



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

**RELATÓRIO DO ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO (ESO),
REALIZADO NA CLÍNICA VETERINÁRIA CHATTERIE, MUNICÍPIO DE
RECIFE-PE, BRASIL.**

**ALTA FREQUÊNCIA DE GENES DE RESISTÊNCIA À TETRACICLINA EM
Staphylococcus aureus ISOLADOS DE QUEIJO COALHO CAPRINO.**

RENATO AMORIM DA SILVA

RECIFE, 2021



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

**ALTA FREQUÊNCIA DE GENES DE RESISTÊNCIA À TETRACICLINA EM
Staphylococcus aureus ISOLADOS DE QUEIJO COALHO CAPRINO.**

Relatório de Estágio Supervisionado Obrigatório
realizado como exigência parcial para obtenção
do grau de Bacharel em Medicina Veterinária, sob
orientação do Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota

RENATO AMORIM DA SILVA

RECIFE, 2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S586r

Silva, Renato Amorim da

Relatório do estágio supervisionado obrigatório (ESO) realizado na clínica veterinária Chatterie, município de Recife PE, Brasil: Alta frequência de genes de resistência à tetraciclina em *Staphylococcus aureus* isolados de queijo coalho caprino / Renato Amorim da Silva. - 2021.

46 f. : il.

Orientadora: Rinaldo Aparecido Mota.

Inclui referências.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Bacharelado em Medicina Veterinária, Recife, 2021.

1. Patologia Clínica. 2. *Staphylococcus aureus*. 3. Resistência. 4. Saúde única. I. Mota, Rinaldo Aparecido, orient.
II. Título

CDD 636.089



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
Departamento de Medicina Veterinária
Coordenação do Curso de Bacharelado em Medicina Veterinária

FICHA DE AVALIAÇÃO DO RELATÓRIO

I) IDENTIFICAÇÃO DO ALUNO

NOME: Renato Amorim da Silva

CPF: 113.412.854 - 13

II) TÍTULO DO RELATÓRIO:

Relatório de Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO) realizado na Clínica Veterinária Chatterie, município de Recife, Brasil.

Alta frequência de genes de resistência a tetraciclina em *Staphylococcus aureus* isolados de queijo coalho caprino.

IV) BANCA AVALIADORA

MEMBROS:

- | | | |
|---|--|-------------------------|
| 1 | Rinaldo Aparecido Mota | Presidente - Orientador |
| 2 | Breno Bezerra Aragão | Membro Titular 1 |
| 3 | Telga Lucena Alves Craveiro de Almeida | Membro Titular 2 |

V) PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO (Nota de 0 a 10,0 para todos os parâmetros):

1 - APRESENTAÇÃO DO CONTEÚDO DO RELATÓRIO:

1º examinador	2º examinador	3º examinador	MÉDIA
_____	_____	_____	_____

2 - DEFESA ORAL DO CONTEÚDO DO RELATÓRIO:

1º examinador	2º examinador	3º examinador	MÉDIA
_____	_____	_____	_____

3 - ARGUIÇÃO DO CONTEÚDO DO RELATÓRIO:

1º examinador	2º examinador	3º examinador	MÉDIA
_____	_____	_____	_____

VI) MÉDIA FINAL

_____ (_____)

Recife, 06 de dezembro de 2021

PRESIDENTE

MEMBRO TITULAR 1

MEMBRO TITULAR 2

Dedico este trabalho aos meus pais, Valéria Amorim e José Amaro da Silva, a minha madrinha Maria, minha avó Maria de Fátima e aos meus avós Frank Murphy (*in memoriam*), Maria de Salete (*in memoriam*) e Leduar Rocha Filho (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Profundamente em minha consciência, porém por vezes não expresso o suficiente, guardo um sentimento de gratidão e carinho por todos aqueles com os quais cruzei caminhos até a chegada desse momento, em especial sou grato a Deus por todas as oportunidades que tive durante a minha jornada. Sou grato aos meus pais, Valéria e José Amaro, por todo amor, dedicação e carinho investido em mim. Em especial por minha mãe que sempre se mostrou disposta a me estender a mão em qualquer empreitada com apoio inabalável. Tenho certeza que por diversas vezes sua confiança em mim foi maior do que toda confiança que eu tive em minha própria pessoa por todo esse tempo. Frank, seu português estava meio enferrujado nos últimos anos, entretanto você sempre teve muito a dizer, vários conselhos opiniões e ditados em latim os quais já esperavas que eu conhecesse, obrigado por tudo e por sempre ter cuidado de mim do seu jeito. Vovó Salete, fostes um exemplo para mim de alegria e convívio com a natureza, nunca foi difícil notar sua animação e orgulho por também escolher a Rural como casa, lembrarei sempre de sua força, foco e determinação. Vovô Ledu, fostes sempre fonte de sabedoria e conselhos e sua partida deixará sempre um sentimento de saudade, a ti sou grato pelos conselhos dados ao longo dos anos. Vovó Fátima e Maria, minha querida Madrinha, seus sorrisos e humor eternamente contagiosos aqueceram meu coração nos momentos mais tristes, sou grato a vocês pelo exemplo de união frente aos momentos mais difíceis, uma característica compartilhada por toda a família. Posso afirmar que sou e serei sempre grato a todos os meus familiares por quaisquer que tenham sido as formas que exerceram influência em meu caminho, pois sempre me ofereceram aprendizado e quase sempre experiências positivas.

Ao meu orientador, Professor Rinaldo Mota, não posso deixar de dizer palavras de gratidão. Obrigado por toda a orientação que me destes desde a primeira iniciação científica até o momento atual de entrega deste relatório, além disso, espero que não se importe em ter que me aturar por mais alguns anos. Sei que por vezes falhei em diversas áreas como orientado, por isso, sou grato por sempre encontrar uma porta aberta ao diálogo. Obrigado prof.

Aos demais membros do grupo de pesquisa do Laboratório de Doenças Infectocontagiosas (LDIC) da UFRPE sinto um grande carinho. Vocês foram algumas das pessoas mais acolhedoras e gentis que tive a oportunidade de conhecer e sempre me fascinei com a paciência e disposição em repassar não só conhecimento técnico, mas

também conselhos que servem pra construção de um melhor caráter pessoal. Prof. Wilton Júnior, Prof. Erika Samico, Renata (também conhecida como A Chefa), Breno, Jéssica Crasto (Jamais Castro), Denny, Bruno, Polly, Gabriela, Raylson, Samuel, Leonardo, Nazaré, Amanda Silva, Amanda Noronha, Giva, Tânia, Tayzi, Pedro Paulo, Müller, Ceça, Cynthia, Marcus, Pomy, Dona Guiomar e Jônatas vocês foram fundamentais para a experiência maravilhosa que tive na graduação, obrigado. Em especial agradeço a Chefa, Breno e Raylson pelas palavras de sabedoria e os puxões de orelha quando eu precisava me concentrar no que eu estava fazendo, e a Jéssica a eterna parceira de PIBIC e uma dupla certa pra causar arte, porém jamais contaminação de amostras.

Saindo de um grupo de laboratório para agradecer a outro, sinto uma necessidade especial de agradecer a equipe do laboratório Zooanálises por me acolherem de braços abertos e com muita paciência. Telga, Débora, Amanda, Lucas e Denise, vocês foram fundamentais para a conclusão desse relatório e pelo capítulo final da minha graduação. Com vocês aprendi que por vezes nos momentos mais ansiosos devemos fechar os olhos por um período e respirar para conseguir ver com clareza o que nos cerca, nos permitindo tirar soluções dos locais menos esperados. Levarei comigo todo conhecimento que aprendi nesse período com vocês para enfrentar a garrafinha de surpresas que é a vida.

A minha turma de graduação esses queridos indivíduos que compõe a turma SV3, só posso dizer que vocês são pessoas incríveis que já se mostram profissionais extremamente competentes e capacitados. Sinto muito orgulho em poder dizer que dividi a sala de aula com vocês durante esses anos de graduação. Em especial a Thaty e Ramon obrigado por terem me arrastado pra pegar o comprovante de matrícula na primeira semana do primeiro período, foi um passo fundamental para que eu pudesse enfrentar uma extrema timidez. A Ana, Bruna, Diogo, Manoel, Maria Islane, Mayara, Raissa (A infiltrada da SV1), Ramon, Raquel e Thaty, obrigado. Gostaria também de agradecer a Nathalia, Gabriela Lima, Evelyn e Flavia. Apesar de que no papel vocês tenham deixado de pertencer a mesma turma que eu sempre me recordarei dos momentos que passamos em sala. A turma SV1, desejo tudo de bom em especial a Matheus, Thomás, Ana Carmen, Carol e Cristiano, ótimas pessoas para uma partida de UNO.

A todos que tive a oportunidade de conhecer durante a minha estadia no Hovet, Claudinha, Sandrinha, Irmã, Japa, Cleidinha, Anderson e Seu Ricardo obrigado. Vocês são pessoas maravilhosas que tem meu eterno carinho e apreço.

Por fim agradeço a ele que apareceu apenas em meu último ano de graduação, meu filho de 4 patas, Kerberos por atuar perfeitamente bem como um ombro para chorar e abraçar nas horas que preciso de calma, mesmo que as vezes seja apenas para roubar comida do meu prato. Te adoro Criatura.

"Nada o que acontece é esquecido para sempre, mesmo que não consiga lembrar."

(A Viagem de Chihiro – Hayao Miyazaki)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO I

- Figura 1** Fotomicrografia de lâmina hematológica com presença de inclusão eosinofílica no interior de um linfócito compatível com Corpúsculo de Lentz (seta). É possível também notar ao fundo da lâmina a formação em fileira dos eritrócitos compatível com Roleaux. Corante: Panótico Rápido, aumento 1000x – SILVA, R.A., 2021. 23
- Figura 2:** Presença de células redondas com citoplasma intensamente basofílico e com intensa presença de grânulos intracelulares. Podem também ser observados grânulos livres. Fundo de lâmina basofílico com presença de eritrócitos. Aumento 1000X, objetiva de imersão. Coloração: Panótico Rápido – SILVA, R.A., 2021. 26
- Figura 3:** Lâminas de citologia contendo estruturas leveduriformes encapsuladas compatíveis com *Sporothrix* spp. Na figura 4 pode-se notar a presença das estruturas no interior de um macrófago. *Imprinting* de lesão. Corante – Panótico Rápido, aumento 1000x – SILVA, R.A., 2021. 27
- Figura 4:** Lâminas de citologia contendo estruturas leveduriformes encapsuladas compatíveis com *Sporothrix* spp. Na figura 4 pode-se notar a presença das estruturas no interior de um macrófago. *Imprinting* de lesão. Corante – Panótico Rápido, aumento 1000x – SILVA, R.A., 2021. 27
- Figura 5** Fotomicrografia de lâmina de sangue. É possível observar um leucócito contendo um gamonte de *Hepatozoon* spp. Corante: Panótico Rápido, aumento 1000x. SILVA, R.A., 2021. 28
- 1
- Figura 6** Raspado de pele. No centro da figura pode-se observar a presença de um ácaro com morfologia compatível com a espécie *Sarcoptes scabiei* – SILVA, R.A., 2021. 30

Gráfico 1	Amostras recebidas pelo laboratório durante o período de vigência no do estágio para análise citológica	27
------------------	---	----

CAPÍTULO II

Figura 1	Mapa de distribuição das propriedades das quais foram obtidos os isolados no estudo.	34
-----------------	--	----

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1	Amostras citológicas segundo erros pré-analíticos observados durante o período do ESO.	25
-----------------	--	----

CAPÍTULO II

Tabela 1	Genes, sequência de oligonucleotídeos e tamanho do fragmento de DNA.	35
-----------------	--	----

LISTA DE ABREVIACÕES

- ALT** – Alanina aminotransferase
- AST** – Aspartato aminotransferase
- BHI** – Brain Heart Infusion
- Ca** - Cálcio
- C°** - Graus Célsius
- Cl** - Cloro
- DNA** – Ácido Desoxirribonucleico
- EDTA** – Ácido etilenodiaminotetracético
- FA** – Fosfatase Alcalina
- g/dL** – Gramas por decilitro
- GGT** – Gama Glutamiltransferase
- Ht** - Hematócrito
- K** - Potássio
- mg/dL** – miligramas por decilitro
- ng/μL** – nanogramas por microlitro
- Na** – Sódio
- P** – Fósforo
- PAAF** – Punção Aspirativa por Agulha Fina
- PCR** – Reação em Cadeia da Polimerase
- Ppt** – Proteínas Plasmáticas Totais
- Rpm** – Rotações por minuto
- SDMA** – Dimetilarginina simétrica
- TP** – Tempo de protrombina
- TTPa** – Tempo de tromboplastina parcial ativada

RESUMO

O diagnóstico laboratorial se mostra como importante e eficaz ferramenta para a conclusão de diagnósticos em casos clínicos. Dentre diversos setores laboratoriais os quais incluem a microbiologia, parasitologia e patologia animal, o setor que tem uma maior rotina de diagnóstico é o de patologia clínica. O Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO) foi realizado no laboratório Zooanálises, na Clínica Veterinária Chatterrie, no período compreendido entre 19 de abril de 2021 a 05 de julho de 2021. O estágio teve o intuito de aprimorar os conhecimentos do discente no âmbito da patologia clínica veterinária, mais especificamente, na obtenção de habilidades e desenvolvimento de conhecimento técnico na realização de diagnóstico laboratorial, permitindo assim, a conclusão do curso e a obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária. Durante o período de vivência, o discente desenvolveu atividades com hematologia, bioquímica sérica, citologia, testes imunocromatográficos e parasitologia. Além do relatado, também foi possível desenvolver o estudo intitulado: “Alta frequência de genes de resistência a tetraciclinas em *Staphylococcus aureus* isolados de queijo coalho caprino.”

Palavras-chave: Patologia clínica, *Staphylococcus aureus*, Resistência, Saúde única

ABSTRACT

Laboratory diagnosis proves to be an important and effective tool for concluding diagnoses in clinical cases. Among several laboratory sectors which include microbiology, parasitology and animal pathology, the sector that has the greatest diagnostic routine is that of clinical pathology. The Mandatory Supervised Internship (ESO) was carried out in the Zooanálises laboratory, at the Chatterrie Veterinary Clinic, from April 19, 2021 to July 5, 2021. The internship was intended to improve the student's knowledge in the context of clinical veterinarian pathology, specifically, in obtaining skills and developing technical knowledge in carrying out laboratory diagnosis, thus allowing the conclusion of the course and obtaining the title of Bachelor of Veterinary Medicine. During the internship, the student developed activities with hematology, serum biochemistry, cytology, immunochromatographic tests and parasitology. In addition to what was reported, it was also possible to develop the study entitled: "High frequency of tetracycline resistance genes in *Staphylococcus aureus* isolated from goat coalho cheese".

Key-words: Clinical Pathology, *Staphylococcus aureus*, Resistance, One-health

SUMÁRIO

1. CAPÍTULO I	14
1.1 INTRODUÇÃO	14
1.2 DESCRIÇÃO DO LOCAL DO ESTÁGIO	14
1.3 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS	15
1.3.1 Recebimento de amostras	15
1.3.2 Hematologia	16
1.3.3 Bioquímica sérica	17
1.3.4 Coagulograma	19
1.3.5 Citologia	20
1.3.6 Exames parasitológicos	20
1.4 DISCUSSÃO DAS ATIVIDADES	20
2. CAPÍTULO II	30
2.1 INTRODUÇÃO	31
2.2 METODOLOGIA	33
2.3 RESULTADOS	35
2.4 DISCUSSÃO	35
2.5 CONCLUSÃO	38
2.6 REFERÊNCIAS	39
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	43
4. REFERÊNCIAS	44

CAPÍTULO I

Relatório do Estágio Supervisionado Obrigatório realizado na Clínica Veterinária Chatterie, Recife, Pernambuco-Brasil.

1.1 INTRODUÇÃO

O Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO) foi realizado pelo discente Renato Amorim da Silva como requisito para conclusão do curso de Bacharelado em Medicina Veterinária pela UFRPE (campus Recife), na clínica veterinária Chatterie, mais especificamente no laboratório Zooanálises. O estágio foi realizado no período entre os dias 19 de abril de 2021 e 05 julho do ano de 2021 sob a supervisão da Médica Veterinária Telga Lucena Alves Craveiro de Almeida. As atividades realizadas no estágio tiveram como objetivo capacitar o discente nas atividades associadas à Patologia Clínica Veterinária, em outras palavras, aprimorar e conhecer em técnicas e habilidades empregadas na rotina do patologista clínico para realização do suporte diagnóstico. Tais habilidades são essenciais e edificantes na construção profissional e, portanto, são de interesse para a conclusão do curso e obtenção do grau de Bacharelado em Medicina Veterinária.

1.2 LOCAL DO ESTÁGIO

O laboratório de Patologia Clínica Veterinária Zooanálises se localiza no interior da clínica veterinária exclusiva de felinos Chatterie, localizada na rua Manoel Bezerra, nº 189, Madalena Recife/PE (CEP: 50.610-250). O laboratório conta com um espaço destinado a realização das atividades de patologia clínica, citologia e testes de imunocromatografia.

O laboratório conta com dois microscópios, duas máquinas para exames bioquímicos (Bioplus 200® e Idexx Catalyst One®), uma máquina de coagulograma (CLOTimer®), macro e micro centrífugas, banho maria, além de uma geladeira e freezer para acondicionamento de reagentes, testes imunocromatográficos e amostras.

A rotina laboratorial envolve amostras provenientes da clínica Chatterie, bem como amostras de outras clínicas veterinárias na região metropolitana do

Recife e município de Vitória de Santo Antão. As amostras externas são enviadas por um sistema de busca no qual um funcionário visita as clínicas solicitantes, acondiciona as amostras e as direciona para o laboratório.

1.3 ATIVIDADES DE ESTÁGIO

Previamente ao início das atividades do Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO), foi estabelecido pela clínica e pela supervisora do estágio as medidas tomadas no que se refere a prevenção da transmissão da COVID-19 durante o tempo de duração do estágio. As medidas incluíam o uso constante de máscara, dando-se preferência a máscaras do tipo N-95, higienização das mãos com sabão e água corrente ou álcool a 70%, sempre que possível. Além disso, o número de pessoas permitidas no recinto foi limitado, buscando evitar a ocorrência de aglomerações.

As atividades referentes ao ESO foram realizadas no período de segunda a sexta-feira, totalizando 420 horas de estágio. Tais atividades foram divididas em: atividades de hematologia e bioquímica sérica veterinária, citologia, parasitologia, imunocromatografia e urinálise que compõem o conjunto de técnicas que um médico veterinário deve ter conhecimento e prática ao trabalhar no âmbito da Patologia Clínica.

O desenvolvimento das atividades foi realizado mediante o acompanhamento da rotina laboratorial e as atividades na área de hematologia, bioquímica sérica e urinálise foram as mais frequentes durante as atividades.

1.3.1 Recebimento das amostras

Toda amostra recebida pelo laboratório é inicialmente registrada e avaliada quanto sua qualidade e viabilidade de análise. O registro é feito a partir das informações advindas da requisição que acompanha cada amostra, na qual deve constar o nome do animal, idade do animal, espécie, raça, nome do tutor do animal, nome e carimbo do veterinário solicitante e, por fim, os exames a serem realizados com a amostra designada.

Após o registro das amostras na planilha de controle do laboratório, as amostras são separadas e destinadas a realização dos exames solicitados. Vale salientar que a identificação de tubos ou quaisquer recipientes destinados a abrigar a amostra deve ser previamente identificado pelo veterinário solicitante e a responsabilidade por erros de análise referentes à identificação incorreta dessas amostras sendo unicamente deste.

1.3.2 HEMATOLOGIA

No que se diz respeito aos exames hematológicos, o hemograma mostra-se como o exame mais rotineiramente requisitado na clínica veterinária. Durante o período do estágio supervisionado foram solicitados um total de 1.231 hemogramas.

A amostra avaliada em questão é o sangue, no qual inicialmente se verifica a presença ou ausência de coágulos. Visto que a formação de coágulos não apenas mascara a quantidade de plaquetas, como também reduz a quantidade de hemácias e células de linhagem leucocitária; as amostras que apresentam coágulos são consideradas impróprias para análise e, portanto, não se prossegue com a finalização do hemograma.

Na ausência de coágulos é realizado o hemograma. Inicialmente o sangue é homogeneizado e então é preenchido um tubo capilar que é posteriormente selado para avaliação do hematócrito (Ht) do paciente. O hematócrito é avaliado após a centrifugação do tubo capilar em microcentrífuga por 5 minutos na rotação de 5.000 rpm. A força centrífuga exercida pelo equipamento permite a compactação dos eritrócitos e a separação do plasma, e, dessa forma é possível comparar o volume expreso pelos eritrócitos na alíquota de sangue avaliada, sendo o valor expreso em percentual. Além do valor de hematócrito, a centrifugação em tubo capilar permite também obter a avaliação das proteínas plasmáticas totais (PPt) a partir da avaliação do plasma por refratômetro, permitindo obter o valor expreso em gramas por decilitro (g/dL) e uma análise qualitativa do plasma quanto a sua coloração.

Com outra alíquota de sangue é realizado o esfregaço sanguíneo, técnica de suma importância para a realização de um hemograma de qualidade, dado que é a partir da análise em lâmina que o patologista clínico é capaz de avaliar e relatar

alterações morfológicas nas células sanguíneas. A técnica do esfregaço consiste em depositar uma gota de sangue em uma lâmina de vidro, em seguida, utilizando o lado de menor comprimento de outra lâmina ou com um instrumento próprio para realização do esfregaço, fazer um movimento retrógrado pela lâmina até ter contato com a gota de sangue. Com movimentos suaves deve-se espalhar a gota de um lado ao outro da lâmina de vidro e então, em um único movimento, realizar o estiraço numa angulação de 45 graus.

Após realizar o estiraço, deve-se esperar a lâmina secar para então submetê-la ao processo de coloração com o Panótico Rápido (DiffQuick®). Para isso, as lâminas são fixadas na solução de fixação ou em Metanol e então coradas na sequência de corante eosinofílico e basofílico. Cada passo do processo é feito em 10 segundos ou 10 mergulhos da lâmina por solução, então as lâminas são lavadas em água corrente para remoção do corante residual e secas para leitura.

A contagem de leucócitos é realizada pelo método manual de contagem. Dessa forma, são diluídos 10 µl de sangue total em 200µl de líquido de Turk ou ácido acético a 4%. Após a diluição, as células são contadas manualmente na objetiva de 10x na câmara de Neubauer nos quadrantes destinados à contagem de leucócitos. Após a contagem multiplica-se o valor obtido pelo fator da câmara de Neubauer e fator de diluição para se obter a contagem global de leucócitos. A contagem diferencial dos leucócitos é realizada na lâmina do esfregaço sanguíneo com o auxílio de um contador celular. Os leucócitos são contados até a marcação de 100 células de linhagem leucocitária contadas, sendo o valor de cada célula obtida usado como valor relativo percentual. Para obter o valor absoluto diferencial dos leucócitos se multiplica o valor relativo percentual pelo valor obtido na contagem global de leucócitos.

Por fim, a contagem e avaliação das plaquetas é realizada de forma manual através da contagem em 4 campos na lâmina do estiraço sanguíneo; esse valor é então multiplicado pelo valor total das hemácias para se obter o valor total das plaquetas. Além da contagem as plaquetas são avaliadas morfológicamente quanto o seu tamanho, presença de inclusões, formação de agregados e se apresentam-se ou não em seu estado ativado.

1.3.2 BIOQUÍMICA SÉRICA

Para realizar a análise e quantificação de parâmetros de importância clínica na bioquímica sérica emprega-se principalmente a avaliação por espectrofotometria. Um total de 688 amostras foram enviadas durante o período de realização do estágio para a avaliação de algum parâmetro bioquímico. As amostras ideais são aquelas que são entregues ao laboratório em tubos sem EDTA com ativador de coágulo e tubos com gel separador de coágulo. Uma vez que ocorra a estabilização do coágulo sanguíneo, as amostras são submetidas a centrifugação na macrocentrífuga na velocidade de 5.000 rpm por 5 minutos; isso permite que o soro seja separado dos outros elementos contidos no tubo e assim analisado sem interferência dos outros componentes sanguíneos.

Vale salientar que a qualidade do soro é fundamental para obtenção de resultados confiáveis, uma vez que a presença de pigmentos portanto, amostras que apresentam soro hemolisado, icterico ou lipêmico podem apresentar alterações na leitura ou mesmo ter a sua análise inviabilizada. O laboratório conta com duas máquinas destinadas a avaliação de marcadores de bioquímica sérica, um BioPlus 200® e um aparelho IDEXX Catalyst One®.

Os exames ofertados pelo laboratório incluem a dosagem de ureia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), γ -glutamilttransferase (GGT), proteínas séricas totais, albumina sérica, globulina, glicose, dosagem de bilirrubinas (Total, direta e indireta), colesterol, triglicerídeos, dosagem de Fósforo (P), dosagem de Cálcio (Ca), dosagem de Potássio (K), dosagem de cloro (Cl), dosagem de sódio (Na), frutossamina, dosagem de dimetilarginina simétrica (SDMA), proteína urinária e creatinina urinária.

1.3.3 COAGULOGRAMA

Durante o período de ESO foram realizados 09 exames de coagulograma, nos quais estão incluídos o TP, TTPA e quantificação do fibrinogênio plasmático. O teste é realizado em máquina CLOTimer® com o auxílio de agitador magnético. O exame de coagulograma tem o intuito de determinar a capacidade de hemostasia de um paciente. O tubo preferencial para a coleta é com citrato. Os testes de tempo de protrombina (TP) e tempo de trombroplastina parcial ativado (TTPA) são utilizados

para avaliação da hemostasia pré-cirúrgica de pacientes. Esses testes apresentarão valores alterados quando há deficiência dos fatores de coagulação, seja por consumo excessivo ou inibição de sua síntese. Os testes são realizados na temperatura de 37°C e segundo a metodologia estabelecida pelo fabricante.

1.3.5 CITOLOGIA

A citologia representa um importante método diagnóstico, tanto presuntivo como definitivo em determinados casos. A análise citológica inicia-se a partir do preparo do esfregaço do material em lâminas de vidro. Durante o período de estágio foram realizados 39 exames citológico. Dos 39 exames requisitados 17 foram para pesquisa de *Sporothrix* spp., 12 para avaliação citológica de cerúmen, 07 para citologia de pele e 03 amostras de citologia de neoplasias. Em geral, as amostras destinadas à avaliação citológica são enviadas ao laboratório já em esfregaço ou *imprinting* em lâmina de vidro, sendo necessário apenas corar a amostra.

As amostras são coradas com o corante Panóptico rápido (DiffQuick®), assim como na técnica usada na avaliação hematológica. Entretanto, o corante utilizado na citologia é separado do utilizado na hematologia como medida preventiva contra a contaminação do esfregaço sanguíneo com debris e microrganismos provenientes das lâminas citológicas.

Após o processo de coloração das lâminas essas são avaliadas quanto o grau de celularidade da amostra, tipo predominante celular, presença de agentes infecciosos (leveduras compatíveis com fungos do complexo *Sporothrix* spp. (composto por *S. schenckii*, *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. albicans* e *S. mexicana*) (OLIVEIRA et al. 2015), *Malassezia* spp., presença e quantidade de bactérias) e morfologia das células presentes.

1.3.6 EXAMES PARASITOLÓGICOS

Os exames parasitológicos realizados no laboratório são a técnica de flutuação de Willis-Mollay (WILLIS-MOLLAY, 1921) para o exame

parasitológico de fezes, o raspado de pele para o exame de parasitos que acometem o sistema cutâneo e a pesquisa de hematozoários, onde se avalia a presença de hemoparasitos no esfregaço sanguíneo dos animais. Além destes, alguns testes rápidos imunocromatográficos e testes rápidos tipo ELISA são também empregados no diagnóstico das enfermidades parasitárias. O todo foi realizado 160 exames parasitológicos durante o período de vigência do estágio

O exame parasitológico das fezes é realizado pela técnica de Willis. Essa técnica se baseia no princípio da flutuação dos ovos de helmintos e oocistos de protozoários em um meio líquido de elevada densidade. A alta densidade do meio pode ser alcançada pela adição de cloreto de sódio (NaCl) ou pela adição de açúcares até a obtenção de uma solução hipersaturada.

As fezes são homogeneizadas com a solução hipersaturada e então filtradas com gaze para remoção da massa fecal excedente. A solução filtrada é então transferida para um tubo de ensaio, o qual é preenchido em sua totalidade até a formação de um menisco em sua parte superior. Uma lamínula é depositada na parte superior desse tubo a qual os ovos e oocistos devem se aderir durante a flutuação. Após 5 minutos a lamínula é avaliada por microscopia na objetiva de 10x e 40x.

1.4 DISCUSSÃO DAS ATIVIDADES

Hematologia e bioquímica sérica

As amostras direcionadas para a avaliação hematológica e de parâmetros bioquímicos comumente vêm em associação. Dos 1.231 hemogramas solicitados durante o período do estágio, 595 vieram acompanhados também da solicitação de algum parâmetro bioquímico, além de 93 amostras direcionadas unicamente para bioquímica sérica, totalizando 688 amostras as quais tiveram a análise de algum parâmetro bioquímico. Frequentemente os parâmetros solicitados envolviam marcadores de função renal (ureia, creatinina e ocasionalmente SDMA) e marcadores de função hepática (ALT e AST).

O eritrograma e o leucograma são importantes exames que em conjunto compõem o hemograma, consideravelmente o exame laboratorial mais solicitado na clínica veterinária e utilizado no acompanhamento de pacientes (THRALL et al.,

2015; CARMO et al., 2020). O eritrograma refere-se à avaliação qualitativa e quantitativa dos eritrócitos, também referidos como série vermelha, enquanto o leucograma se refere a análise quantitativa e qualitativa dos leucócitos além de sua classificação quanto as populações diferenciais dos leucócitos em neutrófilos (Segmentados e Bastonetes), eosinófilos, linfócitos, monócitos e basófilos (GONZALES; SILVA, 2008).

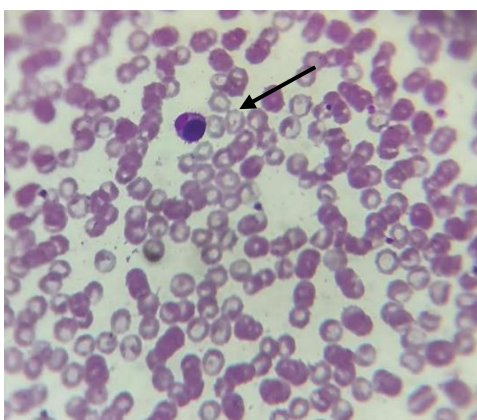
Por vezes o hemograma fornece informações relevantes sobre o estado de saúde do paciente antes mesmo da ocorrência de sinais clínicos notáveis. Os valores numéricos e morfologia de leucócitos observados no leucograma podem decorrer por diferentes variáveis, desde a ocorrência de estresse ao animal, existência de agentes infecciosos ou mesmo afecções de caráter neoplásico. Alterações observadas no eritrograma podem ofertar diversas informações ao estado de saúde do animal, desde uma possível deficiência no consumo ou absorção de Ferro, nos casos em que observa hipocromia (CARMO et al., 2020), sinais de dano ou perda dos eritrócitos, em casos de consumo dos eritrócitos por neoformações, hemoparasitoses ou afecções imunomediadas (THRALL et al, 2015) ou mesmo a existência de sinais de resposta medular frente a depleção de eritrócitos, como no caso de presença de corpúsculos de Howell-Jolly e policromasia (BLACKWELL, 2011).

Na análise da lâmina dos esfregaços sanguíneos, as células foram avaliadas quanto a sua morfologia e arranjos formados. Toda alteração de significância clínica é anotada e relatada no laudo. As alterações eritrocitárias podem variar de em classificação como de coloração ou de morfologia celular (BLACKWELL, 2011). As alterações de maior frequência nas amostras analisadas no período do estágio foram alterações de coloração dos eritrócitos (Policromasia e Hipocromia), alterações de morfologia (Anisocitose) e alterações de arranjo (formação de Roleaux).

Além dos eritrócitos, avaliou-se também a morfologia dos leucócitos quanto a sinais de ativação, toxicidade, inclusões virais ou parasitárias e presença de células não maduras. Alterações referentes a toxicidade nos leucócitos ou sua ativação podem ser presenciadas em processos inflamatório ou infeccioso (THRALL et al., 2015), e tais alterações foram notadas em algumas ocasiões associada com intensa leucocitose e presença de desvio neutrofílico à esquerda, sugerindo a ocorrência de processos infecciosos em ambos os casos. Em alguns

casos foi possível observar a presença de inclusões virais no citoplasma de linfócitos (figura 1). Nota-se também na figura a formação de arranjos de hemácias em cadeia compatível com a formação de Roleaux, que pode ser por vezes observada acompanhando uma resposta inflamatória (BLACKWELL, 2011).

Figura 1: Fotomicrografia de lâmina hematológica com presença de inclusão eosinofílica no interior de um linfócito compatível com Corpúsculo de Lentz (seta). É possível também notar ao fundo da lâmina a formação em fileira dos eritrócitos compatível com Roleaux. Corante: Panótico Rápido, aumento 1000x – SILVA, R.A., 2021.



Coagulograma

O uso do coagulograma se deu principalmente como ferramenta de avaliação pré-cirúrgica em pacientes da clínica. A alteração nos testes de TP e TTPa ajudam a estimar a existência de problemas com as vias de coagulação, dessa forma, permitindo avaliar o risco de ocorrência de hemorragias durante o procedimento cirúrgico (MOROZ, 2008).

A hemostasia é composta por um esforço conjunto de fatores celulares e bioquímicos que visam manter o fluxo sanguíneo no interior do sistema circulatório. Em geral o processo de hemostasia é dividido didaticamente em 3 fases: hemostasia primária, hemostasia secundária e fibrinólise, considerada por alguns como a hemostasia terciária (LOPEZ, 2007). Na hemostasia primária ocorre

o evento da adesão plaquetária no local da lesão, e em situações de higidez, o endotélio é capaz de inibir a adesão e ativação dos fatores plaquetários, entretanto com a exposição do tecido conjuntivo abaixo do endotélio, em especial o colágeno subendotelial, em processos de lesão são liberados fatores de adesão plaquetária e de ativação da protrombina, levando a formação de um tampão plaquetário inicial (LOPEZ, 2007; MOROZ, 2008).

Na segunda fase da hemostasia ocorre a estabilização do coágulo a partir da conversão do fibrinogênio em fibrina. É durante a consolidação do coágulo inicial que são necessários os fatores e cofatores de coagulação, uma vez que participam ativamente da cascata de coagulação que leva a conversão do fibrinogênio em fibrina. A cascata ocorre por duas possíveis vias, denominadas intrínseca e extrínseca, que convergem na via comum então dando origem ao fator ativador da protrombina. As vias intrínseca e extrínseca ocorrem de forma simultânea no modelo *in vivo* (HOOPER, 2005; MOROZ et al., 2008).

Além do seu uso na avaliação de risco cirúrgico, o exame de coagulograma se mostra útil na detecção de possíveis coagulopatias. Como citado, a presença dos fatores de coagulação é essencial para que ocorra a hemostasia bem-sucedida, portanto, quaisquer eventos que afetem a síntese ou consumo destes fatores pode ser classificado como coagulopatia. Dentre uma das coagulopatias bem conhecidas cita-se a coagulopatia associada a deficiência de vitamina K (GARCIA-NAVARRO, 2005; KLAC; CARVALHO, 2006).

A vitamina K é uma vitamina lipossolúvel que atua como um cofator na carboxilação do glutamado, permitindo a formação do ácido carboxiglutâmico, um aminoácido que faz parte dos fatores de coagulação II, VII, IX e X (KLAC; CARVALHO, 2006). Sendo assim, animais com deficiência dessa vitamina apresentarão a deficiência na síntese desses fatores e, portanto, uma coagulopatia que pode ser refletida como um aumento no tempo dos testes de TP e TTPa. Um paciente cuja amostra foi avaliada durante o estágio, um canino adulto, que apresentou o valor de TP de 48s e um TTPa superior a 120s teve o diagnóstico de deficiência de vitamina K, confirmado após a suplementação, onde foi observada a normalização da hemostasia pós aplicação do suplemento.

Citologia

Frente a análise citológica é importante ressaltar a forte presença de erros pré-analíticos e a sua interferência na chegada de um diagnóstico conclusivo. Estima-se que cerca de 70% dos erros e falhas em diagnóstico laboratorial tenha como fonte problemas na fase pré-analítica da amostra (PEIXOTO et. al 2013), em outras palavras, no período desde a coleta até a chegada da amostra no laboratório (Tabela 1).

Tabela 1: Amostras citológicas segundo erros pré-analíticos observados durante o período do ESO.

Não conformidade observada	Número de Amostras
Pouco Material	06
Contaminação por Sangue	12
Condicionamento inadequado	03
Material Inadequado para análise	02
Total	23

Fonte: Dados analisados de amostras do laboratório Zoonálises, 2021.

Dentre os principais problemas observados que podem estar associados a erros pré-analíticos pode-se relatar a contaminação iatrogênica por sangue, erros de armazenamento da lâmina no transporte, ausência de material na lâmina, material inadequado para o exame solicitado e presença de material contaminante nas lâminas (SILVA et al., 2019).

Além do ressaltado, vale destacar que outro fator importante para a obtenção de sucesso diagnóstico utilizando a citologia é o histórico clínico do paciente e detalhes da macroscopia da lesão de onde foi realizada a citologia (MOORE, 2017). Nota-se frequentemente ausência de um histórico clínico prévio ou descrição da lesão macroscópica, dificultando a obtenção de um diagnóstico satisfatório.

Um estudo retrospectivo realizado pelo laboratório de histopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco relata os erros pré-analíticos e seu

impacto na capacidade de obtenção de um diagnóstico concreto frente a amostra analisada. Quantidade de material inadequado, problemas de celularidade e contaminação iatrogênica por sangue foram relatados como os empecilhos mais frequentes, além da necessidade de se desenvolver formas de guiar o processamento antes da chegada do material visando obter um diagnóstico adequado (SILVA et al., 2019). Em contraste, nos casos onde pode-se obter um histórico clínico completo antes da análise da lâmina, o diagnóstico se tornou mais preciso e fácil. Um desses casos está representado na figura 2, que representa uma das amostras para exame citológico recebidas no laboratório, na qual observa-se a presença de células com citoplasma intensamente granulado, compatíveis com mastócitos. A coleta foi realizada por PAAF em nódulos, em membro posterior e mama, caracterizados como firmes e intensamente vascularizados. O diagnóstico final foi sugestivo de mastocitoma.

Figura 2: Presença de células redondas com citoplasma intensamente basofílico e com intensa presença de grânulos intracelulares. Podem também ser observados grânulos livres. Fundo de lâmina basofílico com presença de eritrócitos. Aumento 1000X, objetiva de imersão. Coloração: Panótico Rápido – SILVA, R.A., 2021



O uso da citologia como forma de diagnóstico direto de infecção por alguns agentes infecciosos, em especial por fungos do complexo *Sporothrix* spp., compôs boa parte da rotina de citologia durante o período de realização do estágio (gráfico 1) no qual foram obtidas 7 amostras positivas de um total de 17 amostras analisadas. Apesar de não ser o padrão ouro para o diagnóstico da esporotricose, a

citologia oferece um forte apoio a clínica pelo rápido resultado e baixo custo. Entretanto vale salientar que a cultura fúngica permanece como padrão ouro para o diagnóstico da infecção por *Sporothrix* spp. devido a sua maior sensibilidade com relação a citologia (MACÊDO-SALES et al., 2018)

Figuras 3 e 4: Lâminas de citologia contendo estruturas leveduriformes encapsuladas compatíveis com *Sporothrix* spp. Na figura 4 pode-se notar a presença das estruturas no interior de um macrófago. *Imprinting* de lesão. Corante – Panótico Rápido, aumento 1000x – SILVA, R.A., 2021.

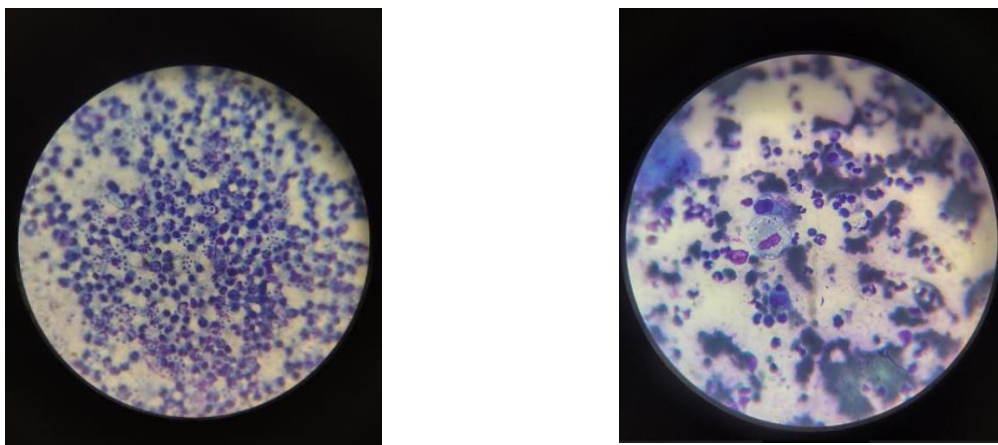
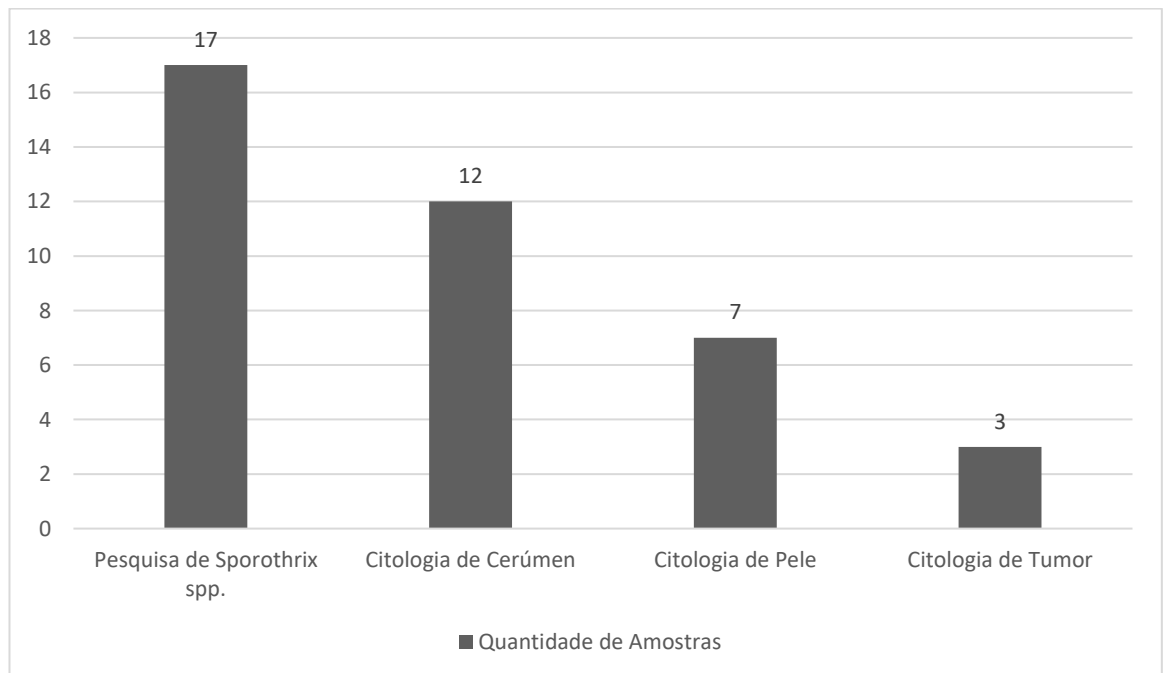


Gráfico 1: Amostras recebidas pelo laboratório durante o período de vigência no do estágio para análise citológica.



Exames parasitológicos

Os exames parasitológicos foram frequentes na rotina laboratorial, em particular os exames relacionados à pesquisa de hemoparasitos dos quais foram realizados 69 exames. A pesquisa de hematozoários em esfregaço sanguíneo é o exame mais solicitado dentre os exames parasitológicos. Apesar de sua sensibilidade inconsistente e variável de acordo com a parasitemia, seu baixo custo e simples realização o tornam uma ferramenta importante diagnóstica (UILENBERG et al, 2005; YASBLEY et al, 2005). Durante a realização do estágio não foram encontradas inclusões compatíveis com *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp. ou *Babesia* spp. Foram observadas inclusões compatíveis com *Mycoplasma haemofelis* (1/69) e *Hepatozoon* spp. (7/69), além da presença de microfilárias.

M. haemofelis é uma bactéria com ausência de parede celular pertencente a classe das *Mollicutes*. Possui distribuição mundial com relativa variação a depender da área geográfica, podendo parasitar uma gama de animais, incluindo os felídeos (TAYLOR et al., 2017). *Hepatozoon* spp. é um protozoário de distribuição conhecida nas Américas, Ásia, Sul Europeu e África (HONÓRIO et al., 2017). Trata-se de um parasito que tem os canídeos como hospedeiro intermediário, os quais se infectam ao consumir um carrapato contendo oocistos esporulados, podendo ser diagnosticado a partir da presença dos gamontes nos leucócitos durante avaliação do esfregaço sanguíneo. Também é relatada a ocorrência deste agente como um achado no hemograma de cães sem sinais clínicos (HONÓRIO et al., 2017)

Figura 5: Fotomicrografia de lâmina de sangue. É possível observar um leucócito contendo um gamonte de *Hepatozoon* spp. Corante: Panótico Rápido, aumento 1000x. SILVA, R.A., 2021.



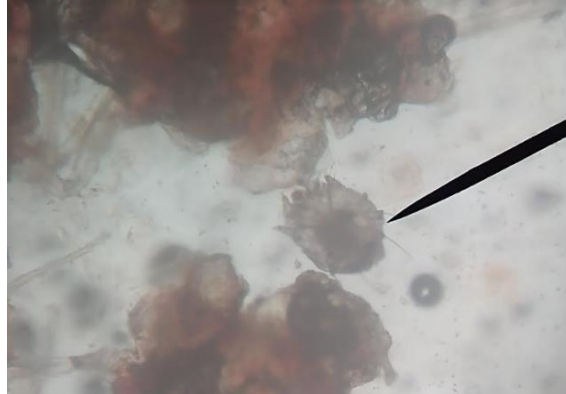
O uso de testes rápidos, em específico o teste SNAP 4dx Plus (IDEXX®) identificou infecções por *Anaplasma* spp. (5/32) e *Ehrlichia* spp. (15/32). O teste apresenta boa especificidade e sensibilidade, aumentando sua capacidade de identificar a infecção por estes agentes quando associado o resultado ao estado clínico do animal. Além das bactérias citadas foi possível identificar também a presença de anticorpos anti-*Borrelia burgdorferi* (2/32), agente etiológico da doença de Lyme, uma enfermidade zoonótica de baixa ocorrência no Brasil (FERREIRA et al., 2016).

No que diz respeito ao exame parasitológico de fezes, houve poucos resultados positivos nas amostras analisadas. Do total de exames realizados foram encontradas duas amostras que apresentavam oocistos compatíveis com *Isospora* spp. (1/52) e uma amostra com intensa infecção de ovos de *Ancylostoma* spp. (1/52).

Na análise dos raspados de pele/pelo foram também relatados uma baixa quantidade de amostras positivas. Observou-se uma amostra positiva para presença de ácaros *Sarcoptes scabiei* (Figura 6) (1/7) e uma amostra de pelo com presença de *Lynxacarus* spp. (1/7).

Ressalta-se que uma possível causa que colabora para os baixos números de amostras positivas encontradas é a forma de armazenamento e transporte das lâminas além do hábito de locomoção de alguns desses artrópodes (PEREIRA, 2012). Algumas amostras (4/7) para avaliação parasitológica da pele foram enviadas de forma inadequada, ou seja, sem vedação. O envio de amostras inadequadas não favorece a sensibilidade do exame permitindo a locomoção de agentes infecciosos que possuam motilidade, a exemplo de *S. scabiei*, podendo favorecer a ocorrência de um diagnóstico falso negativo (PEREIRA, 2012). Em alguns casos, as lâminas chegaram ao laboratório sem vedação externa, envoltas apenas por papel toalha ou apenas com outra lâmina sobreposta.

Figura 6: Raspado de pele. No centro da figura pode-se observar a presença de um ácaro com morfologia compatível com a espécie *Sarcoptes scabiei* – SILVA, R.A., 2021.



CAPÍTULO II

ARTIGO

Alta frequência de genes de resistência à tetraciclina em *Staphylococcus aureus* isolados de queijo coalho caprino.

Renato Amorim da Silva, Breno Bezerra Aragão, Raylson Pereira de Oliveira, Sabrina Cândido Trajano, Samuel Souza Silva, Renata Pimentel, Rinaldo Aparecido Mota.

Resumo

A caprinocultura leiteira é uma importante atividade econômica, sendo uma das atividades mais consolidadas da região semiárida do Nordeste brasileiro. Apesar de ser uma atividade rentável, a caprinocultura é considerada pouco tecnificada, elevando o risco de contaminação do leite e de seus derivados. Foram utilizados 54 isolados de *Staphylococcus aureus* pertencentes a bacterioteca do Laboratório de Doenças Infectocontagiosas (LDIC) do Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFRPE, local onde previamente as bactérias foram isoladas a partir de amostras de queijo coalho caprino de propriedades da região semiárida de Pernambuco, Brasil. As amostras foram inoculadas em ágar Baird-Parker acrescido de 5% de gema de ovo com telurito de potássio e incubadas a 37°C por 48 horas. Após o período de incubação os isolados de *S. aureus* foram submetidos extração do material genético e a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detecção dos genes de resistência a tetraciclina *tet38*, *tetM* e *tetL*. Em paralelo os isolados foram também submetidos ao teste de resistência fenotípica a tetraciclina através da técnica de Disco difusão em ágar Muller-Hinton conforme a metodologia estabelecida pelo CLSI. Dos 54 isolados analisados, 94,45% (51/54) apresentaram o gene de resistência *tet38*. Não foram detectados os genes *tetL* ou *tetM*. No teste fenotípico 64,81% (35/54) dos isolados expressaram resistência a tetraciclina através da redução da zona de inibição de crescimento. Os resultados confirmam a contaminação de queijo coalho elaborado com leite de cabra por *S. aureus* e a presença de isolados resistentes a tetraciclina servindo de alerta para os riscos à saúde pública presentes na cadeia produtiva deste produto no Nordeste brasileiro.

Palavras-chave: Queijo artesanal, Contaminação microbiológica, Resistência antimicrobiana, Saúde única

Introdução

Apesar da importância socioeconômica da caprinocultura leiteira no Brasil, o seu desenvolvimento é afetado por diversos fatores como alta frequência de problemas sanitários decorrentes de práticas inadequadas de manejo que predispõem os animais às enfermidades que acarretam prejuízos econômicos (CORDEIRO, 2006). Além do risco de transmissão de doenças por alimentos, principalmente por se tratar de queijos artesanais elaborados com leite de cabra, que normalmente não sofrem tratamento térmico prévio, elevando o risco de veiculação de microrganismos patogênicos (RALL et al., 2008).

Dentre os agentes patogênicos causadores de mastite e que podem ser veiculados pelo leite caprino e seus derivados destaca-se *Staphylococcus aureus* (BERGDOLL, 1989; XING et al., 2016), considerado de importância mundial para saúde. Na cadeia produtiva de leite e derivados, as principais fontes de contaminações por *S. aureus* são os animais infectados, superfície de contato com alimentos, mãos de ordenhadores sendo esses manipuladores, geralmente, portadores assintomáticos (ARGUDIN et al., 2010).

O gênero *Staphylococcus* é frequentemente encontrado na pele e mucosas dos animais de sangue quente, podendo ser facilmente encontrados quando procurados em pontos estratégicos. Em humanos estes pontos se encontram nas narinas, mãos e superfície da pele. A prevalência de *S. aureus* nos sítios anatômicos citados pode chegar a 60% (CASSETARI et al., 2015). Devido a essas características, *S. aureus* é considerado um indicador de higiene pessoal bem como um indicador do status sanitário na cadeia de produção de alimentos, particularmente na cadeia de produção de laticínios (PALES et al., 2005; OLIVER et al., 2009).

Antimicrobianos são substâncias utilizadas no tratamento de processos infecciosos desde 1940, entretanto o uso incorreto e indiscriminado causou o desenvolvimento de bactérias resistentes ao efeito destes fármacos. A resistência em geral tem origem genética, limitando a eficácia dos antimicrobianos levando a infecções graves de difícil tratamento (HEDE, 2014). Dentre os fármacos utilizados no tratamento de infecções, têm-se as tetraciclinas, agentes

bacteriostáticos de amplo espectro de ação, podendo atuar contra uma gama de agentes Gram negativos e Gram positivos, dentre os quais inclui-se *Staphylococcus aureus* (PEREIRA-MAIA et al., 2010).

A resistência à classe das tetraciclinas vem se tornando um evento recorrente em diversas espécies e isolados bacterianos, fenômeno este que não se restringe a essa classe de antimicrobianos. Tal fenômeno ocorre em especial devido ao uso indevido dos medicamentos e subdosagem, que promove a seleção de indivíduos que portam os genes responsáveis pela característica de resistência (PEREIRA-MAIA et al., 2010). O mecanismo de resistência às tetraciclinas ocorre, em geral por efluxo do medicamento do interior da célula ou por proteção ribossomal através de proteínas citoplasmáticas (RODRIGUES-AVIAL et al., 2003; PEREIRA-MAIA et al., 2010). A resistência aos antibióticos muitas vezes possui origens genéticas diferentes, a exemplo da resistência à classe das tetraciclinas, cujo os genes *tetM*, *tetL* e *tet38* codificam os mecanismos para tal (NG et al., 2001; KACZOREK et al., 2017; OTARIGHO; FALADE, 2018).

Estudos realizados por Peixoto et al. (2012) relataram a existência de isolados de *S. aureus* na mastite em pequenos ruminantes, apresentando resistência a diversos grupos de antimicrobianos, dentre eles as tetraciclinas. A causa mais provável é o uso exacerbado destes fármacos, que acaba gerando uma pressão seletiva para os isolados com maior potencial de resistência.

Material e métodos

- **Amostragem:**

Para este estudo foram utilizados um total de 54 isolados de *Staphylococcus aureus* provenientes de amostras de queijo coalho caprino. Esses isolados foram obtidos na bacterioteca do laboratório de doenças infecciosas da UFRPE, tendo sido previamente isolados de amostras de queijo coalho caprino de estabelecimentos comerciais na região semiárida de Pernambuco conforme ilustrado na figura 1.

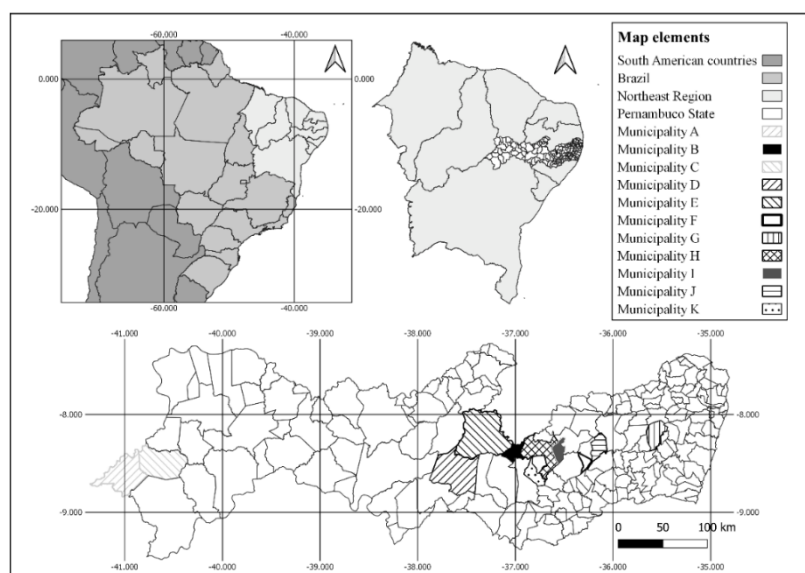
- **Análise microbiológica:**

Inicialmente, os isolados foram reativados por meio do plaqueamento no ágar Baird-Parker acrescido de Telurito de potássio suplementado com 5% de gema de ovo. Após o plaqueamento, as amostras foram incubadas em estufa microbiológica por 24 horas em temperatura de 37°C. Após o período de incubação as colônias bacterianas foram selecionadas para o processo de extração do material genético e realização do teste fenotípico de resistência.

- **Extração do genoma:**

As colônias selecionadas para extração do material genético foram processadas por meio do método de extração térmica, conforme a metodologia de Fan *et al.* (1995). O material genético extraído (DNA) foi analisado qualitativamente e quantitativamente por meio de um espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 nm e sua concentração adaptada para 100ng/µL conforme protocolo estabelecido pelo laboratório. As amostras obtidas foram então submetidas a prova molecular para determinação da presença ou ausência de genes de resistência a tetraciclinas.

Figura 1: Mapa de distribuição dos estabelecimentos comerciais dos quais foram obtidos os isolados no estudo.



- **Pesquisa dos genes de resistência:**

Para pesquisa da presença dos genes de resistência às tetraciclinas foi empregada a Técnica de PCR onde foram pesquisados os genes *tet38*, *tetL* e *tetM*.

A metodologia aplicada na amplificação dos fragmentos genéticos foi a mesma referenciada para cada gene de resistência pesquisado neste estudo, conforme a Tabela 1. O volume final da reação foi adaptado para 12,5 µL por microtubo contendo 10 ng dos respectivos primers e 6,25 µL de GoTaqGreen MasterMix (Promega®). Após a finalização da reação, o material amplificado foi corado com BlueGreen© e submetido a eletroforese em gel de agarose a 1,5%. Para observar a formação das bandas de DNA, o gel foi fotografado em um fotodocumentador sob luz ultravioleta, sendo considerada positiva, amostras que apresentaram formação de banda de DNA na mesma altura do controle positivo e marcador de peso molecular para o respectivo gene.

Tabela 1: Genes, sequência de oligonucleotídeos e tamanho do fragmento de DNA.

Gene	Sequência (5' – 3')	Tamanho do fragmento (pb)	Referencias
<i>tet38</i>	F: TTCAGTTTGGTTATAGACAA R: CGTAGAAATAAATCCACCTG	200	Truong-Bolduc <i>et al.</i> (2005)
<i>tetL</i>	F: TCGTTAGCGTGCTGTCATTC R: GTATCCCACCAATGTAGCCG	267	Ng <i>et al.</i> (2001)
<i>tetM</i>	F: GTGGACAAAGGTACAACGAG R: CGGTAAAGTTCGTCACACAC	406	Ng <i>et al.</i> (2001)

- **Avaliação da resistência fenotípica:**

Para avaliação fenotípica da resistência à classe das tetraciclina foi empregada a técnica de disco-difusão em ágar. Para tal, os isolados foram inoculados em meio de cultura *Brain Heart Infusion* (BHI) e incubado em estufa microbiológica por 24 horas a 37°C. Após esse período, as amostras foram avaliadas quanto a ocorrência ou não de turvação do meio e então submetidas ao plaqueamento em ágar Müeller Hinton. Discos contendo 30 µg de tetraciclina (SENIBIODISC-CECON®) foram aplicados na superfície do meio já inoculado. Após o processamento, as placas foram incubadas em estufa microbiológica por 24 horas na temperatura de 37°C e então analisadas quanto a presença e tamanho do halo de inibição de crescimento (CLSI, 2017).

Resultados

Dos 54 isolados analisados, observou-se uma frequência de 94,45% (51/54) de amostras positivas para o gene codificador de sistema de bomba de efluxo *tet38*. No que diz respeito aos demais genes testados, *tetL* e *tetM*, esses não foram detectados. Além do teste genotípico para resistência as tetraciclinas, também foi observada uma frequência de resistência fenotípica ao antimicrobiano de 64,81% (35/54) no teste fenotípico.

Discussão

A obtenção de *Staphylococcus aureus* isolados a partir de queijo produzido com leite caprino revela um problema higiênico sanitário no sistema de produção, além disso representa um importante problema para a saúde do consumidor desse alimento (PICOLI, 2006; OBAIDAT., 2017). Outros estudos também relatam a ocorrência de isolados resistentes de *S. aureus* em queijo coalho e leite caprinos, dentre os quais foi possível observar a ocorrência de isolados resistentes a diversos antimicrobianos (OBADAIT et al., 2017; ARAGÃO et al., 2021). A capacidade de *S. aureus* no ambiente de produção dos queijos artesanais se mostra como um importante fator de risco higiênico-sanitário, visto que isolado de *S. aureus* podem utilizar da produção de biofilme como alternativa de permanência nos utensílios (MARQUES et al., 2007). O uso de madeira, em especial nas bancadas de venda e moldes dos queijos, também representa pontos de risco a contaminação visto que o material é capaz de absorver umidade e material biológico além de ter uma higienização mais dificultosa (FERREIRA et al., 2013).

Ao se referir a resistência às tetraciclinas não se pode deixar de pensar no impacto no qual o consumo de alimentos contaminados pode causar à saúde humana, uma vez que contribuem para a ocorrência de infecções persistentes e de tratamento mais difícil. Ao tratar especificamente do queijo de coalho, este é comumente consumido cru, facilitando a ocorrência de infecções por *S. aureus*, podendo esses isolados serem resistentes a uma ou múltiplas classes de antimicrobianos, dentre elas as tetraciclinas (DUARTE et al., 2005; CARACIOLO et al., 2012; AKYA et al., 2020).

Um estudo realizado pela Embrapa a respeito da contaminação de leite caprino por *Staphylococcus aureus* além do perfil de sensibilidade aos

antimicrobianos encontrou expressiva resistência às tetraciclinas. O estudo foi conduzido com cabras que apresentavam mastite subclínica no estado do Ceará, no qual encontraram um resultado de 75% de resistência para a classe de antimicrobiano (SOUZA et al., 2017). Além disso, irregularidades no aspecto higiênico-sanitário das instalações de produção e armazenamento dos queijos permitem a manutenção desses genes de resistência no ambiente além de permitir a contaminação do produto, culminando em um maior risco para o consumidor (PICOLI, 2006; OBAIDAT., 2017).

A resistência a classe das tetraciclinas pode ser ocasionada por diferentes mecanismos, dentre eles os sistemas de efluxo de fármacos, modificação enzimática das moléculas e a proteção do sítio de ação do medicamento (RODRIGUES-AVIAL et al, 2003; PEREIRA-MAIA et al.,2010). Além disso, o uso indiscriminado de medicamento estimula a pressão seletiva de indivíduos que apresentam o fenótipo de resistência (PEREIRA-MAIA et al., 2010). O advento da subdosagem de medicamentos não ocorre apenas da aplicação direta no animal, podendo ocorrer também a partir de contaminação do ambiente (TRZCISNKI et al., 2000; REGITANO; LEAL, 2010).

Existem estudos que relacionam o uso indiscriminado de antimicrobianos na caprinocultura, com o surgimento de isolados resistentes de microrganismos (SOUZA et al., 2017). Destaca-se a relação direta dos antimicrobianos com microrganismos causando patologias bem como a influência desses fármacos na microbiota ambiental (CHECCUCCI et al., 2020). Em geral os antimicrobianos administrados nos animais, em especial pela via oral, não são plenamente metabolizados, sendo então excretados pela urina e fezes em forma parcialmente metabolizada, ou mesmo em sua forma íntegra. No que diz respeito especificamente a classe das tetraciclinas, sabe-se que sua taxa de metabolismo no organismo do animal é baixa (REGITANO; LEAL, 2010; CHECCUCCI et al., 2020).

Além do impacto direto na microbiota ambiental, a contaminação por antimicrobianos pode afetar diretamente a microbiota dos humanos através da contaminação de água e alimentos. Nesse caso, a baixa dose consumida do medicamento é um importante fator que favorece o desenvolvimento de mecanismos de resistência entre os microrganismos (CHECCUCCI et al., 2020). Tal contaminação pode ocorrer tanto através dos resíduos dos animais que conseguem atingir fontes de água, solo ou alimentos que serão consumidos, bem

como em casos em que o período de carência dos medicamentos não é respeitado em animais sob tratamento, fazendo com que seus produtos e derivados sejam contaminados com medicamentos. É importante tomar conhecimento de tais vias para o desenvolvimento da resistência em isolados bacterianos, considerando que *S. aureus* possui os humanos como hospedeiro e o papel destes na contaminação dos alimentos durante o processo de fabricação, no caso específico deste estudo, na contaminação de queijo coalho (OBAIDAT., 2017).

No que se diz respeito aos genes não encontrados nos isolados (*tetL* e *tetM*), estes são relatados como presentes em isolados bacterianos ambientais, apesar de sua ausência, a contaminação dos queijos por meio de utensílios ou mesmo pelo próprio ambiente de processamento não deve ser desconsiderada. Também não se descarta a contaminação por meio da manipulação do produto ou mesmo o uso de matéria prima com elevada população de *S. aureus*, visto que estes também são possíveis locais de colonização pelo patógeno (BORGES et al., 2008). Além disso, a transferência horizontal de genes de resistência deve ser levada em consideração como um importante mecanismo de disseminação da resistência antimicrobiana (AKYA et al., 2020).

O gene *tet38* é responsável por codificar proteínas do sistema de bomba de efluxo da família MSF, além de participar no auxílio de colonização e sobrevivência de *S. aureus* em hospedeiros, em especial nas células epiteliais dos hospedeiros (TRUONG-BOLDUC et al., 2015). Além disso, nota-se que a expressão desse gene se torna mais exacerbada na presença de ambientes hostis, em especial em ambientes com alguns ácidos graxos como ácido palmitoleico e linoleico, pertencentes a cadeia do ácido araquidônico que é um importante fator inflamatório, devido a ligação a um gene promotor (TRUONG-BOLDUC et al., 2015).

Um estudo realizado com amostras de queijo coalho caprino provenientes da região semiárida de Pernambuco relatou a presença de *S. aureus* carregando o gene *tet38* (ARAGÃO et al., 2021). Apesar da elevada frequência do gene na população de isolados estudada, (94,45%), uma quantidade consideravelmente menor apresentou a resistência fenotípica (64,81%), a ausência ou inibição da expressão do promotor pode ser uma das causas para uma expressão de resistência fenotípica menor que a genotípica. Além disso, a possibilidade da ocorrência de mutações e o contato das bactérias com plasmídeos podem alterar a forma com a

qual ocorre a expressão gênica causando essa redução no potencial de resistência (TRUONG-BOLDUC et al., 2015; ARAGÃO et al., 2021).

Conclusão

Foi possível realizar a detecção de genes de resistência a tetraciclinas em isolados de *Staphylococcus aureus* advindos de amostras de queijo coalho artesanal produzido a partir de leite caprino. A alta prevalência de *S. aureus* portadores do gene *tet38* e a identificação de cepas resistentes fenotipicamente à tetraciclina representam um risco para a saúde dos consumidores desse tipo de queijo. Os resultados obtidos servem de alerta aos órgãos de vigilância sanitária no que se refere a qualidade microbiológica inadequada dos queijos artesanais elaborados com leite de cabra que são comercializados na região do Nordeste do Brasil.

Referências:

AKYA, A.; CHEGENELORESTANI, R.; SHAVAIISI-ZADEH, J.; BOZORGOMID, A. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from hospital wastewater in Kermanshah, Iran. **Risk Management and Healthcare Policy** v13 p 1035–1042, 2020.

ARAGÃO, B.B. TRAJANO, S.C. SILVA, R.A.; SILVA, B.P.; PEIXOTO, R.M. MOTA, R.A. Occurrence of Multi-resistant *Staphylococcus aureus* in artisan goat coalho cheese in Northeastern Brazil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 49, 2021

ARGUDIN, M.A.; MENDOZA, M.C.; RODICIO, M.R. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. **Toxins**. v.2, p.1751-1774, 2010.

BARNES-PALLESEN, F.; P. BLACKMER, A.; BRITTEN, R.; BUSHNELL, D.; VAN DAMME. Laboratory and field handbook on bovine mastitis. **National Mastitis Council Inc.**, Washington, DC. 1987.

BERGDOLL, M.S. *Staphylococcus aureus*. In: DOYLE, M. P. (Ed.) **Foodborne Bacterial Pathogens**. New York: Marcel Dekker Inc., 1989, cap.11, p.463-523.

BORGES, M.F.; NASSU, R.T.; PEREIRA, J.L.; ANDRADE, A.P.C.; KUAYE, A.Y. Perfil de contaminação por *Staphylococcus* e suas enterotoxinas e monitorizaçãodas condições de higiene em uma linha de produção de queijo coalho. **Ciência Rural** vol 38 p 1441- 1448, 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62 de 26 de agosto de 2003. Oficializa os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2003.

CARACIOLO, F.B.; MARCIEL, M.A.V.; SANTOS, J.B.; RABELO, M.A.; MAGALHÃES, V. Antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* isolates obtained from skin and soft tissue of outpatients from a university hospital in Recife- PE, Brazil. **Anais Brasileiros de Dermatologia** vol 87, p 857-861, 2012.

CHECCUCCI, A.; TREVISI, P.; LUISI, P.; MODESTO, M.; BLASIOLI, S.; BRASCHI, I.; MATTARELLI, P. Exploring the animal waste resistome: The spread of antimicrobial resistance through the use of livestock manure. **Frontiers in Microbiology** vol11 DOI: 10.3389/fmicb.2020.01416, 2020.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**; Twenty-seventh Edition, Wayne, PA. 2017.

CORDEIRO, P.R.C. Mercado do leite de cabra e de seus derivados. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**. v.12, n.39, p.32-43, 2006.

DUARTE, D.A.M.; SCHUCH, D.M.T.; SANTOS, S.B.; Ribeiro, A.R.; Vasconcelos, A.M.M.; Silva, J.V.D.; DA MOTA, R.A. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* e microrganismos indicadores higiênicosanitários em queijo-coalho produzido e comercializado no estado de Pernambuco. **Arquivo do Instituto Biológico**, v.72, p.297-302, 2005.

FAN, H.H; KLEVEN,S.H.; JACKWOOD, M.W. Application of polymerase chain reaction with arbitrary *primers* to strain identification of *Mycoplasma gallisepticum*. **Avian Diseases**. V 39, p 729-735. 1995.

FERREIRA, E.G.; FERREIRA, C. L. L. F.. IMPLICAÇÕES DA MADEIRA NA IDENTIDADE E SEGURANÇA DE QUEIJOS ARTESANAIS. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, [S.l.], v. 66, n. 381, p. 13-20, dez. 2013. ISSN 2238-6416. Disponível em: <<https://rilct.emnuvens.com.br/rilct/article/view/170/354>>.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. Production: live animals, livestock primary, livestock processed; **Trade: countries by commodity (imports and exports) 2012**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acessado em 29/08/2018.

HEDE, K. Antibiotic resistance: an infectious arms race. **Nature**. v.509, S2–S3, 2014.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Produção da Pecuária Municipal. vol. 43, p.23, 2015. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2015_v43_br.pdf>. Acessado em 29/08/2018.

JORDA, G.B.; MARUCCI, R. S.; GUIDA, A. M.; PIRES, P. S.; MANFREDI, E.A. Portación y caracterización de *Staphylococcus aureus* en manipuladores de alimentos. **Argentina Journal of Microbiology**, v.44, n.2, 2012.

KACZOREK, E.; MAŁACZEWSKA, J.; WÓJCIK, R.; REKAWEK, W.; SIWICKI, A. K. Phenotypic and genotypic antimicrobial susceptibility pattern of *Streptococcus* spp. isolated from cases of clinical mastitis in dairy cattle in Poland. **Journal of dairy science**. v.100, p.6442-6453, 2017.

MARQUES, S.C., REZENDE, J. G. O. S., ALVES, L.A.F., SILVA, B.C., ALVES, E., ABREU, L. R., & PICCOLI, R. H. Formation of biofilms by *Staphylococcus aureus* on stainless steel and glass surfaces and its resistance to some selected chemical sanitizers. **Brazilian Journal of Microbiology**, 38(3), 538-543. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822007000300029>, 2007

NG, L. K. I.; MARTIN, M. ALFA.; M. MULVEY. Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. **Molecular and Cellular Probes**. v.5, p.209-215, 2001.

OBAIDAT, M.M., BANI SALMAN, A.E. & ROESS, A.A. High prevalence and antimicrobial resistance of *mecA Staphylococcus aureus* in dairy cattle, sheep, and goat bulk tank milk in Jordan **Trop Anim Health Prod** (2018) **50**: 405. <https://doi.org/10.1007/s11250-017-1449-7>

OLIVER, S.; BOOR, K.; MURPHY, S. C.; MURINDA, S. E. Food safety hazard associated with consumption of raw milk. **Foodborne Pathogens and Disease**, 6(7): 793-806, 2009.

OTARIGHO B, FALADE MO. Analysis of antibiotics resistant genes in different strains of *Staphylococcus aureus*. **Bioinformation** V.14(3):113-122., 2018. mdoi:10.6026/97320630014113

- PALES, A. P.; SANTOS, K. J. G.; FIGUEIRAS, E. A.; MELO, C. S. A importância da contagem de células somáticas e contagem bacteriana total para a melhoria da qualidade do leite no Brasil. **Revista Eletrônica Faculdade Montes Belos**, 1;(2): 162-173, 2005.
- PEREIRA-MAIA, E.C.; SILVA, P.P.; ALMEIDA, W.B. Tetraciclina: uma visão geral. **Química Nova** vol 33, p 7000-706, 2010.
- PEIXOTO, R.M.; AMANSO, E.S.; CAVALCANTE, M.B.; AZEVEDO, S.S.; PINHEIRO JUNIOR, J.W.; MOTA, R.A.; COSTA, M.M. Fatores de risco para mastite infecciosa em cabras leiteiras criadas no estado da Bahia. *Arquivo do Instituto Biológico*. v.79, n.1, p.101-105, 2012.
- PICOLI, S.U.; BESSA, M.C.; CASTAGNA, S.M.F.; GOTTARDI, C.P.T.; SCHMIDT, V.; CARDOSO, M. Quantificação de Coliformes, *Staphylococcus aureus* e Mesófilos presentes em diferentes etapas da produção de queijo frescal de leite de cabra em laticínios. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.26, n.1, p.64-69, 2006.
- RALL, V.L.M.; VIEIRA, F.P.; RALL, R.; VIEITIS, R.L.; FERNANDES JR, A.; CANDEIAS, J.M.; CARDOSO, K. F.; ARAÚJO JR, J.P. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* strain isolated from raw and pasteurized milk. **Veterinary Microbiology**. v.132, p.408-413, 2008.
- REGITANO, J.B.; LEAL, R.M.P. Comportamento e impacto de antibióticos usados na produção animal brasileira. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, vol34 p601-616, 2010
- TRUONG-BOLDUC Q.C.; BOLDUC, G.R.; MEDEIROS, H.; VYAS, J.M.; WANG, Y.; HOOPER, D.C. Role of the Tet38 Efflux Pump in *Staphylococcus aureus* Internalization and Survival in Epithelial Cells. **Infect Immun**. V. 83(11):4362-72, 2015. doi: 10.1128/IAI.00723-15. Epub 2015 Aug 31. PMID: 26324534; PMCID: PMC4598397
- SOUZA, V; MARTINS, P.Y.F.; PINTO, D.S.; FERNANDES, D.R.; LIMA, A.R. Sensibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* isolados no leite de cabras com mastite subclínica. **Comunicado Técnico EMBRAPA** ISSN 1676-7675, 2017
- STINGHEN, A.E.M.; ALBINI C.A.; SOUZA, H.A.P.H.M. Coloração de Gram: Como fazer, Interpretar e Padronizar. Curitiba: **Microscience**, 2002, 70p.
- TRZCINSKI, K.; COOPER, B.S.; HRYNIEWICZ, W.; DOWSON, C.G. Expression of resistance to tetracyclines in strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** vol 45, p 763-770, 2000
- TRUONG-BOLDUC Q.C.; DUNMAN P.M.; STRAHILEVITZ J.; PROJAN S.J.; HOOPER D.C. *MgrA* Is a Multiple Regulator of Two New Efflux Pumps in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*. 187: 2395-2405, 2005.
- TONG, S. Y.; DAVIS, J. S.; EICHENBERGER, E.; HOLLAND, T. L.; FOWLER, V. G., JR. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology,

clinical manifestations, and management. **Clinical microbiology reviews**, 28(3), 603–661. <https://doi.org/10.1128/CMR.00134-14>, 015

XING, X.; ZHANG, Y.; WU, Q.; WANG, X.; GE, W.; WU, C. Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from goat milk powder processing plants. **Food Control**. v.59, p.644-650, 2016.

3.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O período vivenciado durante o estágio foi de suma importância para complementação da formação acadêmica e obtenção do título de Bacharel em Medicina veterinária, visto que foi possível agregar conhecimentos teórico-práticos e aprofundar temáticas previamente vistas no curso. Em especial, ressalta-se a junção dos conhecimentos referentes a associação de dados clínicos com a ocorrência de enfermidades infecciosas.

De forma paralela as atividades vivenciadas no estágio, também foi desenvolvido o trabalho intitulado: “Alta frequência de genes de resistência a tetraciclinas em *Staphylococcus aureus* isolados de queijo coalho caprino.” que serve de alerta aos riscos envolvendo a disseminação de microrganismos resistentes na cadeia de produção desse produto.

4. REFERÊNCIAS

- BLACKWELL, W. Atlas de hematologia veterinária: espécies domésticas comuns e não-domésticas. **Editora Revinter LTDA**, Rio de Janeiro-RJ. Segunda edição, 2011
- CARMO, B.M.B.; SOARES, J.M.; JÚNIOR, W.G.A.; FRANCO, A.A.; PRADO, L.; OLIVEIRA, P.G. MOREIRA, C.N.; RAMOS, D.G.S. Hemograma completo: ferramentade diagnóstico na medicina veterinária. **Brazilian Journal of Development**. V. 6, n. 7, p 49989-49994, 2020
- FERREIRA, K. C.; MORENO, E.; VIEIRA, J. F.; CARVALHO, F. F. Suspeita de borreliose em cão em São Paulo/SP, Brasil. Relato de caso. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 14, n. 3, p. 56-56, 21 dez. 2016
- GARCIA-NAVARRO, C.E.K. Hemostasia: coagulação do sangue e fibrinólise. **Manual de hematologia veterinária 2ª Edição**, São Paulo: Varela, 2005.
- GONZALES, F.H.D.; SILVA, S.C. Patologia Clínica Veterinária: Texto Introdutório. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – 342 p., 2008
- HONÓRIO, T.G.A.F.; ARAÚJO, E.K.D.A.; LIMA, L.T.R.; SILVA, M.G.; FONSECA, A.P.B.; COSTA, S.D.P.; NETO, J.B.S. Infecção por *Hepatozoon* spp. em canino doméstico: Relato de caso. **Pubvet** v. 11 No. 03 p. 207-312, 2017
- KLAC, K.; CARVALHO, J.F. Vitamina K: metabolismo, fontes e interação com o anticoagulante varfarina. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 46, n. 6, p 398-406, 2006.
- LOPEZ, S.M.T.A. Manual de patologia clínica veterinária. 3ª Edição, Santa Maria: UFSM, 2007
- MACÊDO-SALES, P.A.; SOUTO, S.R.L.S.; DESTEFANI, C.A. LUCENA, R.P.; ROCHA, E.M.S.; BAPTISTA, A.R.S. Laboratory diagnosis of feline sporotrichosis in samples from Rio de Janeiro, Brazil: imprinting cythopathology limitations. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 9, n. 2, p 13-19, 2018.
- MOORE, A.R. Preparation of Cytology Samples: Tricks of the Trade. **Vet. Clin. Small Anim.**, v. 47, p. 1-16, 2017.
- MOROZ, L.R. Avaliação de parâmetros hemostáticos de cães de diferentes categorias de risco anestésico no período pré-operatório. Dissertação (Mestrado em Ciência

Veterinária) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2008

OLIVEIRA, D. C. LORETO, E.S.; MARIO, D.A.N.; LOPES, P.G.M.; NEVES, L.V.; ROCHA, M.P.; SANTURIO, J.M.; ALVES, S.H. *Sporothrix schenckii* complex: susceptibilities to combined antifungal agents and characterization of enzymatic profiles. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** [online]. 2015, v. 57, n. 4 [Accessed 14 December 2021], pp. 289-294. Available from: <<https://doi.org/10.1590/S0036-46652015000400003>

PEIXOTO, A. *Os erros na fase pré-analítica: amostras não conformes versus procedimentos*. 85f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) - Faculdade Ciências Médicas, Universidade Atlântica, Lisboa, 2013.

PEREIRA, D.T. Eficácia da impressão cutânea com fita de acetato comparada com o raspado cutâneo profundo no diagnóstico de *Demodex canis* e de *Sarcoptes scabiei*. Monografia (Especialização em clínica de pequenos animais) – Centro de Ciências Rurais, Universidade de Santa Maria, Santa Maria, 2012

SILVA, M.B.G.; PASCOAL, I.C.; SILVA, O.P.; ALVES, A.D.F.; GONÇALVES, S.R.F.; BARRETO, M.L.M.; JÚNIOR, J.W.P.; PEREIRA, M.F.; OLIVEIRA, A.A.F. Nonconformities in veterinary citopathological examinations: A retrospective study of unsuitable samples for analysis. **Acta Veterinária-Beograd**, v. 69, n. 3, p 251-261, 2019.

THRALL, M.A.; WEISER, G.; ALLISON, R.W.; CAMPBELL, T.W. Hematologia e Bioquímica clínica veterinária. **Editora Roca LDTA**, São Paulo-SP. Segunda edição, 2015

UILENBERG, G. Babesia - A historical overview. **Veterinary parasitology**, v. 138, n. 1-2, p. 3-10, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.035>

WILLIS-MOLLAY, H.H. A simple levitation method for the detection of hookworm ova. **Medical Journey of Australia**. V. 2, p. 375-376, 1921.

YABSLEY, M. J.; MURPHY, S. M.; CUNNINGHAM, M. W. Molecular detection and characterization of *Cytauxzoon felis* and a *Babesia* species in cougars from Florida. **Journal of wildlife diseases**, v. 42, n. 2, p. 366-374, 2006.