

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JATAÍ (UFJ)
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS (ICA)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL (PPGBA)

BÁRBARA ELISA BASÍLIO DE OLIVEIRA

**RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM ESTAFILOCOCOS
ISOLADOS DO LEITE DE VACAS SAUDÁVEIS E COM
MASTITE**

JATAÍ
2024

BÁRBARA ELISA BASÍLIO DE OLIVEIRA

**RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM ESTAFILOCOCOS
ISOLADOS DO LEITE DE VACAS SAUDÁVEIS E COM
MASTITE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Jataí (UFJ), como requisito para obtenção do título de Mestre em Biociência Animal.

Área de concentração: Saúde e Produção Animal

Linha de pesquisa: Saúde Humana, Animal e Ambiental

Orientador: Prof. Dr. Ariel Eurides Stella.

JATAÍ
2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFJ.

Oliveira, Bárbara Elisa Basílio de
Resistência Antimicrobiana em Estafilococos Isolados do Leite de Vacas Saudáveis e com Mastite / Bárbara Elisa Basílio de Oliveira. - 2024.
XLV, 45 f.

Orientador: Prof. Dr. Ariel Eurides Stella.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Jataí, Instituto de Ciências Agrárias, Jataí, Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Jataí, 2024.
Bibliografia. Anexos. Apêndice.
Inclui abreviaturas, gráfico, tabelas.

1. Antibiograma. 2. concentração inibitória mínima. 3. glândula mamária. 4. bovinos. 5. teste de suscetibilidade. I. Stella, Ariel Eurides, orient. II. Título.

CDU 639.09



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JATAÍ

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata nº **09** da sessão de Defesa de Dissertação de Bárbara Elisa Basílio de Oliveira, que confere o título de Mestre em **Biociência Animal**, na área de concentração em **Saúde e Produção Animal**.

Aos **nove** dias do mês de **maio** do ano de dois mil **vinte e quatro**, a partir das **14** horas, realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação intitulada “Resistência Antimicrobiana em Estafilococos isolados do leite de vacas saudáveis e com mastite”. Os trabalhos foram instalados pelo Orientador, Professor Doutor **Ariel Eurides Stella** (UFJ/PPGBA) com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Professor Doutor **Dirceu Guilherme de Souza Ramos** (UFJ), membro titular interno; Professor Doutor **Eric Mateus Nascimento de Paula** (UNIFIMES), membro titular externo. Durante a arguição, os membros da banca **não fizeram** sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Dissertação, tendo sido a candidata aprovada pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo Professor Doutor **Ariel Eurides Stella** (UFJ/PPGBA), Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos **nove** dias do mês de **maio** do ano de dois mil e **vinte quatro**.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **ARIEL EURIDES STELLA, Orientador**, em 09/05/2024, às 15:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **DIRCEU GUILHERME DE SOUZA RAMOS, Professor do Magistério Superior**, em 09/05/2024, às 15:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eric Mateus Nascimento de Paula, Usuário Externo**, em 09/05/2024, às 15:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufj.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0281462** e o código CRC **41C17039**.

RESUMO

A mastite bovina é considerada um problema sanitário frequente entre os rebanhos leiteiros no mundo, causada, principalmente, por patógenos bacterianos. Seu tratamento e prevenção são responsáveis pela maioria dos antimicrobianos administrados a vacas leiteiras adultas. Uma vez que o uso de antibióticos em animais produtores de alimentos contribui para as pressões de seleção antimicrobiana, é necessário compreender o perfil de resistência dos microrganismos isolados desses animais. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a presença de estafilococos e suas características de resistência fenotípica em vacas saudáveis e com mastite. Logo, foram coletadas 78 amostras de leite em duas propriedades leiteiras no município de Jataí-GO, as quais foram selecionadas para cultivo e isolamento de estafilococos. As colônias características foram repicadas, identificadas bioquimicamente e submetidas a pesquisas de *Staphylococcus* Resistentes à Meticila (MRS), teste de suscetibilidade em disco e à Concentração Inibitória Mínima (MIC). No geral, foi identificada percentagens superiores a 90% de cepas *Staphylococcus* Coagulase Negativos (SCNs) em ambos grupos. Por outro lado, verificou-se mais *Staphylococcus* Coagulase Positivos (SCPs) no grupo doente (7/89) quando comparado ao sadio (4/88). Em relação aos testes de resistência fenotípica, foi verificado maior precisão na MIC, a qual identificou resistência em cepas consideradas sensíveis ao teste de disco difusão. Os estafilococos analisados pela técnica de disco difusão demonstraram-se sensíveis à sulfametoxazol-trimetoprim, clindamicina e ciprofloxacina (100%) e resistentes à oxacilina (93,18%) e penicilina (42,05%) em vacas saudáveis. Todavia, o grupo com mastite exibiu maior sensibilidade à gentamicina (98,88%) e resistência à penicilina (68,54%). Ao teste MIC, todos os isolados de SCPs apresentaram suscetibilidade à vancomicina (100%) e resistência à sulfametoxazol+trimetoprim (100%), em ambos os grupos. Identificou-se também suscetibilidade à penicilina e cefoxitina (100%) oriundos de vacas saudáveis. Ademais, a azitromicina e clindamicina exibiram maiores perfis de resistência em vacas saudáveis e doentes (63,64%). Ao todo, foi determinado percentagens de multirresistência (20,22%) e MRS (30,33%) em vacas doentes, enquanto apenas duas cepas mostraram-se multirresistentes e MRSs (2,27%) nos animais saudáveis. Esses resultados mostram que a disseminação de espécies bacterianas resistentes é uma realidade e confirmam a importância de um monitoramento regular de outras cepas além do *Staphylococcus aureus*.

Palavras-chaves: antibiograma, concentração inibitória mínima, glândula mamária, bovinos, testes de suscetibilidade

ABSTRACT:

Bovine mastitis is considered a frequent health problem among dairy herds around the world, caused mainly by bacterial pathogens. Its treatment and prevention are responsible for the majority of antimicrobials administered to adult dairy cows. Since the use of antibiotics in food-producing animals contributes to antimicrobial selection pressures, it is necessary to understand the resistance profile of microorganisms isolated from these animals. Therefore, the objective of the present study was to evaluate the presence of staphylococci and their phenotypic resistance characteristics in healthy cows and those with mastitis. Therefore, 78 milk samples were collected from two dairy farms in the municipality of Jataí-GO, which were selected for cultivation and isolation of staphylococci. The characteristic colonies were picked, biochemically identified and subjected to Methicillin-Resistant Staphylococci (MRS) research, disk susceptibility testing and Minimum Inhibitory Concentration (MIC). Overall, percentages greater than 90% of Coagulase Negative *Staphylococcus* (SCNs) strains were identified in both groups. On the other hand, there were more Coagulase Positive *Staphylococcus* (SCPs) in the mastitis group (7/89) when compared to the healthy group (4/88). In relation to phenotypic resistance tests, greater precision was observed in the MIC, which identified resistance in strains considered sensitive to the disk diffusion test. The staphylococci analyzed by the disk diffusion technique proved to be sensitive to sulfamethoxazole-trimethoprim, clindamycin and ciprofloxacin (100%) and resistant to oxacillin (93.18%) and penicillin (42.05%) in healthy cows. However, the mastitis group exhibited greater sensitivity to gentamicin (98.88%) and resistance to penicillin (68.54%). In the MIC test, all SCPs isolates showed susceptibility to vancomycin (100%) and resistance to sulfamethoxazole+trimethoprim (100%), in both groups. Susceptibility to penicillin and cefoxitin (100% both) from healthy cows was also identified. Furthermore, azithromycin and clindamycin exhibited higher resistance profiles in healthy and sick cows (63.64%). In total, percentages of multidrug resistance (20.22%) and MRS (30.33%) were determined in sick cows, while only two strains were shown to be multidrug resistant and MRSs (2.27% both) in healthy animals. These results show that the spread of resistant bacterial species is a reality and confirm the importance of regular monitoring of strains other than *Staphylococcus aureus*.

Keyword: antibiogram, minimum inhibitory concentration, mammary gland, cattle, susceptibility tests

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	VII
CAPÍTULO 1	1
INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO 2	6
ABSTRACT	6
RESUMO	7
1. INTRODUÇÃO	8
2. MATERIAIS E MÉTODOS	8
2.1. Coleta e Isolamento.....	8
2.2. Teste de Suscetibilidade em Disco:.....	9
2.3. Teste de Concentração Inibitória Mínima (MIC):	10
2.4. Testes Meticilina Resistente (MRS):.....	11
2.5. Análise Estatística	11
3. RESULTADOS	12
3.1. Amostras:	12
3.2. Testes Meticilina Resistente (MRS):.....	12
3.3. Teste de Suscetibilidade em Disco:.....	13
3.4. Teste da Concentração Inibitória Mínima (MIC):	15
4. DISCUSSÃO	16
5. CONCLUSÃO	21
6. REFERÊNCIAS	
7. ANEXOS	
8. APÊNDICES	

LISTA DE ABREVIATURAS

µL	Microlitros;
µg	Microgramas;
mL	Mililitros;
°C	Graus Celsius;
Azi	Azitromicina;
CCS	Contagem de Células Somáticas;
Cef	Cefoxitina;
Clind	Clindamicina;
Cip	Ciprofloxacina;
CLSI	Clinical & Laboratory Standards Institute;
Gen	Gentamicina;
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística;
IMI	Infecção Intramamária;
MDR	Resistência a Múltiplas Drogas;
MIC	Concentração Inibitória Mínima;
MRS	<i>Staphylococcus</i> Meticilina Resistente;
Oxa	Oxacilina;
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase;
Pen	Penicilina;
Rpm	Rotações por minuto;
SCP	<i>Staphylococcus</i> Coagulase Positivo;
SCN	<i>Staphylococcus</i> Coagulase Negativo;
Sult	Sulfametoxazol-Trimetoprim;
Van	Vancomicina;
UI	Unidades Internacionais.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

De acordo com a Embrapa (2022), a cadeia produtiva do leite tem grande importância econômica para o Brasil. Além disso, o país representa um dos maiores produtores mundiais de leite, com uma produção que registrou, em 2022, valor acima de 34 bilhões de litros, de acordo com os dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE).

Mesmo com essa alta produção, o Brasil ainda enfrenta muitos problemas na pecuária leiteira. Apesar de haver políticas públicas voltadas para esse setor, o produtor se defronta com a dificuldade para a expansão da produção, uma vez que os preços de custos são oscilantes, o que gera margens instáveis. Esse fato contribui com o atraso tecnológico da atividade leiteira e por muitos produtores desistirem desse mercado (Embrapa, 2022).

Entre os custos na indústria leiteira, a mastite é considerada um problema sanitário frequentemente observado, por se tratar de uma doença endêmica e dispensiosa entre os rebanhos leiteiros no mundo (Halasa et al., 2007; Ruegg, 2017).

A mastite é definida como uma inflamação que afeta as glândulas mamárias, resultante da entrada e multiplicação de microrganismos patogênicos na glândula (Oliver & Murinda, 2012; Moritz & Moritz, 2016). É uma doença multifatorial e deriva principalmente de patógenos comuns no úbere, como estafilococos, estreptococos e espécies coliformes (Simões & Oliveira, 2012; Ruegg, 2017).

As bactérias causadoras podem ser classificadas em dois grupos, conforme o modo de transmissão. O grupo dos patógenos contagiosos ou primários incluem microrganismos bem adaptados à sobrevivência no úbere e são transferidos entre as vacas, principalmente, durante a ordenha. Já o grupo dos patógenos ambientais ou secundários abrange bactérias presentes no ambiente em que a vaca se aloja e a transmissão normalmente ocorre no intervalo entre as ordenhas (Brito et al., 2007; Simões & Oliveira, 2012; Heikkilä et al., 2018).

Por outro lado, de acordo com a manifestação clínica da doença, a mastite pode ser dividida em clínica e subclínica. Na forma clínica, o animal apresenta sinais evidentes da doença, como edema ou dor no úbere, presença de pus,

grumos e outras alterações nas características físicas do leite, aumento na contagem de células somáticas (CCS), além de pode ser acompanhada por sinais sistêmicos, como hipertermia, letargia ou anorexia. Já a mastite subclínica é caracterizada principalmente pela redução na produção do leite, alteração na composição com a presença de componentes inflamatórios e bactérias, além do aumento da CCS (Heringstad et. al., 2000; Brito et al., 2007; Ruegg, 2017).

Outro aspecto relevante é a terapia da vaca seca, o qual é considerado um dos procedimentos mais utilizados para o controle da mastite subclínica. Tal procedimento consiste no tratamento de todas as vacas ao final da lactação e tem por objetivo eliminar as infecções subclínicas existentes e prevenir as infecções de ocorrência comum no início do período seco. A depender do agente causador da mastite, esse tratamento ser mostrar efetivo. Assim, é muito eficiente para microrganismos contagiosos e pouco eficiente para microrganismos ambientais (Brito et al., 2007; Ruegg, 2017).

Além disso, é importante evitar que as vacas secas fiquem expostas a ambientes sujos e úmidos, principalmente no período próximo ao parto, quando estão sob estresse e maiores riscos de infecção. Normalmente, quando o programa de terapia da vaca seca não é eficaz, as causas de insucesso nos procedimentos de aplicação de antibióticos e/ou manejo inadequado das vacas durante o período seco e parição (Brito et al., 2007).

Em geral, essa doença culmina em uma perda substancial na produção de leite, alterações nos níveis de componentes físico-químicos específicos do leite e presença de componentes inflamatórios, reduzindo a qualidade geral do produto e levando ao aumento da contagem de células somáticas (CCS). Nesse contexto, além da CCS e da contagem bacteriana, a maioria dos sistemas de pagamento de leite testa a presença de resíduos de antibióticos (Heringstad et. al., 2000; Halasa et al., 2007).

Destaca-se, ainda, que há cada vez mais informações microbiológicas e clínicas sobre bactérias e genes, incluindo aqueles relativos à resistência, que podem passar entre os ecossistemas humanos e animais, resultando em infecções mais difíceis de tratar (Reygaert, 2018). Portanto, uma vez que as bactérias poderem atuar como reservatórios de genes de resistência antimicrobiana, é imprescindível o monitoramento desses microrganismos.

No que diz respeito à resistência antimicrobiana, esta pode ser intrínseca

ou adquirida. A primeira, também chamada de natural, pode ser inata quando for sempre expressa na espécie bacteriana e independente da exposição prévia a antibióticos, de forma a não estar relacionada à transferência horizontal de genes; ou mediada, quando os genes estão normalmente presentes nas bactérias, mas só são expressos em níveis de resistência após exposição a um antibiótico (Reygaert, 2018; FDA, 2022).

Por outro lado, a resistência adquirida pode ocorrer através de vários mecanismos diferentes. Dessa forma, pode ser o resultado de mutações em seu próprio DNA cromossômico que conferem às bactérias a capacidade de impedir que um medicamento se ligue ao seu alvo, a aquisição de enzimas que inativam o medicamento e bombas de efluxo dependentes de energia que expõem antimicrobianos das células bacterianas. Muitos desses mecanismos estão associados a elementos móveis de DNA, como plasmídeos que são transferidos entre bactérias da mesma espécie ou de espécies diferentes (Uddin et al., 2021; FDA, 2022).

Além disso, os mecanismos de resistência antimicrobiana enquadram-se em quatro categorias principais: limitação da absorção de um medicamento; modificação de um alvo do medicamento; inativação do medicamento; efluxo de droga ativa. Vale ressaltar que a resistência intrínseca pode ser realizada através da limitação da absorção, da inativação e efluxo de medicamentos; enquanto os mecanismos de resistência adquiridos utilizados podem ser a modificação do alvo do medicamento, inativação do medicamento e efluxo do medicamento (Reygaert, 2018; Uddin et al., 2021).

Os antibióticos têm como alvo específico funções microbianas vitais. Cada classe pode atuar de maneira diferente para inibir as bactérias (Abushaheen et al., 2020). No que tange a investigação de cepas *Staphylococcus* resistentes, o *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2020) preconiza algumas classes de agentes antimicrobianos que devem ser testados, como os β -lactâmicos, glicopeptídeos, aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, macrolídeos, lincosamidas e sulfonamidas.

Acerca dos β -lactâmicos, estes são representados principalmente pela penicilina, amoxicilina, meticilina, cefoxitina e cefalexina. Seu mecanismo de ação envolve a ligação às proteínas de ligação à penicilina (PBPs), de forma a interromper o mecanismo de transpeptidação entre as cadeias de peptideoglicanos

e impedir a formação correta da parede celular bacteriana e, conseqüentemente, resulta na perda de viabilidade e lise dos microrganismos. Outrossim, o principal mecanismo de resistência bacteriana a esse grupo é através de mutações nas proteínas ligantes de penicilina ou da produção de enzimas β -lactamases, as quais agem degradando o anel β -lactâmico dos antibióticos (Ritter et al., 2020; Uddin et al., 2021).

Por outro lado, a vancomicina constitui o grupo dos glicopeptídeos e também tem como mecanismo de ação a inibição da síntese de peptidoglicanos da parede celular bacteriana, o que torna a célula vulnerável à pressão osmótica e à autólise. Apesar do mecanismo exato de resistência à vancomicina ser desconhecido, é provável que envolva alterações na parede celular de forma a produzir uma parede celular espessa que dificulta a entrada do medicamento na célula e proporciona uma resistência intermediária à vancomicina (Reygaert, 2018; CLSI, 2024).

Em relação aos aminoglicosídeos, seu mecanismo de ação consiste na inibição da síntese proteica bacteriana, ao se ligar à subunidade ribossômica 30S do RNA bacteriano. Os principais agentes são gentamicina, estreptomicina, tobramicina e neomicina. De forma similar, o grupo dos macrolídeos também atuam na síntese proteica dos microrganismos, contudo se ligam à subunidade ribossômica 50S do RNA bacteriano e são representados principalmente pela eritromicina, a claritromicina e a azitromicina. Igualmente aos macrolídeos, a clindamicina, descrita como uma lincosamida, se liga à subunidade 50S. Ademais, a resistência desses três grupos ocorre, sobretudo, através de mutações cromossômicas nesses ribossomos (Ritter et al., 2020; Uddin et al., 2021).

Não obstante, existem os agentes que inibem a síntese de ácido nucleico. São caracterizados principalmente pelo grupo das fluoroquinolonas, as quais agem inibindo a síntese de DNA bacteriana e englobam a ciprofloxacina, levofloxacina e norfloxacina. Vale ressaltar que, apesar da ciprofloxacina ser um antibiótico de amplo espectro eficaz contra organismos Gram-positivos e Gram-negativos e a mais utilizada do grupo, possui elevada incidência de resistência estafilocócica. Dessa forma, a ciprofloxacina deve ser evitada em infecções por *Staphylococcus aureus* Resistentes à Meticilina (MRSA) (Ritter et al., 2020; Uddin et al., 2021).

Por fim, outro grupo importante é o dos antimetabólitos ou inibidores competitivos de enzimas metabólicas bacterianas, constituídos essencialmente

pelas sulfonamidas (sulfametoxazol) e trimetoprim. Seu mecanismo de ação envolve a inibição das enzimas de síntese de ácido fólico. Como as sulfonamidas inibem um estágio diferente da mesma via metabólica bacteriana, elas podem potencializar a ação do trimetoprim ao inibirem dois estágios na biossíntese de ácidos nucleicos e proteínas bacterianas. Seu mecanismo de resistência é mediado por plasmídeos e resulta da síntese de uma enzima bacteriana insensível aos medicamentos (Reygaert, 2018; Ritter et al., 2020).

Apesar dessa gama ampla de mecanismos de ação dos antibióticos, não há um melhor controle sobre os microrganismos bacterianos, visto que a prescrição e administração inadequada de agentes antimicrobianos em humanos e animais contribuem com o desenvolvimento da resistência.

CAPÍTULO 2

Antimicrobial resistance in staphylococci isolated from the milk of healthy cows and those with mastitis

Resistência antimicrobiana em estafilococos isolados do leite de vacas saudáveis e com mastite

Bárbara Elisa Basílio de Oliveira¹, Ariel Eurides Stella²

¹Federal University of Jataí, Institute of Agricultural Sciences, Veterinary Microbiology Laboratory, Postgraduate Program in Animal Bioscience, Jataí – GO, Brazil, barbara.oliveira@discente.ufj.edu.br

²Federal University of Jataí, Veterinary Microbiology Laboratory, Postgraduate Program in Animal Bioscience, Jataí – GO, Brazil, ariel_stella@ufj.edu.br

ABSTRACT

Bovine mastitis is considered a frequent health problem among dairy herds around the world, caused mainly by bacterial pathogens. Its treatment and prevention are responsible for the majority of antimicrobials administered to adult dairy cows. Since the use of antibiotics in food-producing animals contributes to antimicrobial selection pressures, it is necessary to understand the resistance profile of microorganisms isolated from these animals. Therefore, the objective of the present study was to evaluate the presence of staphylococci and their phenotypic resistance characteristics in healthy and sick cows. Therefore, 78 milk samples were collected from two dairy farms in the municipality of Jataí-GO, which were selected for cultivation and isolation of staphylococci. The characteristic colonies were picked, biochemically identified and subjected to MRS research, disk susceptibility testing and MIC. Overall, a greater number of SCNs strains were identified in both groups. On the other hand, there were more SCPs in the sick group (7/89) when compared to the healthy group (4/88). In relation to phenotypic resistance tests, greater precision was observed in the MIC, which identified resistance in strains considered sensitive to the disk diffusion test. Staphylococci analyzed by the disk diffusion technique proved to be sensitive to Sulfamethoxazole-Trimethoprim, Clindamycin and Ciprofloxacin (100%) and resistant to Oxacillin (93.18%) and Penicillin (42.05%) in healthy cows. However, the group with mastitis exhibited higher rates of sensitivity to Gentamicin (98.88%) and resistance to Penicillin (68.54%). In the MIC test, all SCPs isolates showed susceptibility to Vancomycin (100%) and resistance to Sulfamethoxazole+Trimethoprim (100%), in both groups. Susceptibility to Penicillin and Cefoxitin (100% both) from healthy cows was also identified. Furthermore, Azithromycin and Clindamycin exhibited higher resistance profiles in healthy and sick cows (63.64%). In total, percentages of multidrug resistance (20.22%) and MRS (30.33%) were determined in sick cows, while only two strains were shown to be multidrug resistant and MRSs (2.27% both) in healthy animals. These results show that the spread of resistant bacterial species is a reality and confirm the importance of regular monitoring of strains other than *Staphylococcus aureus*.

Keyword: antibiogram, minimum inhibitory concentration, mammary gland, cattle, susceptibility tests

RESUMO

A mastite bovina é considerada um problema sanitário frequente entre os rebanhos leiteiros no mundo, causada, principalmente, por patógenos bacterianos. Seu tratamento e prevenção são responsáveis pela maioria dos antimicrobianos administrados a vacas leiteiras adultas. Uma vez que o uso de antibióticos em animais produtores de alimentos contribui para as pressões de seleção antimicrobiana, é necessário compreender o perfil de resistência dos microrganismos isolados desses animais. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a presença de estafilococos e suas características de resistência fenotípica em vacas saudáveis e com mastite. Logo, foram coletadas 78 amostras de leite em duas propriedades leiteiras no município de Jataí-GO, as quais foram selecionadas para cultivo e isolamento de estafilococos. As colônias características foram repicadas, identificadas bioquimicamente e submetidas a pesquisas de *Staphylococcus* Resistentes à Meticila (MRS), teste de suscetibilidade em disco e à Concentração Inibitória Mínima (MIC). No geral, foi identificada percentagens superiores a 90% de cepas *Staphylococcus* Coagulase Negativos (SCNs) em ambos grupos. Por outro lado, verificou-se mais *Staphylococcus* Coagulase Positivos (SCPs) no grupo doente (7/89) quando comparado ao sadio (4/88). Em relação aos testes de resistência fenotípica, foi verificada maior precisão na MIC, a qual identificou resistência em cepas consideradas sensíveis ao teste de disco difusão. Os estafilococos analisados pela técnica de disco difusão demonstraram-se sensíveis à sulfametoxazol-trimetoprim, clindamicina e ciprofloxacina (100%) e resistentes à oxacilina (93,18%) e penicilina (42,05%) em vacas saudáveis. Todavia, o grupo com mastite exibiu maior sensibilidade à gentamicina (98,88%) e resistência à penicilina (68,54%). Ao teste MIC, todos os isolados de SCPs apresentaram suscetibilidade à vancomicina (100%) e resistência à sulfametoxazol+trimetoprim (100%), em ambos os grupos. Identificou-se também suscetibilidade à penicilina e cefoxitina (100%) oriundos de vacas saudáveis. Ademais, a azitromicina e clindamicina exibiram maiores perfis de resistência em vacas saudáveis e doentes (63,64%). Ao todo, foi determinado percentagens de multirresistência (20,22%) e MRS (30,33%) em vacas doentes, enquanto apenas duas cepas mostraram-se multirresistentes e MRSs (2,27%) nos animais saudáveis. Esses resultados mostram que a disseminação de espécies bacterianas resistentes é uma realidade e confirmam a importância de um monitoramento regular de outras cepas além do *Staphylococcus aureus*.

Palavras-chaves: antibiograma, concentração inibitória mínima, glândula mamária, bovinos, testes de suscetibilidade

1. INTRODUÇÃO

Apesar da cadeia produtiva do leite ter grande importância econômica para o Brasil, há muitos custos que prejudicam esse setor. Entre eles, a mastite é considerada um problema sanitário frequente, por se tratar de uma doença endêmica e dispendiosa entre os rebanhos leiteiros no mundo (Ruegg, 2017).

Além disso, a mastite constitui uma ameaça à saúde pública devido à veiculação de patógenos, como os estafilococos, e suas toxinas; ou pela presença de resíduos de antibióticos no leite cru (Heikkilä et al., 2018; FDA, 2022). Outro aspecto importante é que as bactérias atuam como reservatórios de genes de resistência antimicrobiana, sendo, portanto, fundamental a vigilância da resistência desses microrganismos para a saúde e o bem-estar animal e humano.

No que diz respeito aos perfis de resistência das cepas envolvidas, estas podem ser variáveis entre rebanhos de diferentes fazendas e ao longo do tempo. Ademais, o local da infecção intramamária (IMI), o aspecto clínico dessas diferentes formas da doença, as características de virulência e as capacidades imunogênicas diferem entre os patógenos (Ruegg, 2017).

Diante do cenário atual da pecuária de leite brasileira, torna-se essencial viabilizar soluções para a sustentabilidade da cadeia produtiva do leite. De modo a promover conhecimentos sobre os principais agentes envolvidos na mastite bovina e o seu perfil de sensibilidade às drogas antimicrobianas.

Uma vez que o uso de antimicrobianos em animais produtores de alimentos contribui para as pressões de seleção antimicrobiana, é necessário conhecer o perfil de resistência dos isolados, visando a escolha mais adequada para as terapias. Assim, o objetivo do presente estudo é avaliar a presença de estafilococos e suas características de resistência fenotípica em vacas saudáveis e doentes.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Coleta e Isolamento

O estudo foi realizado durante o período de 2022 a 2023 em duas propriedades rurais no município de Jataí-GO. O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Jataí – UFJ, Protocolo N. 004/21.

As propriedades foram identificadas como Fazenda 1 e Fazenda 2. O sistema de produção da Fazenda 1 era do tipo *Free Stall* e com uma produção média de 27

litros/vaca/dia de leite. Já na Fazenda 2 os animais eram confinados em sistema de Extensivo e a produção média era de 12 litros/vaca/dia de leite. Ambas as propriedades possuíam animais da raça Girolando e as ordenhas eram automatizadas.

Previamente à coleta das amostras de leite, foi realizada a higienização dos tetos através do *pré-dipping*. As coletas (pool dos quatros tetos) foram divididas em dois grupos de vacas em lactação, um constituído por animais clinicamente saudáveis (38 coletas) e outro por animais doentes (40 coletas) diagnosticados através do teste de caneca de fundo escuro e sintomatologia clínica.

Após, as amostras foram acondicionadas em caixa de isopor a 4°C e levadas ao Laboratório de Microbiologia Veterinária, na Universidade Federal de Jataí (UFJ), para iniciar as análises microbiológicas. Para o isolamento dos Estafilococos, 0,05 mL de leite de cada amostra, previamente homogeneizada, foi semeada no ágar Manitol. As placas inoculadas foram incubadas por 24 horas a 35°C.

Foram repicadas 3 a 5 colônias características de cada placa e identificadas bioquimicamente através dos seguintes testes: coloração de Gram, prova da catalase, teste da oxidase e prova da coagulase. Por fim, todos os isolados foram estocados em Caldo Nutriente (500 µL) com 40% de glicerol (500 µL) a -40°C.

2.2. Teste de Suscetibilidade em Disco:

A avaliação da suscetibilidade dos isolados aos antimicrobianos foi determinada pela técnica de difusão em disco, de acordo com as normas do *Clinical & Laboratory Standards Institute CLSI/M100-S30* (2020). Para tal, os isolados de cultura-estoque foram semeados em Ágar Nutriente a 35°C por 24 horas, repicadas em tubos contendo 3 mL de caldo nutriente e incubadas a 35°C até atingirem o padrão de turbidez 0,5 de McFarland.

Em seguida, as culturas foram semeadas, com o auxílio de suabes estéreis, em placas contendo Ágar Mueller-Hinton. Após secagem da superfície do meio por aproximadamente 3 a 10 minutos, foram colocados os discos contendo o antimicrobiano e incubadas a 35°C por 18 horas para posterior leitura e interpretação dos resultados.

Conforme recomendado pelo CLSI (2024), foram testados os antimicrobianos penicilina 10UI (Pen), sulfametoxazol-trimetoprim 25µg (Sult), oxacilina 1 µg (Oxa), ciprofloxacina 5µg (Cip), clindamicina 2µg (Clind) e gentamicina 10µg (Gen), os quais são alguns dos agentes antimicrobianos indicados para testes primários e de rotina *in vitro* para cepas de estafilococos. As cepas foram considerados multirresistentes (MDRS) quando apresentaram resistência a três ou mais classes de antimicrobianos.

2.3. Teste de Concentração Inibitória Mínima (MIC):

Esse teste foi realizado nas 11 cepas coagulase positivas identificadas. A determinação da MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) dos antimicrobianos, frente a esses agentes *Staphylococcus* Coagulase Positivo (SCP) isolados, foi realizada pelo método da microdiluição em caldo Mueller-Hinton. Para tal, empregou-se microplacas de ELISA contendo 96 poços distribuídos em 12 colunas.

Os procedimentos de escolha dos antibióticos a serem testados, elaboração do método empregado, leitura e interpretação desse teste procedeu-se de acordo com as recomendações do CLSI/M07-A9 (2012) e CLSI/M100-A34 (2024). Assim, foram testados os antimicrobianos: azitromicina (Azi), cefoxitina (Cef), clindamicina (Clind), oxacilina (Oxa), penicilina (Pen), trimetoprima com sulfametoxazol (Sult) e vancomicina (Van).

Para preparar os antimicrobianos, foi realizado a pesagem de cada composto através do cálculo:

$$Peso (mg) = \frac{Volume (mL) \times Concentração (\mu g/mL)}{Potência (\mu g/mg)}$$

À vista disso, procedeu-se com a preparação da suspensão-inóculo ao semear os isolados da cultura-estoque em Ágar Nutriente a 35°C por 24 horas, repicar em tubos com 4 mL de Caldo Nutriente e, então, incubar a 35°C durante 6 horas, até atingirem o padrão de turvação 0,5 de McFarland.

Em cada poço da microplaca foi acrescentado 100 µL de caldo Mueller-Hinton. Após, 100 µL de antibiótico foi adicionado em todos os poços da coluna um da placa, de modo que cada antibiótico fosse incorporado em três linhas seguidas para formar a triplicata de um mesmo antibiótico para cada cepa. Por conta da diluição no caldo Mueller-Hinton, ocorrido em cada poço, as soluções de antimicrobiano foram preparadas em concentrações duas vezes da concentração final desejada.

Depois, procedeu-se com a diluição seriada, retirando 100 µL da coluna um (solução Mueller-Hinton + antibiótico) para a coluna dois e assim sucessivamente, até chegar na coluna dez, em que se fez a última diluição e descartou-se, posteriormente, 100 µL. Dessa maneira, atingiu-se diversas concentrações de um mesmo agente antimicrobiano. Por fim, foi acrescentado 10 µL da suspensão-inóculo do microrganismo nos poços da coluna onze à um.

Em todas as linhas da microplaca foram incluídas um poço de controle positivo de crescimento, com bactéria e sem o antimicrobiano; e um poço negativo, ou seja, sem bactéria nem antimicrobiano. Após a inoculação, as microplacas foram incubadas a 37 °C por 24

horas. Ademais, o reagente cloreto de trifeniltetrazólio-2,3,5 (TTC) a 0,125% foi utilizado para auxiliar na interpretação das placas, sendo acrescentado 20 µl em cada poço duas horas antes da leitura.

Passado o tempo, a leitura da placa iniciou-se pelos controles negativo e positivo, comparando-se as MIC obtidas às esperadas. Para a interpretação dos resultados, a MIC de cada bactéria avaliada foi definida a partir da identificação visual da menor concentração de antibiótico em que não foi verificada a ocorrência de turvação, o qual representaria um indício de crescimento bacteriano.

As soluções de agentes antimicrobianos foram preparadas de acordo com as recomendações de ponto de corte do CLSI (2024). O volume apropriado das soluções foi adicionado para se obterem as concentrações desejadas. Assim, a clindamicina e oxacilina iniciaram com a concentração de 16 µg/ml; a penicilina e sulfametoxazol com trimetoprim com 32 µg/ml; vancomicina e azitromicina com 64 µg/ml; e cefoxitina com 128 µg/ml.

2.4. Testes Meticilina Resistente (MRS):

Os procedimentos para a análise de *Staphylococcus* sp. resistente à metilina (MRS) foram realizados de acordo com as recomendações do CLSI/M100-S30 (2020). A técnica utilizada para o teste de metilina resistente através da difusão em disco ocorreu da mesma maneira que as instruções para o teste de suscetibilidade em disco, sendo testado o antimicrobiano cefoxitina 30µg (Cef). A leitura e interpretação dos resultados foram realizadas após 24 horas, conforme os padrões do CLSI (2020).

Também foi realizado a pesquisa de cepas resistentes à metilina pelo método da MIC nos *Staphylococcus* coagulase positivos, a qual foi efetuada conforme as recomendações para o teste MIC descritos acima e com o uso do antimicrobiano oxacilina.

2.5. Análise Estatística

Os perfis de resistência antimicrobiana obtidos nos diferentes testes fenotípicos foram tabulados, expressos em porcentagens e analisados de forma descritiva. Para a verificação dos percentuais obtidos nos testes empregados nas amostras considerou-se observações qualitativas (positivo e negativo) de acordo com os padrões fornecidos pelo CLSI/M100-S30 (2020). Além disso, foi calculada a correlação pelo teste de Qui-Quadrado (χ^2) para a presença de cepas resistentes de *Staphylococcus* spp. pelo teste de disco-difusão. Não foi efetuado o mesmo tipo de correlação para o teste de MIC, pois o número de repetições era menor, não possibilitando a realização do mesmo.

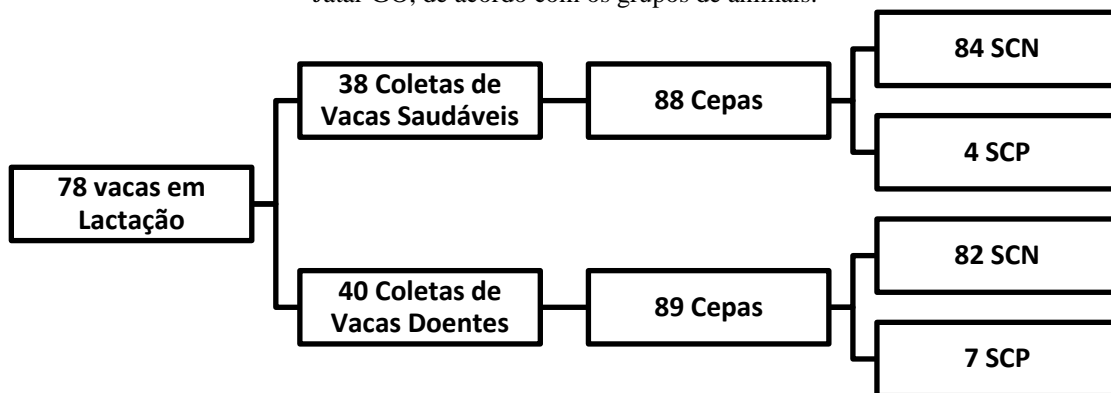
3. RESULTADOS

3.1. Amostras:

Após o isolamento e repique (3 a 5 colônias de cada amostra), obteve-se 88 isolados de *Estafilococos* do grupo de animais saudáveis e 89 isolados do grupo de animais doentes (Gráfico 1), totalizando 177. Os isolados analisados ao microscópio, após a coloração de Gram, que eram bastonetes e Gram-negativos foram descartados. Ademais, foram selecionados isolamentos positivos para o teste da catalase e negativo para o teste da oxidase.

Das 88 cepas do grupo de vacas saudáveis, 84 eram *Staphylococcus* Coagulase Negativa (SCN) e 4 cepas de *Staphylococcus* Coagulase Positiva (SCP). Enquanto isso, no grupo de animais doentes, observou-se 82 SCN e 7 cepas SCP.

Gráfico 1 – Distribuição dos *Estafilococos* oriundos das amostras de leite coletadas em granjas leiteiras de Jataí-GO, de acordo com os grupos de animais.



SCN: *Staphylococcus* coagulase negativo; SCP: *Staphylococcus* coagulase positivo.

3.2. Testes Meticilina Resistente (MRS):

No que diz respeito ao teste MRS, 26 cepas do grupo com mastite apresentaram-se resistentes à metilina no teste de disco-difusão. Destas, 24 eram SCN, ao passo que apenas 2 SCP se mostraram MRS. Em contrapartida, apenas uma amostra no grupo das vacas saudáveis foi resistente aos testes MRS, também representada pelo grupo de SCN. Por outro lado, por meio do método da MIC, 3 cepas SCP foram verificadas como MRSs oriunda de vacas doentes e 1 cepa do grupo saudável.

3.3. Teste de Suscetibilidade em Disco:

Os resultados dos testes de suscetibilidade foram compilados nos Apêndices 1 e 2. No grupo de vacas saudáveis, houve resistência em apenas três antibióticos, sendo a oxacilina em 82 cepas (93,18%), penicilina em 37 (42,05%) e gentamicina em 5 (5,68%), conforme apresentado na Tabela 1. Observou-se, também, 5 cepas sensíveis a todos os antibióticos testados.

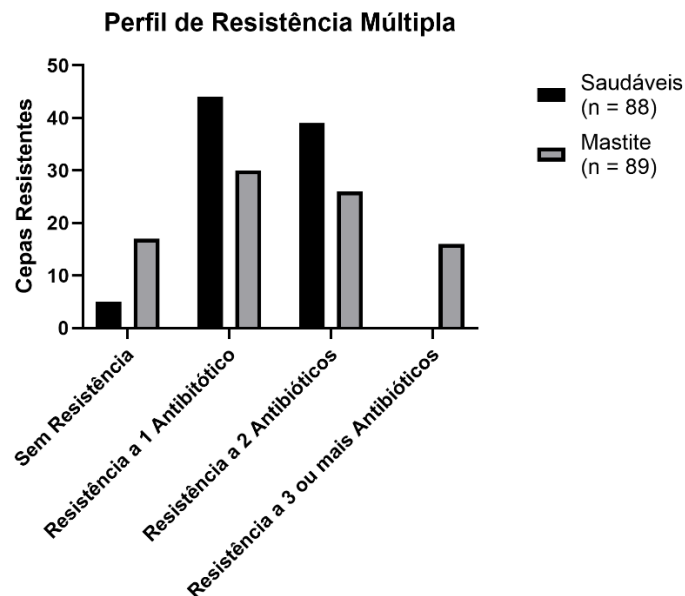
Tabela 1 - Perfil de resistência por disco-difusão em cepas de *Staphylococcus* spp isoladas do leite de vacas saudáveis e com mastite, em duas granjas leiteiras do município de Jataí-GO, 2023.

Antibióticos	Resistência - Mastite (n= 89)						Resistência - Saudáveis (n= 88)					
	SCP (n= 7)		SCN (n= 82)		Total Mastite		SCP (n= 4)		SCN (n= 84)		Total Saudável	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Pen	5	71,43	56	68,29	61	68,54	0	0	37	44,04	37	42,05
Oxa	2	28,57	36	43,90	38	42,70	3	75	79	94,04	82	93,18
Sult	3	42,86	16	19,51	19	21,35	0	0	0	0	0	0,00
Clind	2	28,57	9	10,98	11	12,36	0	0	0	0	0	0,00
Cip	2	28,57	3	3,66	5	5,62	0	0	0	0	0	0,00
Gen	0	0	1	1,22	1	1,12	2	50	3	3,57	5	5,68

SCP: *Staphylococcus* Coagulase Positivo; SCN: *Staphylococcus* Coagulase Negativo; Pen: Penicilina; Oxa: Oxacilina; Sult: Sulfametoxazol-Trimetoprima; Clind: Clindamicina; Cip: Ciprofloxacina; Gen: Gentamicina.

A interpretação do perfil de multirresistência foi apresentada no gráfico 2. Os resultados mostraram que a maior parte das cepas do grupo saudável (83 cepas) se mostraram resistentes a pelo menos uma classe de antibiótico e nenhuma apresentou multirresistência.

Gráfico 2 - Resistência múltipla de *Staphylococcus* spp isolados de leite de vacas saudáveis e com mastite por meio da técnica de disco-difusão, em duas granjas leiteiras do município de Jataí-GO, 2023.



Enquanto isso, nos amostrados com mastite, pôde-se observar uma maior discrepância entre os isolados, desde um maior número de cepas suscetíveis a todos

antimicrobianos (17 cepas), quanto a cepas MDR (16 cepas), em comparação aos achados do grupo saudável. Foi constatado, também, resistência fenotípica para todas as classes de antibióticos testadas e que 72 cepas mostraram-se resistentes a pelo menos uma classe.

Ainda sobre o grupo doente, a penicilina e oxacilina apresentaram maior índice de cepas resistentes, com valores de 61 (68,54%) e 38 cepas (42,70%), respectivamente. Baixos índices de resistência foram observados para gentamicina e ciprofloxacina, com valores de 1 (1,12%) e 5 cepas (5,62%), respectivamente (Tabela 1).

A análise estatística de correlação pelo teste de Qui-Quadrado (χ^2) de comparação entre animais positivos para mastite e presença de cepas resistentes de estafilococos demonstrou que não houve correlação estatística entre animais com mastite e cepas resistentes à gentamicina ($p = 306$). Por outro lado, houve correlação entre animais saudáveis que apresentaram cepas resistentes à oxacilina por conta do resultado da OR menor que 1 (tabela 2). Todos os demais antibióticos testados tiveram sua resistência correlacionada com o grupo de animais com mastite, conforme tabela 2.

Tabela 2 – Correlação entre a presença de mastite e cepas de *Staphylococcus* spp. resistentes a antibióticos pelo teste de Qui-Quadrado (χ^2).

Antibiótico	χ^2	p-valor	OR	IC (OR)
Pen	10,48	0,001*	2,71	1,47 – 4,99
Cef	26,98	<0,001*	35,9	4,74 – 271,60
Oxa	48,91	<0,001*	0,06	0,02 – 0,15
Sult	21,04	<0,001*	21,34	12,83 – 29,86
Clind	11,59	<0,001*	12,35	5,52 – 19,19
Cip	5,08	0,024*	1,05	0,83 – 10,04
Gen	1,04	0,306	-	-

χ^2 = valor de Qui-Quadrado; OR = *Odds ratio*; IC = intervalo de confiança.

*Significativo estatisticamente ao nível de 5% de confiança.

3.4. Teste da Concentração Inibitória Mínima (MIC):

Em relação à concentração inibitória mínima, os resultados estão apresentados na tabela 2. Não foi possível determinar a concentração inibitória mínima para o antimicrobiano trimetoprim com sulfametoxazol em nenhum isolado, conforme as concentrações testadas. Igualmente, as MICs de azitromicina, clindamicina, cefoxitina e oxacilina também não foram determinadas para alguns isolados.

Tabela 3: Concentração inibitória mínima (MIC) de sete antimicrobianos para 11 isolados de *Staphylococcus* Coagulase Positivo provenientes de rebanhos leiteiros saudáveis e com mastite, no município de Jataí, Goiás, 2022-2023.

	Concentração Inibitória Mínima (µg/mL)						
	Azi	Cef	Clind	Oxa	Pen	Sult	Van
Ponto de Corte (µg/mL):	≥ 8	≥ 8	≥ 4	≥ 1	≥ 0,25	≥ 4/76	≥ 32
23.1	4	2	0,06	0,5	0,06	> 32/608	2
Vacas Saudáveis:							
140.2*	8	1	> 16	0,12	0,06	> 32/608	2
834.1*	> 64	0,25	> 16	1	0,06	> 32/608	1
834.2	> 64	0,25	1	0,12	0,06	> 32/608	2
Cepas Resistentes	3	0	2	1	0	4	0
729*	> 64	4	> 16	0,12	0,03	> 32/608	2
852.1*	> 64	8	> 16	4	1	> 32/608	0,5
852.2*	> 64	> 128	> 16	> 16	4	> 32/608	4
Vacas com Mastite:							
873.1	0,12	0,5	0,12	0,12	0,06	> 32/608	2
917*	2	16	> 16	4	1	> 32/608	0,12
1197	0,12	0,5	> 16	0,12	0,06	> 32/608	0,12
1197.1	> 64	1	0,03	0,06	0,12	> 32/608	2
Cepas Resistentes	4	3	5	3	3	7	0
TOTAL RESISTÊNCIA	7	3	7	4	3	11	0
%	63,64	27,27	63,64	36,36	27,27	100	0

Azi = Azitromicina; Cef = Cefoxitina; Clind = Clindamicina; Oxa = Oxacilina; Pen = Penicilina; Sult = Trimetoprima com Sulfametoxazol; Van = Vancomicina; *Multirresistência.

Os padrões de resistência mais prevalentes foram trimetoprim com sulfametoxazol (100%), azitromicina (63,64%) e clindamicina (63,64%). Por outro lado, todos os isolados foram suscetíveis à vancomicina. Quanto à penicilina e cefoxitina, apesar de todas as cepas oriundas de vacas saudáveis apresentarem sensibilidade a esse antibiótico, foi observado, no grupo com mastite, resistência de 27,27% cada.

Referente à meticilina resistente, foi constatado uma cepa MRS na concentração inibitória mínima do grupo saudável e três cepas MRSs no grupo doente. Por fim, foram detectadas duas cepas com perfil de multirresistência no teste de MIC do grupo de animais saudáveis; e quatro cepas MDRs oriundos de animais com mastite, conforme demonstrado na tabela 2.

4. DISCUSSÃO

De acordo com Heikkilä et al. (2018), ao considerar todo o setor leiteiro, as maiores perdas na produção de leite resultam da mastite. Quanto a essa afecção, apesar das espécies estafilocócicas coagulase positivas e, em especial a *Staphylococcus aureus*, ainda serem os principais agentes estudados em relação a infecções intramamárias, linhagens de estafilococos coagulase negativos têm sido detectadas como agentes emergentes causadores da mastite em todo o mundo, levando a um impacto negativo substancial por serem comuns e poderem reduzir a produção de leite (Rojas, 2014; Moritz & Moritz, 2016; Ruegg, 2017).

O presente estudo investigou a frequência e caracterização de *Staphylococcus* spp, além da diversidade fenotípica relacionada à resistência antimicrobiana. Das amostras de leite cru colhidas de vacas leiteiras com mastite, 92,1% (82/89) foram SCNs. Essa incidência é semelhante a outras pesquisas realizadas no mesmo Estado (Martins, 2012), em outras localidades do Brasil (Noel et al., 2016; Cades et al., 2017) e em outros países (Lago et al., 2011; Heikkilä et al., 2018).

Por outro lado, a elevada ocorrência de SCNs nas amostras de leite cru de vacas saudáveis (95,4%; 84/88) encontrada nessa investigação também foi similar a outras literaturas (Chaffer et al., 1999; Rakotozandrindrainy & Foucras, 2007; Lemos, 2015), o que confirma a relevância desses microrganismos na indústria leiteira. Essa constatação evidencia que a mastite bovina causada por esse grupo de microrganismos, a qual ainda é vista como menos patogênica, deve ser estudada, a fim de buscar informações específicas sobre esses patógenos e o potencial risco para a saúde pública.

Apesar de alguns estudos detectarem valores consideráveis de SCPs em amostras de leite com mastite (Pinto et al., 2011; Lemos, 2015), a atual pesquisa identificou baixos valores para esse agente (7,86%; 7/89). Em compensação, Freitas et al. (2005) têm referido resultados semelhantes a essa pesquisa.

Essas variações na distribuição dos patógenos, entre o presente estudo e outros relatórios, podem ser atribuídas às diferenças regionais; no manejo das fazendas e na prestação de serviços veterinários; ou ainda a fatores relacionados às características de virulência e resistência das cepas predominantes em cada propriedade leiteira estudada.

Uma vez que a mastite é causada por uma variedade de patógenos bacterianos, com cepas que variam entre as fazendas e ao longo do tempo e que possuem características de virulência e capacidades imunogênicas diferentes entre elas (Ruegg et al., 2017), os programas de controle dessa afecção devem ser específicos e de acordo com a etiologia da mastite presente nos animais das fazendas.

No que concerne a pesquisa de MRS, entre as contagens obtidas a partir de todas as amostras de leite, verificou-se um maior valor de cepas fenotipicamente MRSs no grupo dos animais doentes, comparado ao grupo de animais saudáveis, de modo que a presença do quadro inflamatório e infeccioso pode estar associada ao aumento dessas contagens. Ainda, os isolados que demonstraram-se resistentes foram, em sua maioria, SCNs.

Essa observação é significativa, pois a presença de SCNs meticilina-resistentes é descrita por Ibrahim et al. (2022) como uma causa de grande relevância, devido ao seu potencial de propagação através da cadeia alimentar láctea. Esses resultados obtidos permitem afirmar que o *Staphylococcus* coagulase negativo resistente à meticilina oriundos dos animais de produção podem servir como reservatórios para a transferência de genes de resistência antimicrobiana.

As cepas meticilina-resistentes são aquelas que apresentam resistência à cefoxitina, indicando resistência à toda classe dos β -lactâmicos, devido à presença do gene *mecA*, que codifica a proteína suplementar de ligação à penicilina (PBP2a) e determina resistência inclusive, às penicilinas resistentes às β -lactamases. Essas cepas frequentemente apresentam resistência a outras classes antimicrobianas e constituem um achado preocupante, principalmente quando ocorre em amostras isoladas de animais de produção (Rojas, 2014; CLSI, 2024).

Ainda de acordo com os critérios sobre os testes de suscetibilidade em disco antimicrobianos do CLSI (2024), os métodos de disco-difusão de oxacilina não devem ser usados para a detecção de resistência à meticilina para os estafilococos, por sua imprecisão. Assim, os métodos baseados em cefoxitina são atualmente preferíveis por serem melhores preditores da presença de *mecA*. Contudo, ainda de acordo com o CLSI, apesar de haver pontos de cortes para a utilização da cefoxitina no método de difusão em disco, esta pode não ter um desempenho confiável para todas as espécies *Staphylococcus* spp.

Em conformidade a essas informações, foi possível constatar falhas no uso da oxacilina como um bom preditor para a expressão fenotípica do gene *mecA*, de modo que alguns isolados resistentes à oxacilina foram suscetíveis à cefoxitina no teste em disco. Logo, foi observado que a maior parte das amostras de ambos os grupos mostraram-se resistentes à oxacilina, quando comparado com a resistência à cefoxitina.

Ainda sobre a detecção de cepas MRSs, no grupo de animais doentes constatou-se que as duas cepas positivas para MRS no teste de disco-difusão também se mostraram positivas na MIC. De resto, uma cepa no grupo de animais saudáveis e uma no grupo doente se mostraram MRS apenas na MIC.

Salienta-se que a avaliação da concentração inibitória mínima define com mais precisão o grau de suscetibilidade do patógeno, pois demonstra a concentração mínima do medicamento que inibe o crescimento da bactéria. Assim, os resultados são quantitativos, tornando-o um método mais útil para confirmar a ocorrência de resistências nas cepas investigadas quando comparado ao teste qualitativo de disco-difusão (Giguère, 2013; Reygaert, 2018; CLSI, 2020).

No que diz respeito à multirresistência, não foi demonstrado nessa investigação, MDR fenotípica nas amostras de leite saudável testadas com a difusão em disco. Em contrapartida, observou-se duas cepas SCPs multirresistentes através da MIC. Não obstante, verificou-se quatro cepas SCPs multirresistentes oriundas de animais doentes no teste MIC, enquanto apenas duas dessas cepas se mostraram MDR no teste de disco-difusão. Esses resultados demonstram que pode haver colonização de espécies estafilocócicas mais patogênicas mesmo na ausência de antimicrobianos no microambiente do úbere saudável, de modo a contribuir para que haja pressão de seleção.

Foi detectado também, no teste de difusão em disco, uma taxa considerável de cepas SCNs multirresistentes de animais doentes. Esses dados demonstram que apesar da SCN ser classificada como menos patogênica e, muitas vezes, considerada como autolimitante, não sendo tratadas com antibióticos, a mesma tem potencial para adquirir genes de resistência (Pyörälä, et al. 2009; Ruegg, 2017).

Além disso, os genes multirresistentes, quando presentes no leite, podem contribuir com as falhas terapêuticas e transferência genética através da cadeia alimentar (Kalaba et al., 2023). Portanto, o surgimento de cepas MDRs, particularmente MRSs, levando a infecções em animais e humanos é uma preocupação crescente de saúde pública.

Dessa forma, embora o percentual de isolados MDR e MRS tenha sido baixo nesse estudo, a presença de resistência a pelo menos um antibiótico, cepas MDR e MRS proveniente de vacas saudáveis denota os potenciais riscos que esses patógenos podem desencadear na saúde dos animais de produção e, conseqüentemente, no ser humano. Logo, a sua patogenicidade e risco de transmissão através da cadeia alimentar, particularmente pela pasteurização insuficiente do leite, não pode ser ignorado.

Nesse estudo, foi verificada eficácia de 100% sobre todas as cepas de animais saudáveis nos testes de difusão em disco para ciprofloxacina, clindamicina e sulfametoxazol+trimetoprim. Contudo, a resistência dos *Staphylococcus* Coagulase Positivos neste estudo também foram confirmadas pela determinação da MIC, a qual detectou 100% de resistência das bactérias à sulfametoxazol+trimetoprim. Além disso, essa análise também

constatou a presença de resistência para clindamicina.

Foi notável também resistência à sulfametoxazol + trimetoprim em todas as cepas do grupo com mastite. Essa alta taxa de resistência antimicrobiana percebido pelas sulfonamidas em ambos os grupos de animais pode estar associado ao maior uso desse princípio ativo na produção animal em todo o mundo (Van Boeckel et al., 2019). Entretanto, há relatos sobre altas taxas de suscetibilidade para esse medicamento (Teixeira, 2013). Essa divergência pode ser devido à maior exposição nesses ambientes de fazendas leiteiras ou à menor rotação de diferentes agentes antimicrobianos no tratamento dos animais.

Em relação à azitromicina e à clindamicina, foi observado, nesse estudo, uma taxa semelhante entre a resistência pelo teste da MIC. Vale ressaltar que esses princípios ativos atuam se ligando à subunidade ribossômica 50S do RNA bacteriano e, conseqüentemente, a resistência de ambos ocorre através de mutações cromossômicas nesses ribossomos (Uddin et al., 2021).

Outro aspecto importante sobre a clindamicina é a possibilidade de haver crescimento residual de microrganismo na técnica da MIC através da microdiluição em caldo, o que pode dificultar a determinação do ponto de inibição e sua interpretação. Por isso, o CLSI (2024) orienta realizar a leitura desse teste na menor concentração em que começar o crescimento residual. Dessa maneira, devem ser ignorados os poços com pequenos crescimentos. Ademais, a MIC é uma análise a olho nu, sendo sua interpretação subjetiva.

Além disso, nos SCPs advindos de vacas saudáveis, foi detectado 100% de eficácia para a penicilina em ambas as análises *in vitro*. Em compensação, no grupo com mastite, houve divergência entre os testes, visto que a difusão em disco demonstrou uma taxa de resistência maior (5/7 cepas) que aquela detectada pela concentração inibitória mínima (3/7).

Esse percentual de resistência observado nos SCPs pelo teste de MIC para Penicilina foi inferior ao relatado no estudo de Wang (2018). Isso sugere que a pressão seletiva causada pelo uso de antimicrobianos para tratamento de mastite nos rebanhos estudados foi menor, resultando na seleção de um menor número de *Staphylococcus Coagulase Positivos* resistentes a esse antibiótico.

Moritz & Moritz (2016) evidenciaram que a baixa eficácia da penicilina entre diversos rebanhos está associada ao fato dos β -lactâmicos serem a classe de antimicrobianos mais frequente no tratamento das infecções estafilocócicas em bovinos. Em contraste a esse fato, alguns estafilococos isolados no presente estudo apresentaram suscetibilidade à

penicilina. Esses resultados obtidos ressaltam a importância de avaliar a sensibilidade antimicrobiana *in vitro* para os patógenos isolados de casos de mastite antes da indicação de medicamentos de última geração para o tratamento desses animais.

Foi notável que a vancomicina se mostrou sensível a todas cepas analisadas, situação semelhante ao constatado por Wang (2018). De acordo com Freitas, et al. (2005), essa alta eficácia deve-se, possivelmente, ao pouco uso desse antibiótico na medicina veterinária, sendo a sua utilização clínica preconizada no tratamento de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (Ritter et al., 2020; Uddin et al., 2021).

No que se refere ao grupo doente, a gentamicina e ciprofloxacina foram os antibióticos que exibiram a melhor atividade biológica antibacteriana para os agentes SCNs na difusão em disco, tal como relatado por Ibrahim, et al. (2022). Porém, esses dados estão em divergência com os citados por outras literaturas (Freitas et al., 2005; Martins, 2012; Cades et al., 2017).

Em contrapartida, a gentamicina foi o antibiótico que se mostrou 100% eficaz para todos os SCPs. Contrário a esses dados, Lemos (2015) obteve consideráveis índices de resistência frente à gentamicina. Por outro lado, a penicilina e oxacilina apresentaram maior percentual de resistência para os microrganismos SCNs pelo teste em disco, tal como demonstrado por Martins (2012) e Ibrahim, et al. (2022).

Os resultados do presente estudo, juntamente com os dos investigadores citados, indicam que as taxas de resistência a antimicrobianos encontram-se em crescimento, de modo que esses rebanhos são submetidos à uma alta pressão seletiva frente a essas medicações. À vista disso, ainda que a terapia da mastite estafilocócica seja um desafio global, há divergência entre os rebanhos nas taxas de resistência frente a cada antibiótico.

No que se refere aos resultados em que não foram obtidos uma concentração inibitória mínima, foi possível observar que as SCPs mostraram-se resistentes às concentrações de alguns antibióticos testadas, diferentemente dos padrões de sensibilidade e resistência intrínseca disponíveis no CLSI (2024), definido como uma organização que promove diretrizes e padrões de consenso em laboratórios. Isso demonstra que, apesar de seguir os padrões de pontos de corte, há ocorrência de resistências adquiridas nas bactérias. Segundo Reygaert (2018), as bactérias não são necessariamente suscetíveis ou resistentes de maneira uniforme a qualquer agente antimicrobiano específico e os níveis de resistência podem variar muito dentro de grupos bacterianos relacionados.

É importante mencionar que, nem sempre, um resultado indicando susceptibilidade *in vitro* é garantia de efetividade *in vivo*. Uma vez que a efetividade do

agente antimicrobiano depende de diversos fatores, o tipo microrganismo envolvido; a resposta imune do animal; a distribuição do antimicrobiano e concentração atingida no tecido mamário inflamado; e a capacidade da resposta imune do animal pode influenciar no sucesso da terapia.

Embora o uso indevido de antimicrobianos na medicina humana sejam o principal fator que favorece o desenvolvimento da resistência antimicrobiana em humanos, a complexa interação entre pessoas e animais pode potencialmente contribuir para o surgimento e transmissão de bactérias resistentes (Kalaba et al., 2023). Uma vez que a terapia de doenças bacterianas é a principal razão para o uso de antimicrobianos em animais, são necessários programas que possam rastrear, de forma contínua, a resistência antimicrobiana em microrganismos bacterianos importantes para a saúde animal.

Segundo Giguère (2013), o medicamento ideal é aquele que o patógeno é sensível, atinge concentração efetiva no local da infecção, é barato, não é tóxico para o animal e requer estresse mínimo. Para auxiliar o veterinário na escolha do agente antimicrobiano apropriado, um laboratório deve fornecer o máximo de informações possível.

5. CONCLUSÃO

No geral, pode-se observar um perfil de resistência mais acentuado em estafilococos oriundos de vacas com mastite quando comparado com as vacas saudáveis, o que apoia a importância do desafio no controle da mastite. Foram detectados, também, perfis de multirresistência e cepas MRs inclusive em isolados oriundos de vacas saudáveis. Esses achados revelam estafilococos resistentes isolados de leite cru, o que pode representar um risco potencial, em termos de transferência de genes de resistência através da cadeia alimentar, para os humanos. Além disso, foi observado divergência entre os dados de suscetibilidade dos antimicrobianos do presente estudo entre os testes *in vitro*, de forma a evidenciar que o método de concentração inibitória mínima se mostrou mais preciso na detecção de resistência quando comparado com a técnica de disco difusão. Uma vez que a disseminação de espécies bacterianas resistentes é uma realidade, é fundamental monitorar os perfis de resistência antimicrobianos na prática veterinária.

6. REFERÊNCIAS

- Abushaheen MA, Muzaheed, Fatani AJ, Alosaimi M, Mansy W, George M, et al. Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance. *J. Disease-a-Month*. 2020;66(10097):1-21. <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2020.100971>
- Brito LG, Salman AK, Gonçalves MA, Figueiró MR. Documentos 116: cartilha para o produtor de leite de Rondônia: parte II: aspectos técnicos. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2007.
- Cades M, Zanini DS, Souza HL, Silva JD, Fink AA, Muniz IM. Perfil de resistência antimicrobiana de mastite bovina em propriedade leiteira no município de monte negro/RO. *RBCA*. 2017; 6(1):1-62.
- Chaffer M, Leitner G, Winkler M, Glickman A, Krifucks O, Ezra E, et al. Coagulase-negative staphylococci and mammary gland infections in cows. *J. Vet. Med.* 1999;46(10):707-712. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0450.1999.00289.x>
- Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI document M07-A9: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard. 9th ed. Pennsylvania: CLSI; 2012;32(2):88 p.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI supplement M100: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 30th ed. Pennsylvania: CLSI; 2020. 332 p.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI document M100-A34: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 34th ed. Pennsylvania: CLSI; 2024;44(5).
- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Anuário Leite 2022: pecuária leiteira de alta precisão. Juiz de Fora: EMBRAPA Gado de Leite, 2022.
- Food & Drug Administration. Antimicrobial use and resistance in animal agriculture in the United States: summary report. Center for Veterinary Medicine:FDA; Jun. 2022; 244 p.
- Freitas MF, Pinheiro JW Jr, Stamford TL, Rabelo SS, Silva DR, Silveira VM Filho, et al. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus* coagulase positivos isolados de leite de vacas com mastite no agreste do estado de pernambuco. *Arq. Inst. Biol. (Online)*. 2005;72(2):171-177.
- Halasa T, Huijps K, Østerås O, Hogeveen H. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: a review. *Vet Q*. 2007;29(1):18-31. <https://doi.org/10.1080/01652176.2007.9695224>
- Heikkilä AM, Liski E, Pyörälä S, Taponen S. Pathogen-specific production losses in bovine mastitis. *J Dairy Sci*. 2018;101(10):9493-9504. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14824>
- Heringstad B, Klemetsdal G, Ruane J. Selection for mastitis resistance in dairy cattle: a review with focus on the situation in the nordic countries. *Livest Prod Sci*. 2000;64:95-106.
- Higham LE, Deakin A, Tivey E, Porteus V, Ridgway S, Rayner AC. A survey of dairy cow farmers in the United Kingdom: knowledge, attitudes and practices surrounding antimicrobial use and resistance. *Vet Rec*. 2018. <https://doi.org/10.1136/vr.104986>
- Ibrahim ES, Dorgham SM, Mansour AS, Abdulhamed AM, Khalaf DD. Genotypic characterization of *mecA* gene and antibiogram profile of coagulase-negative staphylococci in subclinical mastitic cows. *Vet World*. 2022;15(9):2186-2191. <https://www.doi.org/10.14202/vetworld.2022.2186-2191>
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Mapa leite: valor da produção. Rio de Janeiro: IBGE, 2021. [cited 2023 Aug 24]; Available from: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/leite/br>
- Kalaba V, Ilić T, Kalaba D, Đurđević-Milošević D. Isolation of coagulase-negative *Staphylococcus* from samples of raw milk and their resistance to antimicrobial drugs. In: VIII International Congress Engineering, Environment and Materials in Process Industry; 2023 Mar 20-23; Jahorina, Bosnia and

Herzegovina. EEM, 2023. p. 35-41.

Lago A, Godden SM, Bey R, Ruegg PL, Leslie K. The selective treatment of clinical mastitis based on on-farm culture results: I. effects on antibiotic use, milk withholding time, and short-term clinical and bacteriological outcomes. *J Dairy Sci.* 2011;94(9):4441-4456. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-4046>

Lemos FA. Detecção de genes de enterotoxinas de *Staphylococcus aureus* e estafilococos coagulase negativos isolados de leite bovino e de tanques de refrigeração comunitários procedentes de pequenas propriedades da região de Bauru-SP [thesis]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2015. 110 p.

Martins JD. Estudo da etiologia das principais bactérias isoladas de mastite bovina em rebanhos leiteiros de propriedades rurais de Goiás [thesis]. Goiânia: Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás; 2012. 102 p.

Mendonça EC, Marques VF, Melo DA, Alencar TA, Coelho IS, Coelho SM, et al. Caracterização fenotípica da resistência antimicrobiana em *Staphylococcus* spp. isolados de mastite bovina. *Pesqui. Vet. Bras.* 2012;32(9):859-864.

Moritz F, Moritz CM. Resistência aos antimicrobianos em *Staphylococcus* spp associados à mastite bovina. *Rev. Ciên. Vet. Saúde Públ.* 2016;3(2):132-136.

Noel CC, Motta FS, Francisco NL, Almeida NR, Soares LC. Perfil de suscetibilidade antimicrobiana e produção de “slime” de isolados de *Staphylococcus* spp. provenientes de casos de mastite bovina na região Sul-Fluminense. *Rev. de Saúde.* 2016;7(1):22-26.

Oliver SP, Murinda SE. Antimicrobial resistance of mastitis pathogens. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2012;28(2):165-185. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cvfa.2012.03.005>

Pinto PA, Santos KL, Teles JA, Valença RM. Perfil microbiológico do leite bovino produzido na bacia leiteira de alagoas quanto à presença de *Staphylococcus* coagulase positivo. *Rev. Sem.* 2011;6(6):191-197.

Pyörala S, Taponen S. Coagulase-negative staphylococci – Emerging mastitis pathogens. *Vet Microbiol.* 2009;134. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.015>

Rakotozandrindrainy R, Foucras G. Etiologie bactérienne des mammites des vaches laitières du triangle laitier des hautes terres de Madagascar. *Revue Méd. Vét.* 2007;158(2):106-110.

Ritter JM, Flower R, Henderson G, Loke YK, Macewan D, Rang HP. Rang and Dale's pharmacology. 9th ed. Elsevier; 2020.

Reygaert WC. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiology.* 2018;4(3):482-501.

Rojas AC. *Staphylococcus* spp coagulase-negativos em unidades leiteiras: identificação fenotípica e proteômica e análise da resistência antimicrobiana [thesis]. Seropédica: Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; 2014. 64 p.

Ruegg PL. A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. *J Dairy Sci.* 2017;100(12):10381-10397. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13023>

Simões TV, Oliveira AA. Documentos 170: mastite bovina, considerações e impactos econômicos. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2012.

Teixeira JP. Caracterização fenotípica, genotípica e avaliação por pcr do potencial enterotoxigênico de *Staphylococcus aureus* em amostras de leite cru refrigerado [thesis]. Belo Horizonte: Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais; 2013. 69 p.

Uddin TM, Chakraborty AJ, Khusro A, Zidan BMRM, Mitra S, Emran TB, et al. Antibiotic resistance in

microbes: history, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects. *J.of Infection and Public Health*. 2021;14(12):1750-1766.

Van Boeckel TP, Pires J, Silvester R, Zhao C, Song J, Criscuolo NG, et al. Global trends in antimicrobial resistance in animals in low- and middle-income countries. *Science*. 2019;365(1266).

Wang W, Lin X, Jiang T, Peng Z, Xu J, Yi L, et al. Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* cultured from raw milk taken from dairy cows with mastitis in Beijing, China. *Front. Microbiol*. 2018;9(1123). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01123>

7. ANEXOS

ANEXO A – PROTOCOLO APROVAÇÃO CEUA



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JATAÍ
COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA



Jataí, 19 de março de 2021.

PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO PROJETO DE PESQUISA DO PROTOCOLO N. 004/21

I - Finalidade do projeto de pesquisa: Pesquisa – Iniciação Científica II - Identificação:

- Data de apresentação a CEUA: 18/02/2021
- Título do projeto: RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA NA MICROBIOTA COMENSAL EPATOGÊNICA DO LEITE.
- Pesquisador Coordenador no SIGAA: Ariel Eurides Stella
- Pesquisador Responsável/ Unidade: Ariel Eurides Stella
- Pesquisadores Participantes: ANGELICA FRANCO DE OLIVEIRA
- Médico Veterinário/CRMV: Ariel Eurides Stella/2714 GO
- Unidade onde será realizado: CIAGRA/UFJ

III - Objetivos e justificativa do projeto:

Objetivo Geral

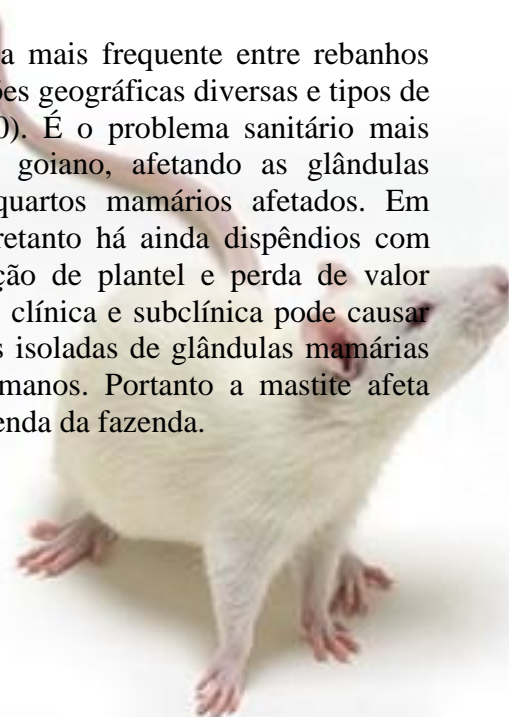
- Comparar a resistência antimicrobiana entre a população comensal e a população patogênica de bactérias presentes no leite.

Objetivos Específicos

- Isolar *Staphylococcus aureus* de vacas com mastite e *Staphylococcus coagulase* negativos (SCN) de vacas saudáveis.
- Caracterizar os *Staphylococcus aureus* e os *Staphylococcus coagulase* negativos (SCN) quanto a posse de genes de virulência, definindo assim o primeiro como patogênico e o segundo como comensal.
- Identificar a resistência antimicrobiana a diversos fármacos.
- Comparar o perfil de resistência e de virulência dos isolados

JUSIFICATIVA: A mastite (clínica ou subclínica) é a doença mais frequente entre rebanhos leiteiros no mundo, com uma frequência variável devido a regiões geográficas diversas e tipos de alojamento (Halasa et al., 2007; Van den Borne et al., 2010). É o problema sanitário mais frequentemente observado na pecuária leiteira do sudoeste goiano, afetando as glândulas mamárias e causando redução na produção de leite dos quartos mamários afetados. Em consequência disto, têm-se perdas da produção de leite. Entretanto há ainda dispêndios com medicamentos e mão-de-obra, assistência veterinária, reposição de plantel e perda de valor comercial do produto. Além do prejuízo econômico, a mastite clínica e subclínica pode causar danos à saúde pública, pois das inúmeras espécies microbianas isoladas de glândulas mamárias bovinas, muitas podem desencadear doenças aos seres humanos. Portanto a mastite afeta substancialmente a saúde e o bem-estar animal, bem como a renda da fazenda.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA-JATAÍ
Bloco 5 – sala 25, Campus Jatobá. Br 364 Km 192, nº.
3.800 Parque Industrial, Jataí (GO) – 75801-615
Telefone: 64 3606 8336
Email: ceua.jatai@ufg.br





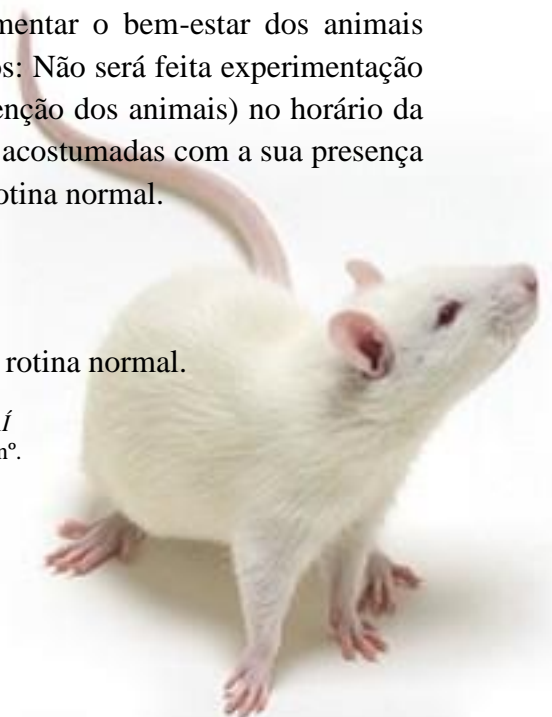
A mastite bovina deriva principalmente de patógenos comuns no úbere, como estafilococos, estreptococos e espécies coliformes (Ruegg, 2017). Os patógenos responsáveis pela mastite bovina podem ser divididos em dois grupos de acordo com a sua origem e o modo de transmissão: contagiosos e ambientais. Entre os contagiosos podemos destacar o *Staphylococcus aureus*. A mastite clínica é a principal razão para o uso de antimicrobianos em fazendas leiteiras, embora a terapia antimicrobiana não seja necessária em todos os casos (Lago et al., 2011). Um aspecto muito frustrante da mastite é sua natureza recorrente (Schukken et al., 2010), e os principais fatores de risco são, parição em vacas mais velhas, alta produção, tipo de patógeno e se houve cura bacteriológica de mastites anteriores (Jamali et al., 2018). Considera-se que uma vaca tem mastite clínica, se apresentar secreção anormal de leite de um ou mais quartos, com possíveis sinais de inflamação dos tecidos do úbere (calor, inchaço). Uma proporção relativamente alta de vacas leiteiras tem mastite subclínica; isto é, inflamação do úbere como indicado por uma CCS elevada, mas sem sinais de mastite clínica. A mastite subclínica também afeta a produção e a qualidade do leite e é caracterizada pela presença de componentes inflamatórios no leite (Heringstad et al., 2000). A redução na produção de leite a longo prazo representa uma parcela notável das perdas econômicas causadas pela mastite bovina. Medidas eficientes, econômicas e seguras para evitar essas perdas requerem conhecimento do agente causal da doença (Heikkila et al., 2018). A mastite bovina foi classificada como o desafio de saúde e bem-estar mais importante e o motivo mais comum para o uso de antibióticos, entretanto a assistência veterinária frequente foi associada a uma diminuição no uso de antibióticos, tratamentos mais direcionados e conhecimento maior sobre resistência antimicrobiana (Higham et al. 2018). Os antimicrobianos são utilizados em vários momentos na vida de uma vaca leiteira, para o tratamento de mastite clínica, para a prevenção de mastite subclínica (terapia da vaca seca), na pneumonia e diarreia de bezerros, pododermatites etc. A colonização de rebanhos leiteiros e a subsequente contaminação do leite cru por *S. aureus*, especialmente aqueles que expressam resistência a múltiplas drogas (MDR), capacidade de produção de biofilmes e toxinas, continua sendo uma questão importante tanto para o produtor quanto para a saúde pública (Wang et al. 2018). Sabemos que as bactérias trocam material genético, seja por conjugação ou pela simples absorção de DNA livre de outras bactérias já mortas. Essas trocas propiciam a dispersão de genes de resistência aos antibióticos entre linhagens próximas, essa dispersão também poderia estar ocorrendo no microambiente do úbere bovino. Características fenotípicas, bem como informações acerca do genoma de bactérias presentes no úbere, são fundamentais para elucidarmos características relacionadas a mastite e a sua epidemiologia. Na bacia leiteira do sudoeste de Goiás, os principais agentes envolvidos na ocorrência de mastite bovina ou perfil de sensibilidade desses agentes às drogas antimicrobianas são pouco conhecidos. Outro ponto pouco estudado é a relação da resistência antimicrobiana entre bactérias altamente virulentas e bactérias pouco virulentas no mesmo gênero. Sabe-se que a microbiota do úbere é bastante heterogênea, essa diversidade patogênica também se reflete na sensibilidade as drogas antimicrobianas?





IV - Sumário do projeto:

- Discussão sobre a possibilidade de métodos alternativos e necessidade do número de animais: Como o objetivo do trabalho é pesquisar e caracterizar a presença regional/local dos microrganismos, é fundamental que a coleta seja realizada nos animais.
- Prevê Projeto Piloto: Não
- Espécie animal utilizada/número total de animais/Número de animais por tratamento ou grupo experimental: Bovino–Girolanda/40 animais/20 com sintomas de mastite e 20 saudáveis (grupo controle)
- Descrição do animal utilizado (Explicitar: espécie/ linhagem/ sexo (informar número por sexo)/ peso e/ou idade etc): Girolanda/40 fêmeas/500Kg/3-4 anos
- Fonte de obtenção do animal: Fazenda UFJ
- Descrição das instalações utilizadas e número de animais/área/qualidade do ambiente (ar, temperatura, umidade), alimentação/hidratação: Os animais utilizados fazem parte do rebanho regular da fazenda da UFJ. Não haverá segregação. Temperaturas e condições ambientais naturais.
- Utilização de agente infeccioso/gravidade da infecção a ser observada e análise dos riscos aos pesquisadores/alunos: Não há. Os riscos biológicos oriundos da manipulação do leite em laboratório são minimizados utilizando-se a técnica asséptica juntamente com o uso de EPIs.
- Procedimentos experimentais do projeto de pesquisa: Serão coletadas 40 amostras (pool dos quatro tetos de cada animal em lactação, serão utilizados 20 animais com sintomatologia clínica ou subclínica, e 20 animais saudáveis) em uma granja leiteira localizada no município de Jataí-GO. As amostras serão transportadas e mantidas a 4° C até o início das análises. Para o isolamento dos Estafilococos as amostras de leite serão semeadas no agar Manitol e cultivados por 24h a 35°C, cinco colônias características de cada placa serão utilizadas. Não será feita experimentação animal. As coletas de leite serão feitas (sem a necessidade de contenção dos animais) no horário da ordenha, pelo próprio ordenhador (ao qual as vacas já estão acostumadas com a sua presença na sala de ordenha). Os animais não serão retirados de sua rotina normal.
- Métodos utilizados para minimizar o sofrimento e aumentar o bem-estar dos animais antes, durante e após a pesquisa. Pontos Finais Humanitários: Não será feita experimentação animal. As coletas serão feitas (sem a necessidade de contenção dos animais) no horário da ordenha, pelo próprio ordenhador (ao qual as vacas já estão acostumadas com a sua presença na sala de ordenha). Os animais não serão retirados de sua rotina normal.
- Grau de invasividade: 1
- Material utilizado em outros projetos: Não
- Método de eutanásia: Não se aplica
- Destino do animal: Os animais não serão retirados da sua rotina normal.





V – Comentários do relator frente às orientações da CEUA:

- Quanto aos documentos exigidos pela CEUA/UFJ: constam todos os documentos exigidos e devidamente assinados pelos responsáveis pelo projeto.
- Quanto aos cuidados e manejo dos animais e riscos aos pesquisadores: O projeto será conduzido dentro da rotina normal dos animais não oferecendo qualquer risco e/ou sofrimento aos mesmos. Em relação aos pesquisadores, haverá utilização de EPI para a manipulação do leite em laboratório, minimizando os riscos aos mesmos.

VI - Parecer da CEUA:

De acordo com a documentação apresentada à CEUA, consideramos o projeto APROVADO, smj desta Comissão.

Solicitamos aos pesquisadores:

- ✓ Não se aplica

Informação aos pesquisadores:

Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que a pesquisadora responsável deverá encaminhar à CEUA-Jataí o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA. O prazo para entrega do Relatório é **de até 30 dias** após o encerramento da pesquisa, a qual está prevista para finalizar suas ações até **01 de setembro de 2026**.

VII - Data da reunião: 19/03/2021.

Dra. Mirian Machado Mendes
Coordenadora da CEUA-Jataí

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA-JATAÍ
Bloco 5 – sala 25, Campus Jatobá. Br 364 Km 192, nº.
3.800Parque Industrial, Jataí (GO) – 75801-615
Telefone: 64 3606 8336
Email: ceua.jatai@ufg.br



Author Guidelines

SPECIAL NUMBER: COLLECTIVE VETERINARY MEDICINE

When submitting a paper for this special, select the section "Special Collective Veterinary Medicine"

Topics covered:

One Health – human, animal and environmental health; shelter medicine; forensic veterinary medicine; veterinary medicine in disasters; dogs, cats and equine population management; indigenist veterinary medicine and social veterinary medicine.

Submissions must be made in English, until Oct 31st, 2023, in one of the following text forms: full article, review article, preliminary note or case report. Papers will be peer-reviewed for publication until late 2023.

The published articles will have a 20% discount.

Guidelines for Authors

The Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science (BJVRAS) is published quarterly, exclusively online, and in English. The BJVRAS is linked to the School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo (SP, Brazil), being supported by the Veterinary Medicine Foundation (FUMVET). The BJVRAS is intended to publish scientific studies on veterinary medicine and related sciences.

Editorial Policy

The manuscripts sent for publication are subject to approval by the editorial board, who is assisted by experts in the field (peer review). The list with names of collaborators (reviewers) of the BJVRAS is published annually when the volume is closed. The manuscripts whose texts need revision or corrections that cannot be made by our editors will be returned to the authors. The studies accepted for publication become property of the BJVRAS. The authors are responsible for the concepts and information contained in their articles. The studies involving animal use must have the experimental protocol approved by the Ethics Committee.

Irrespective of the type of study, it should be original and sent only to the BJVRAS. The manuscripts for publication should be submitted at the USP journals portal, at the following URL: <http://www.revistas.usp.br/bjvras>.

Copyrights

The copyright law requires that the authors provide permission for the BJVRAS to use materials (including figures, tables, and images) posted by others journals or publishers. When the article publication was approved the Journal will sent a letter of ownerships rights transference to the Authors that will be signed and included in the system as a supplemental archive.

Publication Fee

After the manuscript is accepted, an US\$200 fee will be charged. All procedures necessary to publish the article will begin after the fee is paid.

Conditions for Submission

As part of the submission process, the authors should ensure that their submission complies with all items listed below. Submissions that are not in agreement with the rules will be returned to the authors.

- The contribution is original and unpublished.
- The English text was edited by a professional tested [in scientific manuscripts] and the voucher was attached.
- The "Guidelines for Authors" were completely followed.
- The figures and tables are inserted after the reference list in the same file.
- The experimental protocol approved by the Ethics Committee was attached.

Manuscript Presentation

The full article must

1. Be written in English.
2. Be limited to a maximum of fifteen typed pages, not counting the final pages where tables and illustrations are included.
3. Contain only official nomenclatures and consecrated abbreviations, not using abbreviations in the title of the article.
4. Be structured within the following items:
 - a) Title in English **and** Portuguese;

- b) Authors and institutional affiliation;
- c) Abstract/Keywords **and** *Resumo/Palavras-chave* (limited to five);
- d) Introduction;
- e) Materials and Methods;
- f) Results;
- g) Discussion (the "Results" and "Discussion" topics may be combined, if appropriate);
- h) Conclusion;
- i) Acknowledgements;
- j) References.

The *Preliminary Note and Case Report* must

1. Be written in English.
2. Be limited to the maximum of five typed pages.
3. Use only official nomenclatures and consecrated abbreviations, not using abbreviations in the title of the article.
4. Not be divided into separate sections (Introduction, Materials and Methods, Results, etc.), but include two abstracts (English and Portuguese), Keywords /Palavras-chave, and references.

Review articles

It will be published by knowledgeable specialists at the invitation of the editorial board. They must not be divided into separate sections (Introduction, Materials and Methods, Results, etc.), but must include two abstracts (English and Portuguese), Keywords/Palavras-chave, and references.

**** When the article is originated from a dissertation or thesis, the authors must mention it in a footnote.***

Characteristics

Digitation: Word document, A4 format, 1.5-line spacing, 2-cm margins, and Times New Roman (12) fonts.

Cover page: is a mandatory element that should contain the article title (in English and Portuguese), author's full names (no abbreviations), home institutions (in Portuguese), and e-mail address of all authors. The corresponding author should indicate the full institutional address.

Language: the manuscripts must be written in English. The authors must provide a professional tested in scientific manuscripts, who revise the text and issue a certificate of revision, and pay for his/her service.

Tables: must be numbered with Arabic numerals and headed by a title, followed by time and place. The limit number of tables per manuscript is five. This number may be exceeded in exceptional cases, depending on the editorial board opinion. For table citation in the text, write its name in full as follows: use initial uppercase letter if the word is between brackets [e.g., "(Table 1)"] and lowercase letter if the word is part of the text [e.g., "table 1"]. Tables should be inserted in the manuscript file just after the reference list.

Figures (photographs, graphs, pictures, drawings, or schemes): should be consecutively numbered with Arabic numerals and cited in the text. Illustrations should be identified (title and source) when done by the authors themselves. Graphs should always show the numbers corresponding to the points. For illustration citation in the text, write its name in full as follows: use initial uppercase letter if the word is between parentheses [e.g., "(Figure 1)"] and lowercase letter if the word is part of the text [e.g., "figure 1"]. Figures should also be inserted in the manuscript file just after the references list.

Acknowledgements are made at the discretion of authors. In this item, citing the project funding agency is recommended, if any.

References

- References must be written according to Vancouver Style: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7256/>
- The journal titles must be abbreviated according to the Index Medicus/Medline: <http://www2.bg.am.poznan.pl/czasopisma/medicus.php?lang=eng>
- In the list of references, all authors' names must be included.
- If the articles cited in the manuscript have title and abstract available in more than one language, the English version must be used.
- Citations of abstracts of findings presented at meetings are not accepted in the references.
- References are arranged alphabetically and listed at the end of the manuscript.
- The Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science style is available in Mendeley and Zotero software.

In order to cite document types not found in the following examples, authors are advised to consult the issues already published.

Journal articles

Mähler M, Berard M, Feinstein R, Gallagher A, Illgen-Wilcke B, Pritchett-Corning K, Raspa M. FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Lab Anim.* 2014;48(3):178-92. <http://dx.doi.org/10.1177/0023677213516312>. PMID:24496575

Book

Boon JA. *Veterinary echocardiography*. 2nd ed. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell; 2011.

Different authors for book and chapter

Ackermann MR. Inflammation and healing. In: Zachary JF, McGavin MD. *Pathologic basis of veterinary disease*. 5th ed. St. Louis, MO: Elsevier; 2012. p. 89-146.

Same author for book and chapter

Boon JA. *Veterinary echocardiography*. 2nd ed. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell; 2011. Chapter 4, Evaluation of size, function, and hemodynamics; p. 153-266.

Thesis

Molina CV. Pathogen surveillance (*Leptospira* spp., Rotavirus, Hepatitis E virus and Norovirus) in a wild golden-headed lion tamarin (*Leontopithecus chrysomelas*) population from an urban Atlantic Forest park in Niterói, Rio de Janeiro, Brazil [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia; 2018. 137 s.

Legal sources

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil). Instrução normativa n. 31, de 29 de junho de 2018. Diário Oficial da União [Internet]. Brasília; 2018 jul 2 [cited 2019 Apr 15]. Available from: http://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/28166433/do1-2018-07-02-instrucao-normativa-n-31-de-29-de-junho-de-2018-28166402

Citations in the text must be presented in the (Author, date) format, e.g., "(Santos, 2001)." If the citation is part of the text, initial caps letters should be used, e.g.,

"Santos (2001)." Two or more citations should be placed in ascending chronological order and separated by semicolons.

One author – the author's last name and date

Valberg (1996) or (Vieira, 1991)

Two authors – the authors' last names and date

Strunk & White (1979) or (Strunk & White, 1979)

Three or more authors – first author's last name followed by the non-italicized "et al." expression

Carvalho et al. (2003) or (Carvalho et al., 2003)

Copyright Notice

The journal content is authorized under the Creative Commons BY-NC-SA license (summary of the license: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0> | full text of the license: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/legalcode>)

Privacy Statement

The names and email addresses entered in this journal site will be used exclusively for the stated purposes of this journal and is not available for other purposes or to third parties.

8. APÊNDICES

APÊNDICE A – Descrição de resistência a antimicrobianos testados para 89 cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas de mastite em bovinos leiteiros em duas granjas no estado de Goiás.

(continua)

Nº:	Isolado:	SCP/SCN:	MRS:	Resistência Antimicrobiana:
1	873.1	SCP	-	PEN
2	917	SCP	-	PEN
3	1197	SCP	MRS	OXA-PEN-SULT-CLIND-CIP
4	1197.1	SCP	MRS	OXA-PEN-SULT-CLIND-CIP
5	729	SCP	-	PEN
6	852.1	SCP	-	-
7	852.2	SCP	-	SULT
8	423.1	SCN	-	PEN-CLIND
9	423.2	SCN	-	PEN-SULT
10	488.1	SCN	-	-
11	488.2	SCN	-	OXA-PEN
12	527	SCN	-	SULT-PEN
13	527.1	SCN	-	-
14	574.1	SCN	-	PEN
15	574.2	SCN	-	PEN
16	575	SCN	-	SULT
17	625	SCN	-	PEN
18	643	SCN	-	PEN
19	771	SCN	MRS	OXA-PEN
20	772.1	SCN	-	OXA-PEN
21	772.2	SCN	MRS	OXA-PEN
22	778.1	SCN	-	PEN
23	781	SCN	-	PEN
24	782	SCN	MRS	OXA-PEN
25	808	SCN	-	-
26	808.1	SCN	-	-
27	852.3	SCN	-	PEN
28	852.4	SCN	-	SULT
29	852.5	SCN	-	-
30	887.1	SCN	-	-
31	899.2	SCN	-	PEN
32	899.1	SCN	-	-
33	917.1	SCN	-	PEN
34	917.1	SCN	-	SULT
35	917.3	SCN	MRS	OXA-PEN
36	919	SCN	MRS	OXA-PEN
37	921	SCN	MRS	OXA-PEN
38	921.1	SCN	MRS	OXA-PEN
39	921.2	SCN	-	PEN-CLIND-CIP
40	940	SCN	MRS	OXA-PEN
41	943.3	SCN	-	SULT
42	949.1	SCN	-	OXA-PEN-CLIND
43	960	SCN	MRS	OXA-PEN-CLIND
44	989	SCN	-	PEN
45	1012	SCN	MRS	OXA-PEN-SULT
46	1027	SCN	-	OXA-PEN
47	1119	SCN	-	OXA-PEN
48	1135.1	SCN	MRS	OXA-PEN
49	1135.2	SCN	-	OXA-PEN
50	1144	SCN	-	SULT
51	1154.2	SCN	-	-

APÊNDICE A – Descrição de resistência a antimicrobianos testados para 89 cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas de mastite em bovinos leiteiros em duas granjas no estado de Goiás.

(continuação)

Nº:	Isolado:	SCP/SCN:	MRS:	Resistência Antimicrobiana:
52	1157.1	SCN	-	-
53	1157.2	SCN	-	OXA-PEN
54	1157.3	SCN	MRS	OXA-PEN
55	1167.1	SCN	-	PEN
56	1171	SCN	-	-
57	1265.1	SCN	MRS	OXA-PEN-CLIND
58	1265.2	SCN	-	PEN
59	1900	SCN	MRS	OXA-PEN
60	439	SCN	MRS	OXA-PEN
61	481	SCN	MRS	OXA-SULT-PEN
62	486	SCN	-	PEN
63	500	SCN	-	-
64	533.1	SCN	-	OXA-PEN
65	533.2	SCN	-	OXA-PEN
66	639.1	SCN	-	PEN
67	639.1	SCN	-	SULT
68	716	SCN	MRS	OXA-PEN-CLIND
69	739	SCN	MRS	OXA-SULT
70	778	SCN	MRS	CLIND-GEN-SULT-PEN-OXA
71	801.3	SCN	-	SULT-PEN
72	868	SCN	-	-
73	887	SCN	-	-
74	859	SCN	-	-
75	914	SCN	MRS	SULT-CLIND-CIP-PEN-OXA
76	947	SCN	MRS	PEN
77	957	SCN	MRS	OXA-PEN
78	977	SCN	-	-
79	985.1	SCN	-	PEN
80	985.2	SCN	-	PEN
81	1117	SCN	-	-
82	1122	SCN	MRS	OXA-PEN
83	1142	SCN	-	OXA-PEN
84	1142.1	SCN	-	CIP-SULT-PEN-OXA
85	1193.1	SCN	-	OXA-PEN
86	1193.3	SCN	-	OXA-PEN
87	1197.1	SCN	-	CLIND
88	1197.2	SCN	MRS	OXA
89	1262	SCN	-	SULT

SCN: *Staphylococcus* Coagulase Negativo; SCP: *Staphylococcus* Coagulase Positivo; MRS: Metilicina Resistente; CIP: Ciprofloxacina; CLIND: Clindamicina; GEN: Gentamicina; OXA: Oxacilina; PEN: Penicilina; SULT: Sulfazotrim.

APÊNDICE B – Descrição de resistência a antimicrobianos testados para 88 cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas em bovinos leiteiros saudáveis em duas granjas leiteiras no estado de Goiás.

(continua)

Nº:	Isolado:	SCP/SCN:	MRS:	Resistência Antimicrobiana:
1	23.1	SCP	-	OXA
2	140.2	SCP	-	OXA
3	834.1	SCP	-	OXA-GEN
4	834.2	SCP	-	GEN
5	23.2	SCN	-	PEN - OXA
6	23.3	SCN	-	OXA
7	38.1	SCN	-	-
8	38.2	SCN	-	OXA
9	38.3	SCN	-	OXA
10	42.1	SCN	-	PEN - OXA
11	42.2	SCN	-	PEN - OXA
12	42.3	SCN	-	OXA
13	49.1	SCN	-	OXA
14	49.2	SCN	-	OXA
15	49.3	SCN	-	OXA
16	52.1	SCN	-	OXA
17	52.2	SCN	-	OXA
18	52.3	SCN	-	OXA
19	56.1	SCN	-	OXA
20	56.2	SCN	-	PEN - OXA
21	56.3	SCN	-	PEN - OXA
22	57	SCN	-	OXA
23	58.1	SCN	-	PEN - OXA
24	58.2	SCN	-	PEN - OXA
25	58.3	SCN	-	PEN - OXA
26	62.1	SCN	-	OXA
27	62.2	SCN	-	PEN - OXA
28	62.3	SCN	-	OXA
29	140.1	SCN	-	OXA
30	140.3	SCN	-	-
31	831.2	SCN	-	OXA
32	831.3	SCN	-	OXA
33	834.3	SCN	-	OXA-GEN
34	1805.1	SCN	-	OXA
35	1805.2	SCN	-	-
36	1805.3	SCN	-	-
37	2003.1	SCN	-	OXA
38	2003.2	SCN	-	PEN - OXA
39	2003.3	SCN	-	OXA
40	2011.1	SCN	MRS	PEN - OXA
41	2011.2	SCN	-	OXA
42	2011.3	SCN	-	OXA
43	16008.1	SCN	-	OXA
44	16008.2	SCN	-	OXA
45	16008.3	SCN	-	OXA
46	SN.1	SCN	-	PEN - OXA
47	SN.2	SCN	-	OXA
48	SN.3	SCN	-	OXA
49	23.1	SCN	-	-
50	23.2	SCN	-	OXA

APÊNDICE B – Descrição de resistência a antimicrobianos testados para 88 cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas em bovinos leiteiros saudáveis em duas granjas leiteiras no estado de Goiás.

(continuação)

Nº:	Isolado:	SCP/SCN:	MRS:	Resistência Antimicrobiana:
51	23.3	SCN	-	OXA
52	38.1	SCN	-	OXA
53	38.2	SCN	-	PEN-OXA
54	38.3	SCN	-	OXA
55	49.1	SCN	-	OXA
56	49.2	SCN	-	PEN-OXA
57	49.3	SCN	-	OXA
58	56.1	SCN	-	OXA
59	56.2	SCN	-	OXA
60	56.3	SCN	-	OXA
61	811.1	SCN	-	OXA
62	811.2	SCN	-	OXA
63	811.3	SCN	-	OXA
64	831.2	SCN	-	PEN-OXA
65	831.3	SCN	-	PEN-OXA
66	834.1	SCN	-	PEN-OXA
67	834.2	SCN	-	PEN-OXA
68	834.3	SCN	-	PEN-OXA
69	1242.1	SCN	-	PEN-OXA
70	1242.2	SCN	-	PEN-OXA
71	1242.3	SCN	-	PEN-OXA
72	1957.1	SCN	-	PEN-OXA
73	1957.2	SCN	-	PEN-OXA
74	1957.3	SCN	-	PEN-OXA
75	17028.1	SCN	-	PEN-OXA
76	17028.2	SCN	-	PEN-OXA
77	17028.3	SCN	-	PEN-OXA
78	18041.1	SCN	-	PEN-OXA
79	18041.2	SCN	-	PEN-OXA
80	18041.3	SCN	-	PEN-OXA
81	19058.1	SCN	-	PEN-OXA
82	19058.3	SCN	-	PEN-OXA
83	19059.1	SCN	-	PEN-OXA
84	19059.2	SCN	-	PEN-OXA
85	19059.3	SCN	-	PEN-OXA
86	20011.1	SCN	-	PEN-OXA
87	20011.2	SCN	-	OXA
88	20011.3	SCN	-	OXA

SCN: *Staphylococcus* Coagulase Negativo; SCP: *Staphylococcus* Coagulase Positivo; MRS: Meticilina Resistente; OXA: Oxacilina; PEN: Penicilina; GEN: Gentamicina.