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih kami sampaikan kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat (LPPM) Universitas Wijaya Kusuma Surabaya yang telah memberikan kesempatan dan dana hibah internal untuk melaksanakan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Bakhshi M, Fatahi Bafghi M, Astani A, Ranjbar VR, Zandi H, and Vakili M. 2017. Antimicrobial resistance pattern of *Escherichia coli* isolated from chickens

- with colibacillosis in Yazd, Iran. *Journal of Food Quality and Hazards Control*, 4(3), 74–78.
- Chuppava B, Keller B, Abd El-Wahab A, Sürie C, and Visscher C. 2019. Resistance Reservoirs and Multi-Drug Resistance of Commensal Escherichia coli From Excreta and Manure Isolated in Broiler Houses With Different Flooring Designs. *Frontiers in Microbiology*, 10(November), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02633>
- CLSI. 2018. M100. In *The Encyclopedia of Astronomy and Astrophysics*. <https://doi.org/10.1888/0333750888/6100>
- Di Francesco A, Salvatore D, Sakhria S, Catelli E, Lupini C, Abbassi MS, Bessoussa G, Ben Yahia S, and Ben Chehida N. 2021. High frequency and diversity of tetracycline resistance genes in the microbiota of broiler chickens in Tunisia. *Animals*, 11(2), 1–7. <https://doi.org/10.3390/ani11020377>
- Hizlisoy H, Al S, Ertaş Onmaz N, Yıldırım Y, Gönülalan Z, and Gümüşsoy KS. 2017. Antimicrobial resistance profiles and virulence factors of Escherichia coli O157 collected from a poultry processing plant. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 41(1), 65–71. <https://doi.org/10.3906/vet-1602-22>
- Ibrahim RA, Cryer TL, Lafi SQ, Basha EA, Good L, and Tarazi YH. 2019. Identification of Escherichia coli from broiler chickens in Jordan, their antimicrobial resistance, gene characterization and the associated risk factors. *BMC Veterinary Research*, 15(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1901-1>
- Jahantigh M, Samadi K, Dizaji RE, and Salari S. 2020. Antimicrobial resistance and prevalence of tetracycline resistance genes in Escherichia coli isolated from lesions of colibacillosis in broiler chickens in Sistan, Iran. *BMC Veterinary Research*, 16(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02488-z>
- Karami N, Nowrouzian F, Adlerberth I, and Wold AE. 2006. Tetracycline Resistance in Escherichia coli and Persistence in the Infantile Colonic Microbiota. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(1), 156–161. <https://doi.org/10.3109/9780203997352.251>
- Mgaya FX, Matee MI, Muhairwa AP, and Hoza AS. 2021. Occurrence of multidrug resistant escherichia coli in raw meat and cloaca swabs in poultry processed in slaughter slabs in Dar Es Salaam, Tanzania. *Antibiotics*, 10(4), 0–9. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10040343>
- Nguyen F, Starosta AL, Arenz S, Sohmen D, Dönhöfer A, and Wilson DN. 2014. Tetracycline antibiotics and resistance mechanisms. *Biological Chemistry*, 395(5), 559–575. <https://doi.org/10.1515/hsz-2013-0292>
- Nuraini DM, Andityas M, Paramarta A, Najib NR, and Wijayanti AD. 2020. Isolasi dan identifikasi Escherichia coli dari Sumber Air Minum Kandang Broiler serta Uji Aktivitas Antibakteri Lidah Buaya. *Jurnal Ilmu Peternakan Dan Veteriner Tropis (Journal of Tropical Animal and Veterinary Science)*, 10(2), 106. <https://doi.org/10.46549/jipvet.v10i2.116>
- Olowe OA, Idris OJ, and Taiwo SS. 2013. Prevalence of TET genes mediating tetracycline resistance in Escherichia coli clinical isolates in Osun State, Nigeria. *European Journal of Microbiology and Immunology*, 3(2), 135–140. <https://doi.org/10.1556/eujmi.3.2013.2.7>
- Putri AR, Suswati E, and Indreswari L. 2018. Resistensi Eschericia coli Dari Isolat Daging Ayam Broiler Terhadap Tetrasiklin Tetracycline Resistant Eschericia coli From Broiler Chicken Meat Isolate 1. *Journal of Agromedicine and Medical Sciences*, 4(1), 38–44.
- Sarker MS, Mannan MS, Ali MY, Bayzid M, Ahad A, and Bupasha ZB. 2019. Antibiotic resistance of Escherichia coli isolated from broilers sold at live bird markets in Chattogram, Bangladesh. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, 6(3), 272–277. <https://doi.org/10.5455/javar.2019.f344>
- Skočková A, Cupáková Š, Karpíšková R, and Janštová B. 2012. Detection of Tetracycline Resistance Genes in Escherichia coli. *Lournal of Microbiology, Biotechnology*

- and Food Sciences, 1, 777–784.
- Wibisono FJ, Sumiarto B, Untari T, Effendi MH, Permatasari DA, and Witaningrum AM. 2020. Prevalence and Risk Factors Analysis of Multidrug Resistance of Escherichia coli Bacteria in Commercial Chicken, Blitar District. *Jurnal Ilmu Peternakan Dan Veteriner Tropis (Journal of Tropical Animal and Veterinary Science)*, 10(1), 15.
- Zhang T, Wang CG, Lv JC, Wang RS, and Zhong XH. 2012. Survey on tetracycline resistance and antibiotic-resistant genotype of avian Escherichia coli in North China. *Poultry Science*, 91(11), 2774–2777. <https://doi.org/10.3382/ps.2012-02453>
- Zishiri OT, Mkhize N, and Mukaratiwa S. 2016. Prevalence of virulence and antimicrobial resistance genes in *Salmonella* spp. isolated from commercial chickens and human clinical isolates from south Africa and Brazil. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 83(1), 1–11. <https://doi.org/10.4102/ojvr.v83i1.1067>