



PEDRO FELIPE RODRIGUES E OLIVEIRA

**ESTÁGIO SUPERVISIONADO REALIZADO NA EMBRAPA GADO DE
LEITE NA CIDADE DE JUIZ DE FORA – MG**

ÁREA: MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA, EPIDEMIOLOGIA,
MICROBIOLOGIA, PRODUÇÃO DE LEITE

LAVRAS – MG

2023

PEDRO FELIPE RODRIGUES E OLIVEIRA

**ESTÁGIO SUPERVISIONADO REALIZADO NA EMBRAPA GADO DE
LEITE NA CIDADE DE JUIZ DE FORA – MG**

**ÁREA: MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA, EPIDEMIOLOGIA,
MICROBIOLOGIA, PRODUÇÃO DE LEITE**

Profa. Dra. Elaine Maria Seles Dorneles

Orientadora

Relatório de estágio supervisionado apresentado à
Universidade Federal de Lavras como parte das
exigências do curso de Medicina Veterinária, para
obtenção do título de Bacharel.

LAVRAS – MG

2023

**ESTÁGIO SUPERVISIONADO REALIZADO NA EMBRAPA GADO DE
LEITE NA CIDADE DE JUIZ DE FORA – MG**

**SUPERVISED INTERNSHIP CARRIED OUT AT EMBRAPA DAIRY
CATTLE IN THE CITY OF JUIZ DE FORA – MG**

Relatório de estágio supervisionado
apresentado à Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do Curso de Medicina
Veterinária, para a obtenção do título de
Bacharel.

Aprovado em

Profa. Dra. Elaine Maria Seles Dorneles, UFLA.

Med.Vet. Eduarda Moraes Magossi Silva, UFLA.

Med.Vet. Marcilene Daniel Damasceno, UFLA

Orientadora:

Profa. Dra. Elaine Maria Seles Dorneles

LAVRAS-MG

2023

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Dulce, a melhor professora que alguém poderia ter, me ensinou muito mais do que os conteúdos dos livros e é o modelo do profissional que um dia pretendo ser.

Ao meu pai Cláudio, amigo e modelo, sempre oferecendo uma palavra amiga e um conselho para me ajudar a crescer como ser humano.

Às minhas irmãs Lívia e Isabel, minhas melhores amigas e confidentes, me inspiram muito mais do que podem imaginar.

Aos meus amigos, novos e antigos, por me apoiarem ao longo de toda a graduação, dentro e fora da universidade.

Ao LISASC e seus membros, por me acolherem durante toda a graduação sendo não apenas fonte inestimável de aprendizado e apoio acadêmico, mas também meu lugar preferido da UFLA.

A todos os profissionais e colegas com quem tive a oportunidade de trabalhar e conviver durante os últimos anos, aprendendo novas condutas, novos protocolos e novas formas de lidar com as situações.

Aos grupos de estudo que me permitiram um enorme crescimento, o NEMIV-UFLA, o NERC-UFLA e o NEIMBIO-UFLA. Em especial agradeço ao NESASC-UFLA do qual foi uma honra e um privilégio ter sido presidente.

À Embrapa, por ter me acolher e me ensinar nessa reta final, agradeço imensamente os ensinamentos passados e os amigos que fiz.

À professora Elaine por me orientar e incentivar, não apenas no desenvolvimento deste trabalho, mas durante toda a graduação, sendo uma das influencias mais importantes no meu desenvolvimento profissional.

RESUMO

O estágio supervisionado, componente obrigatório aos graduandos do curso de bacharelado de Medicina Veterinária na Universidade Federal de Lavras (UFLA), compõe a última disciplina do curso, a PRG 107. O período de realização das atividades práticas deve compreender 408 horas mínimas, sendo escolha do discente a área e o local do estágio. O estágio foi realizado na Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora - MG, entre os meses de setembro e novembro de 2023. As atividades foram realizadas nos setores de “Produção e bem-estar animal” e “Saúde animal e qualidade do leite”, e envolveram tanto atividades laboratoriais como diagnósticos bioquímicos e testes de antagonismo, quanto idas a campo para a realização de coleta de amostras biológicas. O estágio foi realizado sob a orientação da Professora Dra. Elaine Maria Seles Dorneles. A possibilidade de desenvolver atividades práticas nas áreas de interesse foi de extrema importância para a formação profissional do discente, permitindo fixar e aprofundar conhecimentos adquiridos durante o curso, além de ter contato com novas metodologias e formas de pensar. O presente relatório tem como objetivo descrever o local de estágio, suas estruturas, funcionamento e atividades acompanhadas durante o período. Inspirado pelas atividades acompanhadas foi realizado também uma revisão de literatura a fim de avaliar casos de resistência em mastite clínica bovina no Brasil dos últimos 20 anos.

ABSTRACT

The supervised internship, a mandatory component for undergraduate students in the Bachelor of Veterinary Medicine program at the Federal University of Lavras (UFLA), constitutes the final course module, PRG 107. The period for practical activities encompasses a minimum of 408 hours, with the student choosing the area and location of the internship. The internship was conducted at Embrapa Gado de Leite in Juiz de Fora - MG, between September and November 2023. Activities took place in the "Animal Production and Welfare" and "Animal Health and Milk Quality" sectors, involving both laboratory activities such as biochemical diagnostics and antagonism tests, and field visits for the collection of biological samples. The internship was conducted under the guidance of Professor Dr. Elaine Maria Seles Dorneles. The opportunity to engage in practical activities in areas of interest was of utmost importance for the student's professional development, allowing for the reinforcement and deepening of knowledge acquired during the course, as well as exposure to new methodologies and ways of thinking. This report aims to describe the internship site, its structures, operations, and activities undertaken during the period. Inspired by the activities observed, a literature review was also conducted to assess cases of resistance in bovine clinical mastitis in Brazil over the past 20 years.

LISTA DE FIGURAS

• FIGURA 1: Área externa da Embrapa Gado de Leite.....	2
• FIGURA 2: Laboratório de microbiologia do leite.....	4
• FIGURA 3: Sala de preparo de meio.....	4
• FIGURA 4: Sala de descarte.....	5
• FIGURA 5: Laboratório de biologia molecular.....	5
• FIGURA 6: Meio MRS.....	7
• FIGURA 7: Meio para estoque de bactérias.....	8
• FIGURA 8: Padrão de estriamento para estoque bacteriano.....	9
• FIGURA 9: Placa com BALs reativadas.....	9
• FIGURA 10: Lâmina corada com coloração de gram.....	12
• FIGURA 11: Teste de catalase.....	12
• FIGURA 12: Teste de bile esculina.....	14
• FIGURA 13: Teste de CAMP.....	14
• FIGURA 14: Teste SIM.....	15
• FIGURA 15: Estufa com material.....	16
• FIGURA 16: Reativação das BALs em ágar MRS.....	17
• FIGURA 17: Jarra de crescimento anaeróbio.....	18
• FIGURA 18: Placa de ágar MRS com spots e identificação de patógeno e enzimas.....	19
• FIGURA 19: Halo de inibição.....	20
• FIGURA 20: Material de coleta.....	21
• FIGURA 21: Escovinha de citologia endometrial.....	22
• FIGURA 22: Coleta da cama do Compost Barn.....	23
• FIGURA 23: Soros aliquotados.....	23

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- Regiões brasileiras e agentes etiológicos abordados nos 7 artigos selecionados...	26
TABELA 2- Número de isolados por agente etiológico.....	26
TABELA 3- Número de isolados resistentes aos antibióticos testados ao longo dos anos.....	27
TABELA 4- 8 dos antimicrobianos com maior número de isolados resistentes em relação a amostras testadas.....	29
TABELA 5- Casos de resistência das 4 espécies bacterianas mais relevantes.....	29

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	1
2.	ESTÁGIO NA EMBRAPA GADO DE LEITE.....	2
2.1.	Descrição	2
2.2.	Instalações	3
2.2.1.	Laboratório de microbiologia do leite	3
2.2.2.	Laboratórios anexos	4
2.3.	Atividades realizadas.....	6
2.3.1.	Preparo de Meios.....	6
2.3.1.1.	Man, Rogosa e Sharpe (MRS)	7
2.3.1.2.	Brain Heart Infusion (BHI)	7
2.3.1.3.	Meio para estoque de bactérias	7
2.3.2.	Manutenção dos estoques dos microrganismos	9
2.3.3.	Preparação de amostras para Maldi-Tof.....	9
2.3.4.	Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	11
2.3.5.	Testes diagnósticos.....	11
2.3.5.1.	Coloração de Gram	11
2.3.5.2.	Teste de catalase	12
2.3.5.3.	Teste de coagulase.....	13
2.3.5.4.	Teste de Voges-Proskauer (VP)	13
2.3.5.5.	Teste de Bile Esculina	13
2.3.5.6.	Teste CAMP	14
2.3.5.7.	Teste de NaCl a 6,5%	15
2.3.5.8.	Teste de Sulfeto, Indol, Motilidade (SIM)	15
2.3.6.	Descarte de materiais	16
2.3.7.	Manutenção dos laboratórios	17
2.3.8.	Antagonismo bacteriano	17
2.3.9	Visitas a fazendas.....	21
2.3.9.1	Coletas	21
3.	Agentes etiológicos e resistência bacteriana em casos de mastite clínica no Brasil: Uma revisão dos últimos 20 anos	25
4	Referencias	32

1. INTRODUÇÃO

Este é um Trabalho de Conclusão de Curso (TCC), que tem como objetivo descrever as atividades desenvolvidas durante o estágio supervisionado, previsto no cronograma da disciplina PRG107. A carga horária total da disciplina é de 476 horas, sendo divididas em 408 horas de atividades práticas e 68 horas destinadas à elaboração do TCC.

A disciplina insere o aluno na rotina de trabalho de áreas específicas, permitindo observar e analisar as condutas e posturas de diferentes profissionais. O contato com novas técnicas permite que surjam novas formas de pensar, além de a supervisão de profissionais capacitados conduzir o discente à execução de metodologias já vistas em teoria em períodos egressos de sua graduação.

A Graduação em Medicina Veterinária contempla diversas áreas de atuação, estando a maioria intimamente relacionadas com a saúde coletiva. Para além das áreas mais populares, como a clínica e a cirurgia de animais domésticos, existem áreas fundamentais ao funcionamento da sociedade e garantia de qualidade de vida para a população, como a pesquisa científica, em especial a voltada à epidemiologia e saúde coletiva.

Nesse contexto, surgem órgãos como a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), uma empresa pública, vinculada ao Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA). A Embrapa oferece oportunidades de estágios em um ambiente voltado à pesquisa nas mais diversas áreas, como reprodução, biologia molecular, genética, microbiologia e muitas outras.

O estágio curricular obrigatório do discente Pedro Felipe Rodrigues e Oliveira foi realizado na Embrapa Gado de Leite – Unidade Juiz de Fora, nas áreas de microbiologia do leite e sanidade animal, entre os meses de setembro e novembro de 2023, com carga horária de 408 horas, como já mencionado.

Este relatório objetiva a apresentação do trabalho realizado na unidade pelo discente nos referidos meses, com descrição dos laboratórios com o qual teve contato, e das atividades realizadas.

2. ESTÁGIO NA EMBRAPA GADO DE LEITE

2.1. Descrição

A Embrapa Gado de Leite, é uma unidade da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, vinculada ao MAPA. Hoje sediada em Juiz de Fora (MG), com campos experimentais em Coronel Pacheco (MG) e Valença (RJ), a unidade foi fundada em 1974. É referência mundial na pesquisa voltada a pecuária leiteira de clima tropical, possuindo diversas áreas de pesquisa, como: Produção vegetal e pastagens, Produção e bem-estar animal, Saúde animal e qualidade do leite e Desenvolvimento socioeconômico da cadeia produtiva do leite.

Esse estágio foi realizado acompanhando as atividades voltadas às áreas de “Produção e bem-estar animal” e “Saúde animal e qualidade do leite”, tanto dentro do laboratório de microbiologia quanto realizando visitas a diferentes fazendas para coleta de material para análise.

Figura 1- Área externa da Embrapa



Fonte: Arquivo pessoal, 2023

2.2. Instalações

A sede da Embrapa Gado de Leite possui salas de trabalho, laboratórios de apoio à pesquisa, casas de vegetação, auditórios, biblioteca e escritórios de parceiros. A infraestrutura conta, ainda, com o Laboratório Multiusuário de Bioeficiência e Sustentabilidade da Pecuária, doze laboratórios de pesquisa, dois laboratórios de prestação de serviço externo, dois Campos Experimentais, quatro Núcleos Avançados de Apoio à Transferência de Tecnologia (Embrapa, 2023).

2.2.1. Laboratório de microbiologia do leite

Este laboratório realiza identificação e caracterização fenotípica e molecular de microrganismos, técnicas de isolamento e caracterização dos patógenos da mastite e de determinação da resistência a antimicrobianos, técnicas para avaliar a qualidade microbiológica do leite, além de realizar a manutenção da Coleção de Microrganismos de Interesse da Agroindústria e Pecuária da Embrapa, como as bactérias ácidos lácticas (BAL), e também inclui patógenos dos animais e contaminantes dos produtos de origem animal (Lange, 2023).

O laboratório conta com 4 salas: sala de entrada (Figura 2, A), é por onde se consegue o acesso ao laboratório, possuindo microscópio, utensílios para realização de coloração de Gram, alguns armários com reagentes e vidrarias, e freezers para armazenamento de meios e de microrganismos. Seguindo pelo laboratório, encontram-se duas salas equipadas com capelas de fluxo laminar (Figura 2, B e C), nas quais ocorrem a maioria das atividades do setor. E última sala (Figura 2, D) compõe uma unidade de armazenamento, que possui freezers e estufas, respectivamente, para armazenamento e cultivo de microrganismos.

Figura 2- Salas do Laboratório da microbiologia do leite



Fonte: Arquivo pessoal, 2023

2.2.2. Laboratórios anexos

Os meios são produzidos na Sala de Preparo de Meios (Figura 3), e nela encontram-se capela com chama, capelas de fluxo laminar, balança de precisão para pesagem dos ingredientes, autoclave para esterilização de material, entre outros instrumentos auxiliares.

Figura 3- Sala de preparo de meio



Fonte: Arquivo pessoal, 2023

Ao lado desta, encontra-se a Sala de Descarte e Limpeza (Figura 4) que conta com tanques e estufa de secagem para limpeza de vidrarias, autoclave “suja” para esterilização de materiais que serão descartados, além de servir como local de armazenamento de materiais de embalagem e de limpeza geral.

Figura 4 – Sala de Descarte e Limpeza



Fonte: Arquivo pessoal, 2023

Por fim, o Laboratório de Biologia Molecular é o último anexo do setor de Microbiologia do Leite (Figura 5, A). Nele são realizados: preparo de gel para eletroforese, reação em cadeia da polimerase (PCR), extrações de DNA, além de possuir sala própria para manipulação de microrganismos geneticamente modificados (B).

Figuras 5 - Laboratório de biologia molecular



Fonte: Arquivo pessoal, 2023

2.3. Atividades realizadas

O estágio foi realizado de segunda a sexta, entre as 8 e 17h, totalizando 40 horas semanais, exceto quando havia feriados. As atividades realizadas durante o período de estágio foram divididas entre o acompanhamento das atividades e projetos realizados dentro do Laboratório de Microbiologia do Leite e visitas a fazendas para coleta de material biológico.

Dentro do Laboratório de Microbiologia do Leite, as atividades variavam de acordo com o tempo disponível semanalmente. Em semanas mais curtas, devido a interrupções por feriados, optavam-se por realizar protocolos mais simples como preparação de amostras para Maldi-Tof e manutenção de estoques, enquanto em semanas completas optava-se por desenvolver protocolos que compreendessem todo o tempo disponível, como os protocolos de antagonismo microbiano.

Atividades como preparo de meios, descarte de materiais e manutenção dos laboratórios ocorreram rotineiramente, enquanto atividades como antibiograma e reação em cadeia da polimerase (PCR) ocorreram de forma esporádica.

2.3.1. Preparo de Meios

Para que as análises microbiológicas tenham resultados seguros e confiáveis, os meios de cultivo utilizados devem ser de qualidade (Alves et al., 2021). Frequentemente, na rotina do laboratório de microbiologia, é necessário que se produzam meios para cultivo de microrganismos provenientes das mais variadas amostras, como leite, sangue, fezes e outros materiais biológicos. Esses meios terão nutrientes básicos para propiciar o desenvolvimento microbiano (Bonnet et al., 2019).

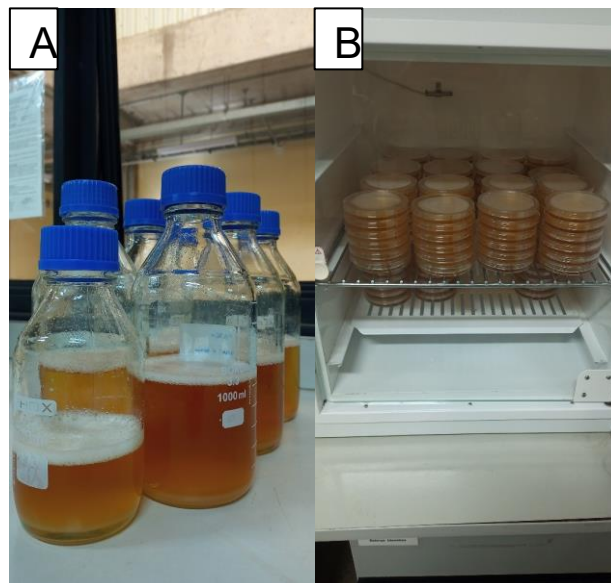
Em função da grande variedade de origens das amostras, e também de objetivos das análises microbiológicas, existem muitos meios que podem ser utilizados na rotina laboratorial. Os meios podem ser usados para favorecer o crescimento microbiano, isolamento de microrganismos, estudo da morfologia de colônias, pesquisa de patogenicidade, antibiograma e pesquisa de atividade bacteriana antagonista (Salvatierra, 2014).

Todos os meios produzidos são esterilizados em autoclave, seguindo o binômio tempo-temperatura de 121°C por 15 minutos, com exceção do meio para estoque, cuja composição não permite autoclavagem por temperaturas tão altas e por tanto tempo.

2.3.1.1. Man, Rogosa e Sharpe (MRS)

Este meio é utilizado para favorecer o desenvolvimento das BAL (De Man et al., 1960). Pode ser preparado na forma de caldo (Figura 6, A) ou Ágar-MRS para ser vertido em placa dentro da capela de fluxo laminar. Quando o meio for vertido em placas de Petri, é necessário que as mesmas pernoitem em estufa a 30°C, para garantir que não houve contaminação ao verter (Figura 6, B).

Figura 6 – MRS Caldo (A) e Ágar-MRS em estufa (B).



Fonte: Arquivo pessoal, 2023

2.3.1.2. Brain Heart Infusion (BHI)

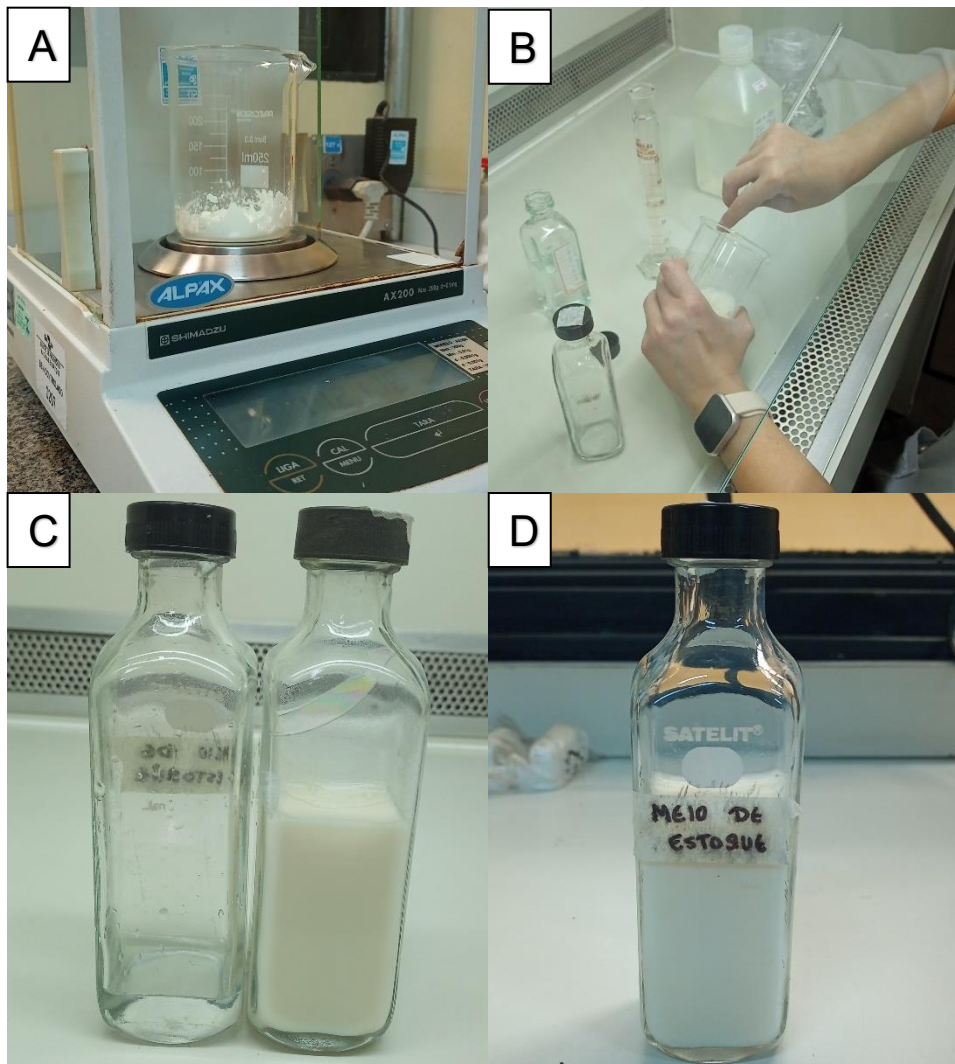
Um meio super nutritivo, derivado de nutrientes do cérebro e coração ideal para o crescimento de qualquer microrganismo, com destaque para os patógenos, como as enterobactérias (Salvatierra, 2014). É produzido como caldo ou semissólido.

2.3.1.3. Meio para estoque de bactérias

Feito com leite desnatado e glicerol, este meio possui uma condição especial de esterilização. Deve ser autoclavado seguindo o binômio de tempo-temperatura de 111°C por 8 minutos, pelo fato de o leite em sua composição sofrer reação de Maillard quando submetido a altas temperaturas por longos períodos, e essa reação origina compostos que interferem na cor do meio e em sua textura, sendo totalmente indesejada (Francisquini et al., 2017).

Os passos para o preparo desse meio envolvem a pesagem do leite em pó desnatado em becker de vidro esterilizado (Figura 7, A), que será misturado a água também esterilizada em capela de fluxo laminar (Figura 7, B). Essa mistura será transferida para recipiente estéril, assim como o glicerol, e ambos seguirão para autoclavagem (Figura 7, C). Por fim, após o tempo na autoclave os recipientes voltam para capela de fluxo laminar, onde serão misturados após breve resfriamento (Figura 7, D).

Figura 7 - Preparo de meio para estoque

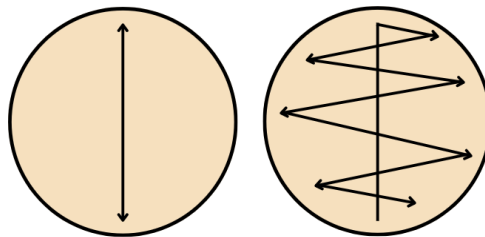


2.3.2. Manutenção dos estoques dos microrganismos

A coleção de microrganismos da Embrapa Gado de Leite é massiva, portanto, é necessário que sempre seja feita sua manutenção, seja de forma a acomodar novas amostras, seja para manter a viabilidade dos microrganismos estocados. Uma forma de garantir que os microrganismos estejam viáveis a longo prazo é através de seu congelamento (Saeki et al.2015).

O preparo do cultivo de uma bactéria ácido láctica de interesse para estoque segue determinados passos. Inicia-se com a passagem de colônias isoladas frescas da BAL em uma placa de Petri com ágar MRS. O padrão de estria pelo meio é: inóculo inicial feito em linha vertical no meio exato da placa de Petri, a partir da qual serão feitas estrias, de forma a obter a maior quantidade de massa possível (Figura 8).

Figura 8 – Padrão de estriamento para estoque bacteriano. -



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023

Essas placas serão então incubadas por 24 horas a temperatura de 35°C. A massa produzida será coletada com alça ou swab e então serão transferidas para tubos Eppendorf, contendo 1 mL do meio de cultivo com glicerol, responsável pela ação crioprotetora, isto é, que impedirá a morte das BAL pelo congelamento (Saeki et al. 2015). As culturas de BAL são estocadas em temperatura de -20°C, em caixas identificadas contendo os tubos.

2.3.3. Preparação de amostras para Maldi-Tof

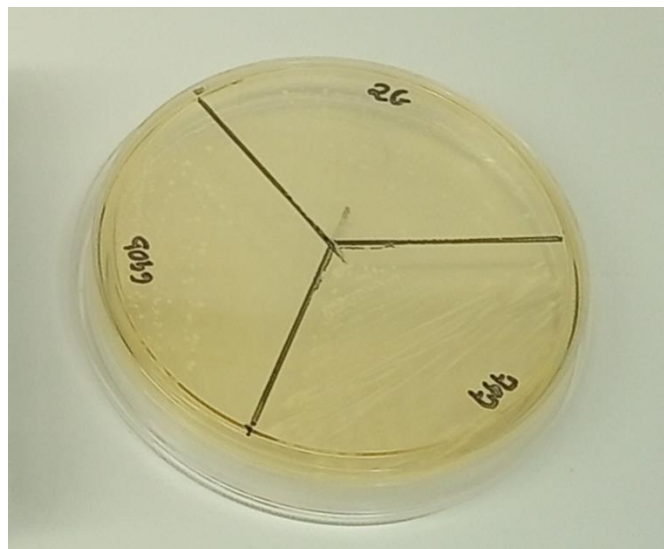
A Espectrometria de Massa por Ionização com Dessorção a Laser Assistida por Matriz e analisador de Tempo de Voo (MALDI-TOF MS, do inglês “Matrix-Assisted Laser

Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry”), é um método rápido e eficiente para identificação bacteriana. A técnica consiste em ionizar compostos, e calcular a razão entre sua carga e massa. Na década de 90, descobriu-se que células bacterianas inteiras produziam, após ionizadas, espectros característicos e reprodutíveis. Desse modo, o método MALDI-TOF é capaz de dar resultados rápidos e assertivos sobre gênero e espécie de microrganismos (Ferreira, 2019).

O MALDI-TOF em si não é realizado na Embrapa Gado de Leite. As amostras de interesse devem ser enviadas para a Embrapa Tabuleiros Costeiros, em Aracaju, Sergipe. Portanto, o preparo das amostras para envio é fundamental para garantir a integridade das mesmas durante o longo trajeto.

As bactérias selecionadas para MALDI-TOF são retiradas da coleção e passadas em placas de MRS para serem reativadas. Em seguida, elas são incubadas em estufa à 35°C por 24 horas. Como o objetivo da técnica é qualitativo, pode-se passar até 8 bactérias na mesma placa, em padrão de estria simples (Figura 9), visto que o objetivo desta sementeira não é obter muita massa, como ocorre nos estoques.

Figura 9– Placa com bactérias ácido lácticas reativadas



Fonte: Arquivo pessoal, 2023

Após incubação, pesquisam-se colônias isoladas e características. Essas colônias serão passadas com auxílio de alça de platina para tubos Eppendorf de 2 mL, que contenham MRS caldo. Os tubos são incubados por 24 horas em estufa a 35°C. Ao fim deste processo, os tubos

serão selados com Parafilm®, uma película flexível, semitransparente, inodora, incolor, com ação aderente, resistente à água e própria para a vedação, e acomodados em estufa de crescimento microbiológico.

2.3.4. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica utilizada para amplificar, isto é, multiplicar segmentos de ácido desoxirribonucleico (DNA) bilhões de vezes. Possui diversas aplicações dentro da biologia molecular, dentre elas a obtenção de DNA para clonagem, sequenciamento genético e para estudos comparativos, como a PCR palindrômica extragênica repetitiva (rep PCR). A rep PCR é conhecida como impressão digital de um genoma, permitindo a comparação entre microrganismos semelhantes (Madigan et al. 2016).

2.3.5. Testes diagnósticos

Embora testes como PCR e MALDI-TOF tenham alta precisão para identificar e/ou comparar microrganismos, a rotina do laboratório de microbiologia do leite necessita de respostas rápidas. Quando algum microrganismo causou dúvidas quanto à sua classificação, foram realizados testes diagnósticos rápidos como coloração de Gram e teste da catalase, cuja execução deu excelentes resultados.

2.3.5.1. Coloração de Gram

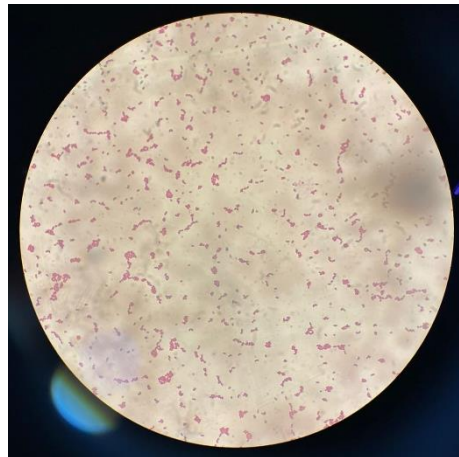
Este teste é uma metodologia tintorial simples, rápida e de baixo custo. Necessita de pouco instrumental e espaço físico para sua execução. Diferencia bactérias Gram-negativas de bactérias Gram-positivas, como as BAL. Nesse caso, quando a coloração de Gram dá resultado negativo, se tem a certeza de que não se trata de uma BAL (Salvatierra, 2014).

No protocolo realizado na Embrapa Gado de Leite, realiza-se um esfregaço do microrganismo que será submetido a coloração em uma lâmina de vidro. Esse esfregaço então receberá uma sequência de banhos. O primeiro banho será com cristal violeta, que permanecerá

por 60 segundos, sendo lavado com água destilada em seguida. O segundo banho será com lugol, que permanecerá por 1 minuto. Depois, deve-se lavar a lâmina com álcool 96%, até que não desprenda mais corante. O terceiro banho será com corante fucsina, que deverá agir por 30 segundos e depois lavado com água.

Após a secagem natural da lâmina, a mesma poderá ser observada em microscópio, na objetiva de 100x, com auxílio de uma gota de óleo de imersão. Os resultados possíveis de se observar são coloração roxa intensa para Gram-positivas e coloração vermelha para Gram-negativas (Figura 10).

Figura 10 – Bactéria Gram-negativa corada.

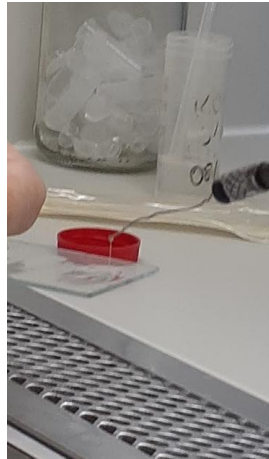


Fonte: Arquivo pessoal, 2023

2.3.5.2. Teste de catalase

Ainda mais simples que a coloração de Gram, o teste da catalase (FIGURA 11) é realizado quando se deseja saber se um microrganismo produz catalase, enzima que cliva o peróxido de hidrogênio, liberando oxigênio molecular. Este teste bioquímico é feito pingando algumas gotas do peróxido em uma placa de Petri com colônias do microrganismo a se pesquisar. A reação positiva é determinada pela efervescência da gota. As BALs não produzem catalase, logo testes positivos acusam que o microrganismo não seja uma delas.

Figura 11- Teste de catalase



Fonte: Arquivo pessoal, 2023

2.3.5.3. Teste de coagulase

O teste de coagulase é empregado para diferenciar *Staphylococcus aureus* de outros estafilococos coagulase-negativos. Baseia-se na capacidade do *S. aureus* em produzir a enzima coagulase, a qual converte o fibrinogênio em fibrina, resultando na formação de um coágulo. A positividade desse teste é indicativa da presença de *S. aureus*.

O teste é feito a partir da inoculação da cepa bacteriana em um tubo contendo plasma sanguíneo coagulase-negativo, seguido pela incubação a 37°C por 4 horas. A formação de um coágulo indica um resultado positivo, sugerindo a presença de *Staphylococcus aureus*.

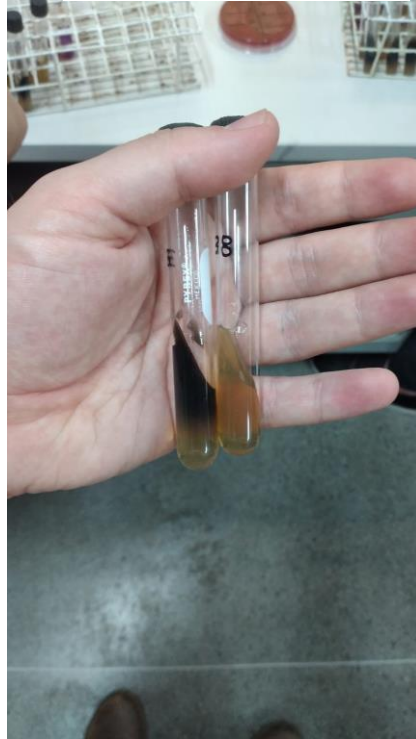
2.3.5.4. Teste de Voges-Proskauer (VP)

O teste VP tem a função de identificar bactérias capazes de metabolizar piruvato, sendo usado para identificar bactérias da ordem *Enterobacterales*, o teste avalia a capacidade de uma cepa bacteriana converter acetoína em diacetil. Envolve a incubação do organismo em meio contendo glicose e a adição subsequente de reagentes específicos, como o reagente Barritt A e B. A formação de uma coloração vermelha é interpretada como positiva para a produção de acetoina.

2.3.5.5. Teste de Bile Esculina

Similar ao teste de esculina (FIGURA 12), a adição de bile neste teste visa inibir o crescimento de organismos não-fecais. A hidrólise da esculina em presença de bile é evidenciada pela formação de um produto escuro.

Figura 12- Teste de Bile- Esculina



Fonte: Arquivo pessoal, 2023

2.3.5.6. Teste CAMP

O teste CAMP (FIGURA 13) é realizado no exame de pesquisa para Streptococcus Beta-hemolítico, o teste visa a identificação de Cepas de *S. agalactiae*. execução do teste envolve semear um swab coletado da gestante em um meio de cultura, de maneira perpendicular ao *S. aureus*, ao lado da linha de controle formada pelo *S. agalactiae*.

O teste de CAMP é considerado positivo quando há a formação de uma figura em flecha ou meia-lua convergindo em direção ao *S. aureus*.

Figura 13 – Teste CAMP



Fonte: Arquivo pessoal, 2023

2.3.5.7. Teste de NaCl a 6,5%

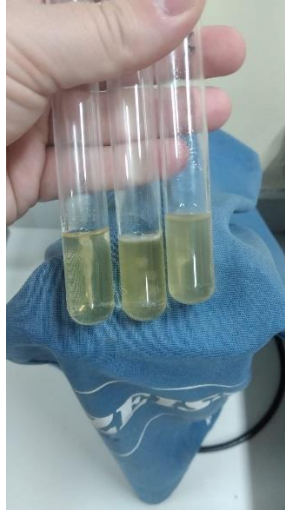
Este teste avalia a tolerância da bactéria ao meio salino, servindo para diferenciar *Enterococcus* spp, que são NaCl 6,5% positivos, de outros *Streptococcus* spp., que são negativos.

Para o teste a cepa bacteriana é inoculada em meio contendo 6,5% de NaCl e incubada a 37°C por 24 horas. O crescimento observado, indica um resultado positivo.

2.3.5.8. Teste de Sulfeto, Indol, Motilidade (SIM)

O teste SIM (FIGURA 14) é composto por três componentes: a detecção de sulfeto de hidrogênio (H₂S), produção de indol e avaliação da motilidade bacteriana. A formação de um anel negro na interface do meio SIM indica a produção de H₂S, a formação de uma coloração rosa após a adição de reagente de Kovacs sugere a produção de indol, e a observação de crescimento radiante a partir do ponto de inoculação indica motilidade bacteriana.

Figura 14- Teste SIM



Fonte: Arquivo pessoal, 2023

2.3.6. Descarte de materiais

A rotina do laboratório de microbiologia do leite culmina com a produção de grande quantidade de material biológico, que deve ser adequadamente tratado e/ou descartado, de modo a evitar contaminações ao meio ambiente, danos à equipe da Embrapa e até mesmo problemas à saúde pública. Entre os materiais produzidos estão: placas de Petri descartáveis cultivadas com patógenos ou BALs, tubos cultivados, materiais de coleta de sangue e outros.

O protocolo para eliminação de riscos biológicos é autoclavagem a 121°C por 20 minutos. Após isso, as placas de Petri descartáveis são acondicionadas em sacos de descarte de material de risco e jogadas em lixo específico. Os tubos de vidro e materiais de coleta tem seu conteúdo descartado na rede de esgoto, sendo deixados de molho em solução com sanitizantes e hipoclorito de sódio por 24 horas, para então serem lavados, enxaguados com água destilada e secados em estufa (Figura 15).

Figura 15- Estufa de materiais



Fonte: Arquivo pessoal, 2023

2.3.7. Manutenção dos laboratórios

Para além das atividades mais complexas e específicas da microbiologia do leite, os laboratórios também demandam de atividades de manutenção, que irão determinar seu funcionamento adequado e harmônico. As capelas de fluxo laminar precisam ser ligadas com antecedência, e o fluxo de ar deve estar ativo enquanto houverem atividades nas mesmas. A interrupção do fluxo, por qualquer tempo que seja, deve ser considerada como contaminação da capela. No início do expediente e após cada interrupção do fluxo, as capelas devem ser esterilizadas com radiação ultravioleta (UV) por 15 minutos, com portas fechadas e sem ninguém presente no ambiente.

Após o uso das capelas, as mesmas devem ser desligadas e higienizadas com álcool 70%. Todos os equipamentos devem ser higienizados e devolvidos ao local adequado de armazenamento.

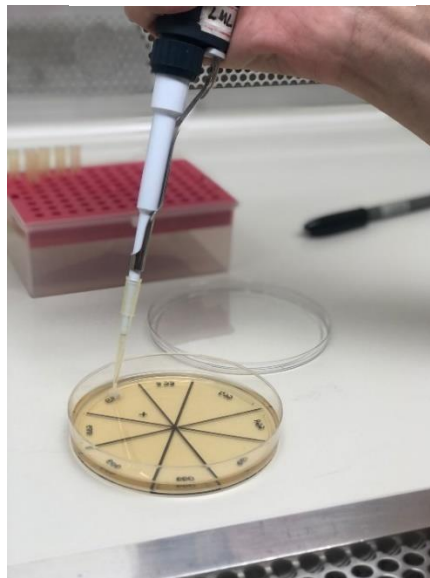
2.3.8. Antagonismo bacteriano

O antagonismo bacteriano foi um dos principais protocolos acompanhados durante o estágio obrigatório. Este protocolo faz parte dos projetos da mestrandia Bruna Vieira Alonso e

da doutoranda Joice Moreira de Fátima, para que elas possam pesquisar BALs com potencial probiótico em suas coleções.

Este protocolo inicia-se as segundas e é finalizado as sextas. Inicia-se com a reativação de bactérias do estoque, que são semeadas em placas de Petri com ágar MRS, em estrias simples (Figura 16). As placas deverão então ser incubadas em estufa a 35°C por 24 horas. Se necessário pode-se utilizar de jarras de anaerobiose, vedadas hermeticamente com as placas e uma vela acesa dentro, que consumirá o oxigênio e propiciará um ambiente ótimo para crescimento das BALs (Figura 17).

Figura 16 – Reativação das BALs em ágar MRS.



Fonte: Arquivo pessoal, 2023

Figura 17 – Jarra de anaerobiose

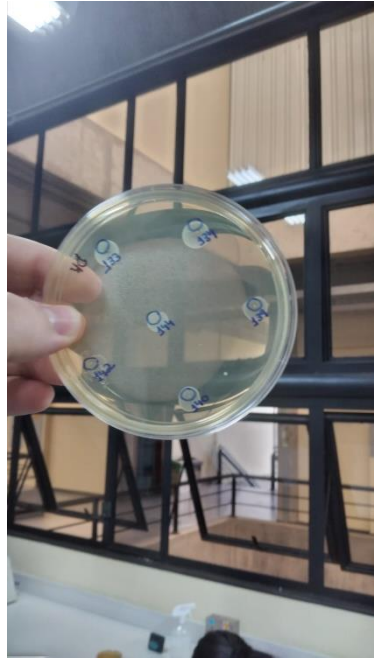


Fonte: Arquivo pessoal, 2023

Às terças-feiras, utilizando alça de platina retiram-se colônias isoladas das placas cultivadas, que são então passadas para tubos Eppendorf identificados contendo 1 mL de MRS caldo. Esses tubos serão incubados por 24 horas em estufa a 35°C, originando uma suspensão bacteriana. Neste dia também é possível marcar em placas de Petri contendo 20 mL de ágar MRS os spots, marcações circulares equidistantes.

Na quarta-feira, deve-se inocular o patógeno que será antagonizado em uma placa com ágar BHI, e incubar por 35°C por 24 horas. As bactérias que foram suspendidas em tubos com MRS caldo serão agora aplicadas na quantidade de 5 µL nos spots previamente marcados, para então serem mais uma vez incubadas a 35°C por 24 horas. Os spots são identificados pelo número da bactéria a ser aplicada nele. As placas deverão identificar o patógeno que será confrontado pelas BALs e as enzimas que serão aplicadas na borda das colônias, nos casos em que se desejar fazer pesquisa das bacteriocinas que essas BALs possam vir a produzir (Figura 18).

Figura 18- Placa de ágar MRS com spots e identificação de patógeno e enzimas

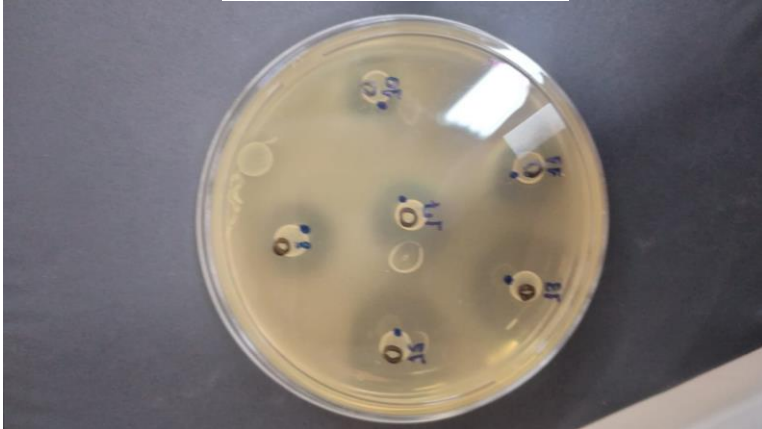


Fonte: Arquivo pessoal, 2023

Na quinta-feira, uma alçada do patógeno cultivado deve ser passada para 10 mL de BHI caldo, para crescer por mais 4 horas a 35°C. Enquanto isso ocorre, as enzimas podem ser aplicadas na borda das colônias nas placas de ágar MRS que contém os spots. Após o crescimento final do patógeno, 100 µL da suspensão do mesmo serão passados para tubos contendo 7 mL de BHI caldo. Estes tubos foram aquecidos até a temperatura de 100°C, com posterior resfriamento até 55°C, quando então foram adicionados de patógeno. Nessa temperatura eles serão vertidos sobre os spots.

Essa placa com patógeno vertido é incubada até a sexta-feira. Neste dia, será observado se houve alguma inibição do crescimento do patógeno próximo aos spots. Caso tenha havido, é possível quantificar através da medição dos halos de inibição, ou seja, das áreas ao redor dos spots onde não houve visualização do desenvolvimento do patógeno (Figura 19). Também será possível observar se a inibição deveu-se ou não à presença de bacteriocinas, através da observação da interrupção do halo de inibição próximo à área onde foram aplicadas as enzimas.

Figura 19- Halo de inibição



Fonte: Arquivo pessoal, 2023

2.3.9 Visitas a fazendas

Além das atividades realizadas no Laboratório de Microbiologia do Leite, também foram realizadas visitas a diferentes propriedades produtoras de leite, que fazem uso do Sistema Compost Barn, em cidades de Minas Gerais. As visitas eram relacionadas ao experimento sendo realizado pelo Dr. Alessandro de Sá Guimarães, preceptor responsável pelo estagiário.

Durante as visitas, foram realizadas coletas de material biológico de vacas em pós-parto, seguindo os seguintes critérios: Os animais deveriam estar entre 3 a 45 dias pós parto; Não poderiam estar sob antibioticoterapia, ou com menos de 10 dias após seu término; Deveriam ter realizado o pré e pós parto exclusivamente dentro do Sistema Compost Barn.

Foram realizadas coletas em 7 diferentes fazendas ao longo do período do estágio, distribuídas em 4 municípios de Minas Gerais, totalizando 97 coletas. Foram desconsiderados retornos às mesmas fazendas e eventuais recoletas necessárias.

2.3.9.1 Coletas

Durante as visitas um número de até 20 animais que obedeciam aos critérios estabelecidos era separado pelos funcionários das fazendas, enquanto o material para coleta era organizado (FIGURA 20).

Figura 20- Material para coleta



Fonte: Arquivo pessoal, 2023

Eram coletados de todos os animais: Sangue; Urina; Escova de citologia endometrial e SWAB vaginal, além de ser realizada a avaliação do escore de sujidade do períneo. Também foram coletadas amostras das camas do pré e pós parto.

Após os animais serem devidamente separados e alinhados para a coleta era avaliado o escore de sujidade do períneo, que consiste em uma avaliação visual e subjetiva. Aos animais era determinado um valor entre 1 e 3: 1 sendo o mais limpo e 3 o mais sujo. Feita a avaliação, era realizada a higienização da área e em seguida o sangue era coletado, utilizando uma agulha estéril puncionava-se a veia coccígea e coletava-se dois tubos a vácuo com EDTA.

Em seguida era coletado o SWAB vaginal. Posteriormente para a coleta de urina, foi feita massagem na região perivulvar do animal, a fim de estimulá-lo a urinar. O material era então coletado em dois tubos Eppendorf de 1,5ml. Por fim, era feita a coleta das escovas de citologia endometrial (FIGURA 21A). Introdz-se um mandril na vagina do animal até ultrapassar o óstio externo da cérvix, e atingir o lúmen uterino. Em seguida expõe-se a escova e a gira três vezes para a obtenção do material. A escova é então retirada e o processo é repetido uma segunda vez. Da primeira escova coletada será feita uma lâmina de citologia, enquanto a segunda é colocada em meio de cultura próprio para transporte (FIGURA 21B).

Figura 21 A – Coleta de escova endometrial



Fonte: Arquivo pessoal, 2023

Figura 21 B – Escova em meio de transporte



Fonte: Arquivo pessoal, 2023

Em seguida era coletado amostras da cama do Compost Barn, dos lotes pré e pós parto (FIGURA 22). As amostras eram coletadas em 5 diferentes pontos do lote, e armazenadas em quatro tubos Falcon de 50ml.

Figura 22- Coleta de cama



Fonte: Arquivo pessoal, 2023

Ao fim da coleta os animais eram retornados aos seus lotes e o material biológico coletado era armazenado em caixas de isopor com gelo para poderem ser transportadas novamente para a sede da Embrapa.

Nos laboratórios as amostras de sangue eram centrifugadas a 2900 RPM a 23 °C por 10 minutos. Em seguida era coletado até 3ml de soro divididos em três tubos Eppendorf de 1,5ml (FIGURA 23).

As amostras eram então adequadamente armazenadas e enviadas para análise.

Figura 23- Soros aliquotados



Fonte: Arquivo pessoal, 2023

3. Agentes etiológicos e resistência bacteriana em casos de mastite clínica no Brasil: Uma revisão dos últimos 20 anos

Introdução

A produção leiteira apresenta grande importância na economia brasileira, com o leite sendo um dos principais produtos da agropecuária nacional. A indústria leiteira tem um impacto significativo no fornecimento de alimentos e questões sociais, gerando empregos e renda, especialmente na região sul do Brasil (Beber et al., 2019).

A mastite representa um grande entrave para a produção, sendo uma das infecções mais comuns e dispendiosas dentro da criação de gado leiteiro. Isso se explica pelo fato de infecções nas glândulas mamárias resultarem em perdas econômicas consideráveis, incluindo redução na produção de leite (mais de 70% dos casos), custos de tratamento veterinário (7%), descarte de leite durante o tratamento (9%), aumento da carga de trabalho (1%) e o descarte prematuro de animais (14%) (Sharma et al., 2012). Ainda há prejuízos nos produtos lácteos devido à redução na qualidade do produto final, diminuição no rendimento industrial para a produção de derivados e alterações na composição do leite afetado pela mastite (Ruegg, 2017).

Além de a doença representar um risco para a saúde humana, tanto pelo consumo direto de leite e derivados contaminados, quanto pela resistência a antimicrobianos que pode ser desenvolvida, dificultando eventuais futuros tratamentos. Para tratar doenças em vacas leiteiras, incluindo a mastite, são utilizadas drogas antimicrobianas. Apesar dos benefícios dessas drogas, há preocupações com os resíduos de antibióticos em alimentos destinados ao consumo humano, provenientes de animais tratados, e o possível desenvolvimento e propagação da resistência antimicrobiana, que poderia impactar o tratamento de doenças (Oliver et al., 2020). A resistência a antibióticos dificulta o tratamento da mastite em vacas. Por isso, é crucial realizar diagnósticos microbiológicos rotineiros, que oferecem resultados rápidos e seguros para identificar problemas no rebanho.

Portanto o isolamento e identificação do agente causador da mastite contribuem para a escolha adequada do tratamento, evitando o desenvolvimento de resistência bacteriana a

antibióticos. Uma estratégia para prevenir essa resistência é conhecer os principais agentes envolvidos na mastite e suas sensibilidades (Karach et al., 2015).

Esta revisão tem como objetivo investigar os microrganismos mais comuns associados à mastite clínica em vacas leiteiras no Brasil. Ela busca compilar dados sobre a ocorrência dos agentes causadores dessa condição e sua sensibilidade a antibióticos nos últimos vinte anos. Essa análise crítica visa fornecer dados epidemiológicos para melhorar o controle da mastite clínica, proporcionando uma visão abrangente dos agentes causadores e da sensibilidade antimicrobiana. Isso, por sua vez, pode contribuir para prevenir a resistência a essa condição.

Metodologia

A presente revisão incluiu artigos estudos observacionais que avaliaram os agentes etiológicos da mastite clínica em bovinos, e sua resistência a antimicrobianos. Os critérios para inclusão foram estudos primários que: (1) fossem relacionados ao tema proposto e estivessem disponíveis para consulta online em bases de artigos usando palavras-chave; (2) publicados entre os anos 2003 e 2023; (3) que abordassem a espécie bovina e (4) que tenham sido realizados no Brasil. Como critérios de exclusão adotou-se: (1) estudos que não especificassem os agentes etiológicos e/ou sua resistência a antimicrobianos; (2) estudos sobre mastite subclínica e/ou que ao longo de seu desenvolvimento não tenham diferenciado os resultados entre mastite clínica e subclínica e (3) estudos secundários.

A pesquisa incluiu artigos de revistas e anais de eventos científicos publicados entre 2003 e 2023 nas bases PubMed e Periódicos CAPES. Em todas as bases foram buscados resultados em inglês, português e espanhol. As palavras-chave utilizadas foram:

- Mastitis AND clinical AND Brazil
- Etiology AND mastitis AND clinical AND Brazil
- Antimicrobial resistance AND mastitis AND Brazil
- Antimicrobials AND mastitis AND Brazil
- Bovine mastitis AND clinical AND Brazil
- Staphylococcus AND clinical AND mastitis AND Brazil
- Streptococcus AND clinical AND mastitis AND Brazil
- Corynebacterium AND clinical AND mastitis AND Brazil
- Milk AND clinical AND mastitis AND Brazil
- Klebsiella AND clinical AND mastitis AND Brazil
- Escherichia coli AND clinical AND mastitis AND Brazil

Os dados extraídos, quando disponíveis, foram: ano de publicação do artigo; ano de coleta das amostras; número de animais; espécies dos agentes etiológicos; método de antibiograma utilizado; antibióticos testados, número de amostras resistentes e amostras multirresistentes e região do país de onde as amostras originaram. Os dados obtidos foram então tabulados e analisados no programa Microsoft Excel®.

Resultados

A busca inicial resultou em 2525 artigos, dos quais 1368 eram primários. Após remover artigos repetidos restaram 423 estudos, dos quais 137 tiveram o título considerado como relevante ao tema proposto. Sete artigos foram selecionados de acordo com os critérios pré-estabelecidos, totalizando 513 isolados de 12 espécies bacterianas diferentes, o número de isolados por agente etiológico pode ser visto na Tabela 2.

Tabela 1- Regiões brasileiras e agentes etiológicos abordados nos 7 artigos selecionados

Condas et al., 2013	Sul / Sudeste	<i>Nocardia nova</i> <i>Nocardia farcinica</i> <i>Nocardia puris</i> <i>Nocardia cyriacigeorgica</i> <i>Nocardia africana</i> <i>Nocardia arthritidis</i> <i>Nocardia veterana</i>
Dorneles et al, 2019	Sudeste	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus coagulase negativa</i>
Tomazi et al., 2019	Sudeste	<i>Streptococcus uberis</i>
Freu et al., 2022	Sudeste	<i>Staphylococcus aureus</i>
Campos et al., 2022	Sul / Sudeste	<i>Escherichia coli</i>
Moraes et al., 2023	Sudeste	<i>Enterococcus spp</i>
Gonçalves et al, 2023	Sudeste	<i>Staphylococcus aureus</i>

Tabela 2- Número de isolados por agente etiológico

Agente etiológico	Número de isolados
<i>Nocardia nova</i>	57

AZTREONAM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	-	7
CEFTAZIDIMA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	-	7
CEFEPIMA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	-	8
CEFOTAXIMA	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	9	-	10
CEFUROXIMA	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14
CLINDAMICINA	-	-	-	-	-	-	13	-	-	-	-	3	16
CEFALEXINA	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16
MARBOFLOXACINA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	17	17
AMOXICILINA/CLAVULANATO	17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	17
CEFALOTINA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	19	-	19
ESTREPTOMICINA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23	-	23
NEOMICINA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	25	25
PENICILINA/NOVOBIOCINA	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	33	-	36
CEFOPERAZONA	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	40
CEFTRIAXONA	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	8	45
CEFOXITINA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	46	47
GENTAMICINA	16	-	-	-	-	-	6	-	-	-	4	24	50
CLOXACILINA	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50
NOVOBIOCINA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	52	52
OXACILINA	-	-	-	-	-	-	8	-	-	-	10	44	62
CEFTIOFUR	-	-	-	-	-	-	30	-	-	-	32	-	62
PIRLIMICINA	-	-	-	-	-	-	32	-	-	-	32	-	64
ERITROMICINA	-	-	-	-	-	-	36	-	-	-	46	4	86
SULFAMETOXAZOL/TRIMETROPINA	39	-	-	-	-	-	52	-	-	-	-	44	135
PENICILINA	-	-	-	-	-	-	65	-	-	-	51	35	151
AMPICILINA	49	-	-	-	-	-	69	-	-	-	55	26	199
TETRACICLINA	-	-	-	-	-	-	108	-	-	-	62	56	226

Os antimicrobianos que apresentaram maior número de isolados resistentes foram: Sulfametoxazol/Trimetropina, com 57,2% dos isolados testados apresentando resistência; Tetraciclina, com 50,8% dos isolados; e Penicilina, com 46,3% dos isolados.

Tabela 4- 8 dos antimicrobianos com maior número de isolados resistentes em relação a amostras testadas

ANTIMICROBIANOS	ISOLADOS RESISTENTES	AMOSTRAS TESTADAS	PERCENTUAL DE RESISTENCIA
CEFTIOFUR	82	461	17,80%
OXACILINA	62	252	24,60%
ERITROMICINA	86	335	25,70%
PIRLIMICINA	64	167	38,30%
AMPICILINA	199	513	38,80%
PENICILINA	151	326	46,30%
TETRACICLINA	226	445	50,80%
SULFAMETOXAZOL/TRIMETROPINA	135	236	57,20%

O agente etiológico com maior número de casos de resistência foi o *Staphylococcus aureus*, com 622 casos, seguido pelo *Enterococcus* spp. com 301 casos de resistência. Como observado na tabela 5.

Tabela 5- Casos de resistência das 4 espécies bacterianas mais relevantes

ANTIBIÓTICO	STAPHYLOCOCCUS AUREUS	STREPTOCOCCUS UBERIS	ESCHERICHIA COLI	ENTEROCOCCUS SPP.
AMPICILINA	121	7	14	-
AZTREONAM	-	-	7	-
CEFALEXINA	-	-	-	8
CEFALOTINA	19	1	-	-
CEFEPIMA	-	-	8	-
CEFOTAXIMA	-	-	9	-
CEFOXITINA	-	-	1	46
CEFTAZIDIMA	-	-	7	6
CEFTIOFUR	26	30	6	-
CEFTRIAXONA	-	-	7	-
CLINDAMICINA	13	-	-	-

ENROFLOXACINA	-	-	-	2
ERITROMICINA	60	23	-	-
ESTREPTOMICINA	-	-	23	-
GENTAMICINA	4	-	4	22
MARBOFLOXACINA	-	-	-	17
NEOMICINA	-	-	-	25
NOVOBIOCINA	-	-	-	52
OXACILINA	14	-	-	42
PENICILINA	135	1	-	7
PENICILINA/NOVOBIOCINA	33	3	-	-
PIRLIMICINA	32	32	-	-
SULFAMETOXAZOL/TRIMETROPINA	44	-	-	44
TETRACICLINA	121	46	21	30
TOTAL	622	143	107	301

Cinco dos sete artigos mencionam casos de multirresistência, com um total de 119 amostras. Sendo estas divididas entre 47 (39,5%) *Enterococcus* spp.; 40 (33,6%) do gênero *Nocardia* spp.; 19 (16%) *Staphylococcus aureus*; 9 (7,6%) *Escherichia coli*; e 4 (3,4%) *Staphylococcus* coagulase negativa.

Conclusão

O estudo da resistência bacteriana a partir de informações publicadas em artigos tem limitações importantes. Entre elas a falta de homogeneidade das amostras tanto em espécies avaliadas quanto na distribuição geográfica e temporal dos estudos, impossibilitando uma amostragem significativa da situação da resistência a antimicrobianos no Brasil ao longo dos anos.

No presente estudo essa limitação se intensifica devido à falta de literatura abordando o tema proposto, limitando consideravelmente as fontes de dados os quais analisar.

Mostra-se, portanto, a necessidade da realização de mais estudos primários sobre o tema.

Referencias para suplementação da tabela 1

CAMPOS, F. C. et al. Genetic and Antimicrobial Resistance Profiles of Mammary Pathogenic *E. coli* (MPEC) Isolates from Bovine Clinical Mastitis. **Pathogens**, v. 11, n. 12, 2022.

CONDAS, L. A. Z. et al. Molecular identification and antimicrobial susceptibility of *Nocardia* spp. isolated from bovine mastitis in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 167, n. 3–4, p. 708–712, 27 dez. 2013.

MORAES, G. N. D. et al. Antimicrobial susceptibility profile of *Enterococcus* species isolated from cows with clinical mastitis and from bulk milk tanks in Brazil. **African Journal of Microbiology Research**, v. 17, n. 2, p. 29–34, 2023.

DORNELES, E. M. S. et al. Genetic diversity and antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* isolates from bovine mastitis in Minas Gerais, Brazil. **MicrobiologyOpen**, v. 8, n. 5, p. 1–7, 2019.

FREU, G. et al. Antimicrobial Resistance and Molecular Characterization of *Staphylococcus aureus* Recovered from Cows with Clinical Mastitis in Dairy Herds from Southeastern Brazil. **Antibiotics**, v. 11, n. 4, 2022.

GONÇALVES, M. S. et al. Genetic diversity and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Minas Gerais, Brazil. **Ciencia Rural**, v. 53, n. 3, 2023.

TOMAZI, T. et al. Genotyping and antimicrobial resistance of *Streptococcus uberis* isolated from bovine clinical mastitis. **PLoS ONE**, v. 14, n. 10, p. 1–15, 2019.

4 Referencias

1. ALVES, S.; DE OLIVEIRA GONDIM, A. L. **Validação de meios de cultura produzidos em laboratório microbiológico industrial**. *Recima21 - Revista Científica Multidisciplinar*, v. 2, n. 2, p. 418–426, 2021. DOI: 10.47820/recima21.v2i2.108. Disponível em: <https://recima21.com.br/index.php/recima21/article/view/108>. Acesso em: 5 nov. 2023.

2. BEBER, Caetano Luiz et al. **Dairy supply chain in Southern Brazil: barriers to competitiveness.** International Food and Agribusiness Management Review, v. 22, n. 5, p. 651-673, 2019.
3. BONNET, M. et al. **Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology.** New Microbes New Infect, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6961714/pdf/main.pdf>. Acesso em: 5 nov. 2023.
4. EMBRAPA. **Infraestrutura.** Portal Embrapa (Versão 3.143.0), 2023(b). Disponível em: <https://www.embrapa.br/gado-de-leite/infraestrutura>. Acesso em: 3 nov. 2023.
5. EMBRAPA. **Sobre a Embrapa.** Portal Embrapa (Versão 3.143.0), 2023(a). Disponível em: <https://www.embrapa.br/sobre-a-embrapa#:~:text=A%20Empresa%20Brasileira%20de%20Pesquisa,agricultura%20e%20pecuária%20genuinamente%20tropical>. Acesso em: 3 nov. 2023.
6. FERREIRA, Marcio Martins Casaes. **Espectrometria de massa (MALDI-TOF MS) aplicada ao laboratório de microbiologia clínica: uma revisão bibliográfica.** 2019.
7. FRANCISQUINI, Júlia d'Almeida et al. **Reação de Maillard: uma revisão.** Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, v. 72, n. 1, p. 48-57, 2017.
8. KARACH, Giovanna Mazur et al. **Perfil bacteriano de culturas de leite na região sudoeste do Paraná.** Archives of Veterinary Science, v. 20, n. 4, 2015.
9. LANGE, C. C. **Laboratório de Microbiologia do Leite.** Portal Embrapa (Versão 3.143.0), 2023. Disponível em: <https://www.embrapa.br/gado-de-leite/infraestrutura/laboratorios/microbiologia-do-leite>. Acesso em: 3 nov. 2023.
10. MADIGAN, Michael T.; MARTINKO, John M.; BENDER, Kelly S.; et al. **Microbiologia de Brock.** Grupo A, 2016. E-book. ISBN 9788582712986. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788582712986/>. Acesso em: 5 nov. 2023.
11. MAN, J. C., ROGOSA, M., & SHARPE, M. E. (1960). **A medium for the cultivation of lactobacilli.** Journal of Applied Bacteriology, 23(1), 130–135. doi:10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x

12. OLIVER, Jason P. et al. **Invited review: Fate of antibiotic residues, antibiotic-resistant bacteria, and antibiotic resistance genes in US dairy manure management systems.** Journal of dairy science, v. 103, n. 2, p. 1051-1071, 2020.
13. RUEGG, Pamela L. **A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention.** Journal of dairy science, v. 100, n. 12, p. 10381-10397, 2017.
14. SAEKI, Erika Kushikawa Saeki. **Eficiência dos crioprotetores glicerol e leite desnatado para o congelamento de micro-organismos.** Acta Veterinaria Brasilica, v. 9, n. 2, p. 195-198, 2015.
15. SALVATIERRA, Clabijo M. **Microbiologia.** Editora Saraiva, 2014. E-book. ISBN 9788536530550. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788536530550/>. Acesso em: 8 nov. 2023.
16. SHARMA, Neelesh et al. **Bovine mastitis: an Asian perspective.** Asian Journal of Animal and Veterinary Advances, v. 7, n. 6, p. 454-476, 2012.