

Estudo da disseminação de cepas resistentes a antibióticos causadores de mastite bovina e potencial de aplicação de bacteriófagos no controle biológico

Study of the dissemination of antibiotic-resistant strains causing bovine mastitis and application potential of bacteriophages in their biological control

RESUMO

Danieli Cuchi
cuchi@alunos.utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

Naiana Cristine Gabiatti
naianagabiatti@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

Flavia Regina Oliveira de Barros
flaviabarros@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

Rafael Arcenio da Costa
rafaeldacostacenio@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

João Pedro Maximino Gongora Godoi
jgodoi@alunos.utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

Douglas Bressane Caetano
bressanecaetano@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

Ana Heloisa Mezzalira
Mezzaliraheloisa51@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

A mastite bovina é uma enfermidade que causa impactos nos âmbitos sociais e econômicos em todo o mundo. O uso excessivo de antibióticos no tratamento da doença é um dos agravantes desta situação, já que proporciona um aumento na taxa de resistência microbiana, e conseqüentemente pode desencadear problemas para a saúde, tanto humana quanto animal. O objetivo deste estudo foi avaliar os quadros de resistência a antibióticos em casos de mastite em vacas leiteiras na região Sudoeste do Paraná além de validar a presença de bacteriófagos (vírus que infectam bactérias) nas amostras de leite. Primeiramente, desenvolveu-se uma análise baseada em dados secundários de antibiogramas disponibilizados de um laboratório veterinário comercial da localidade. Posteriormente, foram coletadas amostras de leite mastítico e encaminhadas para os laboratórios da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, onde avaliou-se a presença de *Staphylococcus aureus*. A partir do cultivo deste microrganismo observou-se o aparecimento de placas de lise, demonstrando um possível isolamento de bacteriófagos. A terapia fágica poderia ser considerada uma alternativa inovadora para o tratamento da mastite.

PALAVRAS-CHAVE: Mastite bovina. *Staphylococcus aureus*. Resistência microbiana. Bacteriófagos.

ABSTRACT

Bovine mastitis is a disease that causes numerous impacts on social and economic spheres around the world. The excessive use of antibiotics is an aggravating factor on its treatment, since it provides an increase in the rate of microbial resistance that can consequently trigger health problems for humans and animals. The aim of this study was to evaluate the antibiotic resistance conditions of dairy cows located in the Southwest region of Paraná in addition to validating the presence of bacteriophages (viruses that infect bacteria) in milk samples. First, an analysis was developed based on secondary data of antibiograms made available from a local commercial veterinary laboratory. Subsequently, samples of mastic milk were collected and sent to the laboratories of the Federal Technological University of

Paraná, where we evaluated the presence of *Staphylococcus aureus* bacteria. From the microorganism it was observed the appearance of lysis plaques demonstrating a possible isolation of bacteriophages. Phage/ Phagotherapy therapy could be considered an innovative alternative for the treatment of mastitis.

Recebido: 19 ago. 2020.

Aprovado: 01 out. 2020.

KEYWORDS: *Bovine mastitis. Staphylococcus aureus. Microbial resistance. Bacteriophages.*

Direito autoral: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



INTRODUÇÃO

A produção de leite é uma importante atividade socioeconômica no Brasil, e de acordo com o CEPEA (2013), emprega mais de 3 milhões de pessoas em sua cadeia produtiva, correspondendo aproximadamente a 20% do PIB do agronegócio nacional. A produção atual é equivalente a 35 bilhões de litros, porém possui a meta de alcançar a marca de 41 bilhões de litros até 2023. Concedendo assim para FAO (2013) a análise do país, uma posição entre os maiores produtores de leite bovino do mundo, 5,3% do total mundial, seguido da China (6%), Índia (8,6%) e Estados Unidos (14,7%).

Para que a atividade em questão continue mantendo sua produtividade e alcançando seus propósitos, é fundamental que ocorram manejos nutricionais, genéticos e sanitários bem estabelecidos. Entretanto desafios são recorrentes, dada à questão sanitária, a mastite fomenta inúmeras perdas sociais e econômicas, que afetam a saúde animal e seu bem-estar. Além disso, implica em uma questão de saúde pública, uma vez que existe a dispersão de patógenos causadores de zoonoses e toxinas produzidas pelos microrganismos do leite, as quais são nocivas à saúde humana. Tal patogenicidade é derivada de microrganismos comuns do úbere, como estafilococos, estreptococos e espécies de coliformes, que causam inflamações nas glândulas mamárias.

Estudos avaliaram o impacto econômico relativo a um ano de análises, em uma fazenda no estado de Minas Gerais, no Brasil, em relação à mastite, onde foram estimados em US \$ 91.552,69 de gastos. Onde, durante o período da pesquisa, antibióticos foram prescritos para eliminar *Streptococcus agalactiae* e uma parcela dos animais que já estavam infectados com *Staphylococcus aureus* foram sacrificadas. Além disso, tanto a redução na produtividade de leite quanto o descarte de vacas leiteiras com infecção crônica, foram associadas à presença da doença na fazenda. (AGOSTINHO, *et al.* 2019).

Os microrganismos responsáveis pela mastite são muitos, todavia uma das bactérias de maior incidência nos casos da doença é o *Staphylococcus aureus*, que demonstra, acima de tudo, um quadro de resistência a antibióticos muito significativo. Isso ocorre por possuir fatores de virulência que permitem sua adesão às células epiteliais, encapsulamento e formação de biofilmes. (TOPUZOĞLU *et al.* 2015). Bem como, já foi demonstrado que desde 1960 encontra-se *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA), que se disseminou globalmente e se tornou uma das principais bactérias infecciosas nos ambientes relacionados a saúde humana e animal. (LI *et al.* 2017).

Análises avaliaram a resistência do *S. aureus* coletado de amostras de leite, onde em antibióticos comumente utilizados para o tratamento da mastite, como ampicilina, cefalotina e penicilina, não possuem mais o mesmo efeito inibitório no crescimento do patógeno. Além disto, analisaram que o isolamento de fagos capazes de infectar *S. aureus*, foi eficaz em testes *in vitro*. Onde tal, demonstra poder ser uma ferramenta eficaz no controle do crescimento destas bactérias e, conseqüentemente, na prevenção e tratamento da mastite. (ORTIZ *et al.* 2018)

A demanda por novos métodos de tratamento é uma necessidade, onde a terapia fágica enquadra-se como uma opção viável para a resolução desse problema. Bacteriófagos líticos - vírus que infectam e matam bactérias - representam em alguns contextos uma alternativa segura e eficaz aos antibióticos (Kutter *et al.* 2010). Diante disto, busca-se bacteriófagos que co-evoluem com seus hospedeiros, otimizando seus mecanismos de disseminação e liberação da célula

bacteriana para o meio ambiente e causando a lise bacteriana, diminuindo a prevalência de tais microrganismos patogênicos causadores de mastite bovina.

O objetivo deste trabalho foi avaliar os quadros de bactérias resistentes a antibióticos utilizados no tratamento da mastite bovina, a partir de dados de análise de amostras de leite da região Sudoeste do Paraná, além de validar a presença de bacteriófagos nas amostras de leite regionais.

MATERIAIS E MÉTODOS

Inicialmente desenvolveu-se um estudo a partir de dados secundários fornecidos por um laboratório de análises veterinárias da região Sudoeste do Paraná. Foram consideradas as análises de antibiogramas com os antibióticos. Além disso, levou-se em consideração os dados referentes aos meses de junho, agosto, outubro e dezembro do ano de 2018 e janeiro, março, maio e julho do ano de 2019. Os dados recebidos foram organizados e plotados com o software Microsoft Excel (2010).

Os experimentos práticos foram realizados no Laboratório de Bioprocessos (LAPRO) e Laboratório de Microbiologia da Universidade Tecnológica Federal Do Paraná (UTFPR), Dois Vizinhos, Paraná, Brasil.

Para isolamento tanto dos patógenos quanto dos bacteriófagos, foram coletadas amostras de leite mastítico, em propriedades da região sudoeste do Paraná. As vacas estavam em fase de lactação sob condições adequadas de manejo e já haviam iniciado o tratamento da doença, ou seja, antibióticos como Enrofloxacin 10%, Tetraciclina, Amoxicilina, Ceftiofur e o anti-inflamatório não esteroide Flunixin meglumina, já haviam entrado em contato com o animal. Os tratamentos realizados a partir destes medicamentos não haviam apresentado resultados satisfatórios.

É importante destacar que o animal não foi retirado de sua rotina diária na produção leiteira para que a pesquisa fosse realizada. Portanto, não foi necessária uma avaliação do Comitê de Ética para Uso Animal (CEUA).

Todas as amostras foram coletadas a partir de leite obtido na rotina normal de ordenha. Como protocolo padrão da ordenha, amostras de leite são rotineiramente avaliadas na pré-ordenha para identificação de fêmeas com mastite. Assim, as amostras utilizadas neste estudo foram coletadas assepticamente em frascos estéreis após a assepsia do úbere, sendo desprezados os 3 primeiros jatos, ordenhados manualmente pelo funcionário da fazenda. Os frascos foram depositados em uma caixa térmica contendo gelo e imediatamente transportados para o laboratório.

Para o isolamento do *S. aureus* foi realizado o procedimento de acordo com La Zonby e Starzyk (1986). Brevemente, inoculou-se as amostras de leite no meio Ágar Sal Manitol e em Ágar MacConkey e ambos foram incubados a 37°C por 24 horas. Após a incubação, as colônias foram avaliadas morfológicamente e, em seguida submetidas ao teste da catalase baseado em Scibior e Czczot (2006). Foram realizadas repicagens periodicamente em placas de Petri contendo *Plate Count Agar* (PCA) e, quando necessário, cultivo líquido com *Tryptic soy broth* (TSB).

Ao final do isolamento, com a potencial obtenção do microrganismo desejado, passou-se para o isolamento do fago. A primeira etapa consiste na obtenção de um estoque heterogêneo de fagos, baseando-se na metodologia proposta por Danovaro e Middelboe (2010). Após obtido o estoque primário, o método de dupla camada de ágar foi implementado para visualização das placas de lise, a partir da metodologia de Adams (1959). Realizou-se uma adaptação no *soft ágar*, onde o TSA (*Tryptone Soft Agar*) foi substituído por PCA (*Plate Count Agar*) com uma concentração de 14,1 g/L. Este consiste na camada superior, em que tanto o estoque de fagos quanto a bactéria hospedeira são inoculados com o meio ainda no estado líquido e então vertidos sobre a camada de ágar base (23,5 g/L de PCA).

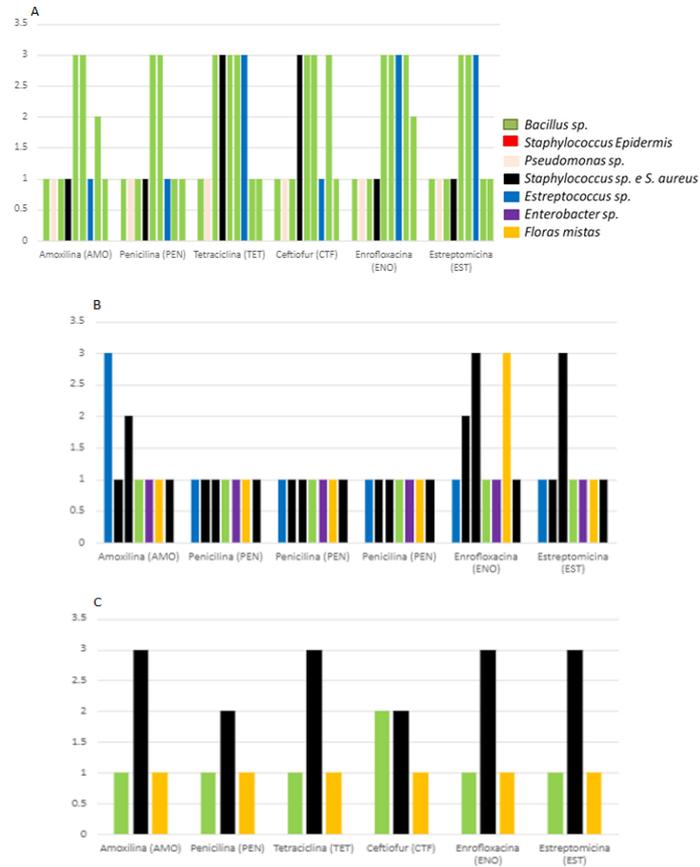
RESULTADOS E DISCUSSÕES

A fim de verificar a prevalência da resistência de microrganismos causadores de mastite, os dados referentes aos meses de agosto (Figura 1 (A)), outubro (Figura 1 (B)), dezembro (Figura 1 (C)) do ano de 2018, janeiro (Figura 2 (A)), março (Figura 2 (B)) e maio (Figura 2 (C)) do ano de 2019, obtidos a partir dos testes de antibiogramas, são apresentados abaixo conforme os medicamentos utilizados para o tratamento, Amoxicilina, Penicilina, Tetraciclina, Ceftiofur, Enrofloxacin e Estreptomicina. , Foram atribuídos números para determinar se a bactéria possui resistência (representado pelo número 1), se expressa condições de níveis intermediários de resistência (representado pelo número 2) ou no caso de apresentar sensibilidade ao antibiótico (representado pelo número 3). Este tipo de análise demonstra o quanto os microrganismos, isolados a partir de amostras de leite estão resistentes aos medicamentos utilizados para o tratamento da mastite.

Analisando os gráficos do ano de 2018, podemos perceber que, durante o mês de agosto o *Bacillus sp.* retratou 100% de sensibilidade, a *Pseudomonas sp.* 100% de resistência, o *Staphylococcus sp.* 66,7% e o *Streptococcus sp.* 50%. Em outubro houve a maior ocorrência de diversidade bacteriana nas amostras, onde *Bacillus sp.* e *Enterobacter sp.* apresentaram 100% de resistência, *Streptococcus sp.* e flora mista entre *Staphylococcus sp.* e *Pseudomonas sp.* exibiram 83,3% e o *Staphylococcus sp.* com 50%. Para finalizar o ano de 2018, dezembro mostra pouca incidência de bactérias, porém a resistência ainda ocorre em relação aos medicamentos, onde a flora mista entre *Bacillus sp.*, *Staphylococcus sp.* e *Pseudomonas sp.* aparece com 100%, o *Bacillus sp.* com 83,3% e apenas o *Staphylococcus sp.* encontra-se 100% sensível.

Avaliando os gráficos do ano de 2019, no mês de janeiro o microrganismo *Bacillus sp.* demonstrou 83,3% de resistência, *Enterobacter sp.*, *Staphylococcus sp.* e as floras mistas entre *Enterobacter sp.* e *Staphylococcus sp.* encontraram-se com 66,7%. No mês de março a flora mista entre *Staphylococcus sp.* e *Pseudomonas sp.* aparecem com 100% assim como *Bacillus sp.*, já a *Enterobacter sp.*, *Staphylococcus sp.* e as floras mistas entre *Enterobacter sp.* e *Staphylococcus sp.* apresentaram 83,3%. Em maio foi o mês de maior ocorrência na diversidade nas amostras bacterianas no ano de 2019, exibindo o *Streptococcus sp.* e as floras mistas entre *Enterobacter sp.* e *Staphylococcus sp.* e floras mistas entre *Bacillus sp.*, *Enterobacter sp.* e *Staphylococcus sp.* com 100% de resistência, *Bacillus sp.* com 83,3% e *Staphylococcus sp.* com 66,7%.

Figura 1 - Quadro de resistência microbiana no mês de outubro (A), agosto (B) e dezembro (C), do ano de 2018.

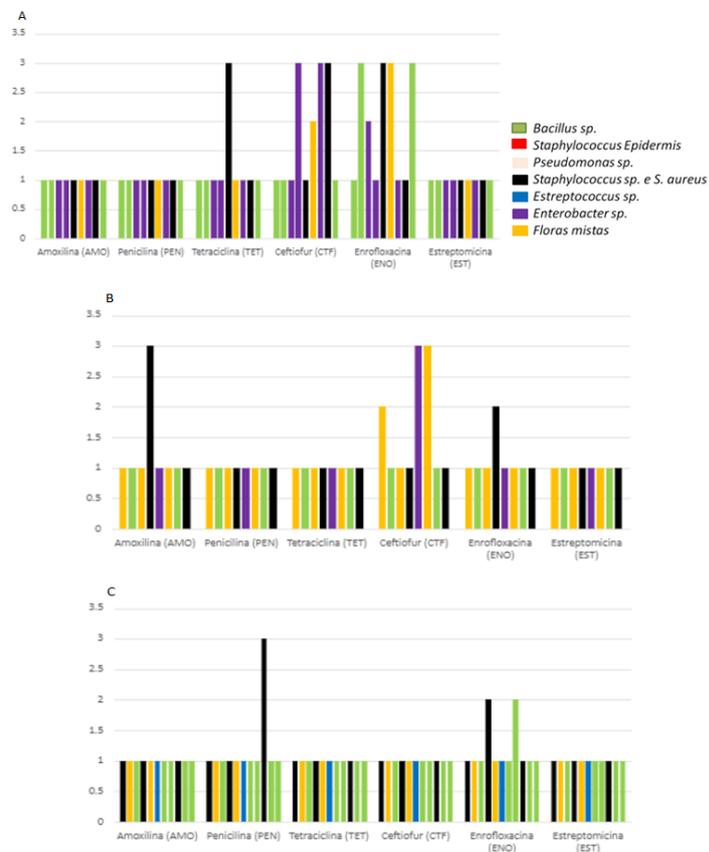


Fonte: Autoria própria (2020).

Estudos comprovaram a resistência de algumas bactérias, como *Bacillus sp.*, *Enterobacter sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e espécies de *Corynebacterium* em análises in vitro, que além de formarem biofilmes, apresentaram alta resistência em medicamentos como tetraciclina e ampicilina (HOQUE *et al.* 2020).

Ainda, em Bangladesh, foram discernidos em bactérias da espécie *Streptococcus* em relação a sua multirresistência em antibióticos utilizados para o tratamento da mastite. Entretanto nas amostras, houve casos de *Staphylococcus aureus* e *E. coli* que também apresentaram níveis de resistência quando isolados e avaliados. A diversidade de *Streptococcus* expressou genes *ermB*, *mefA*, *linB*, *tetM* e *tetO* resistentes a antibióticos, indicando perigo a saúde pública (HEAD e IBRAHIM, 2020).

Figura 2 - Quadro de resistência microbiana no mês de janeiro (A), março (B) e maio (C), do ano de 2019



Fonte: Autoria própria (2020).

No Egito observaram casos de *Corynebacterium* que isolaram de amostras de leite com mastite, além disso, destacaram a prevalência de integrons foi monitorada. Tal bactéria demonstrou resistência de nível elevado bem como foi identificado a prevalência de integrons classe 1 que codificavam a aminoglicosídeo adeniltransferase tipo A (*aadA1*) que confere resistência a agentes antimicrobianos frequentemente utilizados na pecuária leiteira (EL-TAWAB et al., 2020).

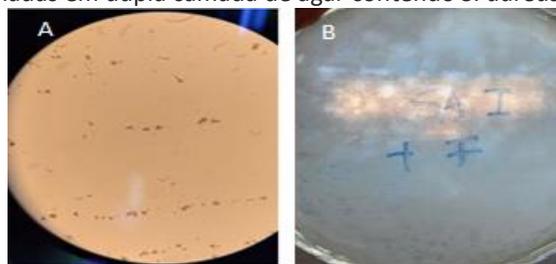
O uso exagerado de medicamentos na agricultura é alarmante, pois contribui para a crescente resistência a antibióticos utilizados na medicina humana, agravada com a sobreposição de medicamentos utilizados para diferentes fins. Com isso surgem pesquisas de O'Neill (2016) demonstram uma estimativa até o ano de 2050, onde mais de 10 milhões de mortes podem ser causadas devido à resistência bacteriana com um custo econômico aproximado, de US \$ 100 trilhões. Mostrando que a resistência é um problema global que requer atenção.

Em relação aos experimentos laboratoriais, houve crescimento bacteriano nos meios Ágar Sal Manitol e Ágar MacConkey. O aparecimento de mais de uma colônia, em meios de cultura que possuem finalidades diferentes, demonstra a diversidade bacteriana presente em uma única amostra. O Ágar Sal Manitol, desde 1945, tem sido utilizado como um meio seletivo para isolamento de estafilococos

patogênicos. Já o Ágar MacConkey, é um meio seletivo que cultiva bactérias gram-negativas fermentadoras de lactose e não fermentadoras de lactose.

As colônias consideradas potencialmente como *S. aureus* foram visualizadas em microscópio óptico para analisar sua morfologia (Figura 3), a qual apresentou uma imagem característica, em formato de cocos agrupados, de modo didático, parecidos como “cachos de uva”. Todavia o teste de catalase foi realizado para as colônias, o qual resultou positivo. Corroborando com a ocorrência do microrganismo desejado nas amostras de leite mastítico, uma vez que tal teste bioquímico é utilizado para diferenciação de estafilococos (catalase positiva) de estreptococos (catalase negativa).

Figura 3 - Imagem de microscopia óptica da possível colônia *S. aureus* (A). Placas de lise formadas em dupla camada de ágar contendo *S. aureus* (B).



Fonte: Próprio autor.

Ao se tratar do isolamento de fagos, pode-se observar nas placas que houve a ocorrência de placas de lise (Figura 3 (B)). Isto significa que, dentro do estoque heterogêneo primário, existem bacteriófagos capazes de infectar e provocar a lise celular em *S. aureus*, escolhida como hospedeiro.

Pesquisas investigaram a prevalência de fagos e *S. aureus* resistente a antimicrobianos representativos de β -lactamases e não β -lactamases, macrolídeos, aminoglicosídeos e glicopeptídeos, encontradas em amostras de leite em fazendas da África do Sul. Os bacteriófagos isolados foram capazes de reduzir a contagem de células bacterianas vivas, além de apresentar um potencial para aplicações in vivo, ou seja, demonstraram uma eficácia como recurso terapêutico para a doença. Deixando explícito a possível diminuição de casos da doença (BASDEW e LAING, 2015).

CONCLUSÃO

A partir das análises dos dados de antibiogramas realizados com amostras de leite mastítico, conclui-se que existe uma prevalência de microrganismos resistentes aos principais antibióticos utilizados no tratamento da mastite na região Sudoeste do Paraná. Além disso, foi possível identificar, presuntivamente, em laboratório cepas de *S. aureus* a partir de amostras de leite de animais cujo tratamento com antibiótico não está tendo resultados satisfatórios. Assim, está previsto como próxima fase do presente trabalho o isolamento, caracterização e validação da ação antibacteriana de bacteriófagos a partir destas mesmas amostras.

REFERÊNCIAS

CEPEA, 2013. Centro de Estudos Avançados de Economia Aplicada, ESALQ, USP. Disponível em: <http://cepea.esalq.usp.br/> Acesso em: 30 ago. 2020.

FAO, 2013. Food and Agriculture Organization of United Nations Statistical Yearbook. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/018/i3107e/i3107e00.htm> . Acesso em: 30 ago. 2020.

GUIMARÃES, J. L. B.; BRITO, M. A. V. P.; LANGE, C. C.; SILVA, M. R.; RIBEIRO, J. B.; MENDONÇA, L. C.; MENDONÇA, J. F. M.; SOUZA, G. N. Estimate of the economic impact of mastitis: A case study in a Holstein dairy herd under tropical conditions. Preventive Veterinary Medicine. V. 142, p. 46-50, jul/2017.

TOPUZOĞLU, B.; BASTAN, A.; SALAR, S. The Effect of long Term Antibiotic Treatment on Bacteriological Cure and Somatic Cell Count at Subclinical Mastitis due to Staphylococcus aureus in Lactating Dairy Cows. Vet. J Ankara Univ. 2015; 62:289–294.

LI, T.; LU, H.; WANG, X.; GAO, Q.; DAI, Y.; SHANG, J.; LI, M. Molecular Characteristics of Staphylococcus aureus Causing Bovine Mastitis Between 2014 and 2015. Front Cell Infect Microbiol. 2017.

KOCK, R.; BECKER, K.; VAN GEMERT-PIJNEN, J. E.; HARBARTH, S.; KLUYTMANS, J.; MIELKE, M.; PETERS, G.; SKOV, R. L.; STRUELENS, M. J.; TACCONELLI, E.; WITTE, W.; FRIEDRICH, W. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe. Eurosurveillance. V. 15, ed. 41, 2010.

ORTIZ, D. F. V.; CORONA, J. E. B.; MARRERO, J. G.; GALVÁN, F. M. L.; POSADAS, M. V.; ARANA, A. A. L.; SANCHEZ, C. G. F.; GARCIA, F. L.; CHÁVEZ, A. J. G. Antibiotic susceptibility of Staphylococcus aureus isolated from subclinical bovine mastitis cases and in vitro efficacy of bacteriophage. Veterinary Research Communications. 2018. V. 42, P. 243-250.

KUTTER, E.; DE VOS, D.; GVASALIA, G. et al. Terapia fágica na prática clínica: tratamento de infecções humanas. Curr Pharm Biotechnol. 2010.

LA ZONBY, J. G.; STARZYK, M. J.; Screening method for recovery of methicillin-resistant Staphylococcus aureus from primary plates. J Clin Microbiol. Ago/1986.

SCIBIOR, D.; CZECZOT, H.: Catalase: Structure, Properties, Functions , Postepy Hig Med Dosw. V. 60, P. 170, 2006.

DANOVARO R, MIDDELBOE M. Separation of free virus particles from sediments in aquatic systems. In S. W. Wilhelm, M. G. Weinbauer, Suttle CA (ed), Manual of Aquatic Viral Ecology, 2010.

ADAMS M. H. Bacteriophages. Interscience Publishers, New York, 624p, 1959.

HOQUE, M. N.; ISTIAQ, A.; CLEMENT, R. A.; GIBSON, K. M.; SAHA, O.; ISLAM, O. K.; ABIR, R. A.; SULTANA, M.; SIDDIKI, Z.; CRANDALL, K. A.; HOSSAIN, M. A. Insights into the resistome of bovine clinical mastitis microbiome, a key factor in disease complication. *Frontiers in microbiology*. 2020

MERABISHVILI, M.; PIMAY, J.P.; VERBEKEN, G.; CHANISHVILI, N.; TEDIASHVILI, M.; LASHKHI, N.; GLOTINI, T.; KRYLOV, V.; MAST, J.; VAN PARYS, L.; LAVIGNE, R.; VOLCKAET, G.; MATTHEUS, W.; VERWEEN, G.; DE CORTE, P.; ROSE, T.; JENNER, S.; ZIZI, M.; DE VOS, D.; VANECHOUTTE, M. Produção em pequena escala controlada pela qualidade de um coquetel de bacteriófago bem definido para uso em ensaios clínicos em humanos. *PLoS One*. 2009.

HAED, H. A. E, M. R.; IBRAHIM, H. M. M.; Antimicrobial profile of multiresistant *Streptococcus* spp. isolated from dairy cows clinical mastitis. V. 7. Ed. 2. 2020.

EL-TAWAB, A.A.A.; AHMAEDEL-TAWAB, A.A.A.; AHMAEDA.M.; SAAD, W.H.; First characterization of class 1 integron in *Corynebacterium bovis* isolated from subclinical cattle mastitis. V. 8. Ed. 5. 2020

BASDEW, I. H.; LAING, M. D. Investigation of the lytic ability of South African bacteriophages specific for *Staphylococcus aureus*, associated with bovine mastitis. *Biocontrol Science and Technology*. V. 25, p. 429 - 443, 2015.

TANG, K. L.; CAFFREY, N. P.; NOBREGA, D. B.; CORK, S. C.; RONKSLEY, P. E.; BARKEMA, H. W.; POLACHEK, A. M. A.; GANSHORN, H.; SHARMA, N.; DKELLNER, J.; AGHALI, W. Restricting the use of antibiotics in food-producing animals and its associations with antibiotic resistance in food-producing animals and human beings: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Planetary Health*. V. 1, ed. 8, p. e316-e327, nov/2017.

O'NEILL, J. Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations. Mai/2016.

CHAPMAN, G. H. The significance of sodium chloride in studies of staphylococci. *J Bacteriol*. 1945.

JUNG. B.; HOILAT, G. J. MacConkey médium. 2020.