

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS

DISSERTAÇÃO

**CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA
E ESTUDO FENOGENOTÍPICO DA PRODUÇÃO DE
BETALACTAMASES EM ENTEROBACTÉRIAS
ASSOCIADAS À ETIOLOGIA DA MASTITE BOVINA.**

Gabrielli Stefaninni Santiago

2013



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA E
ESTUDO FENOGENOTÍPICO DA PRODUÇÃO DE
BETALACTAMASES EM ENTEROBACTÉRIAS ASSOCIADAS À
ETIOLOGIA DA MASTITE BOVINA.**

Gabrielli Stefaninni Santiago

Sob a Orientação da Professora
Shana de Mattos de Oliveira Coelho

e Co-orientação da Professora
Miliane Moreira Soares de Souza

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração Sanidade Animal.

Seropédica, RJ
Setembro de 2013

636.2089819

S235c

T

Santiago, Gabrielli Stefaninni, 1986-
Caracterização da resistência
antimicrobiana e estudo fenogenotípico da
produção de betalactamases em
enterobactérias associadas à etiologia da
mastite bovina / Gabrielli Stefaninni
Santiago. - 2013.
83 f.: il.

Orientador: Shana de Mattos de Oliveira
Coelho.

Dissertação (mestrado) - Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias,
2013.

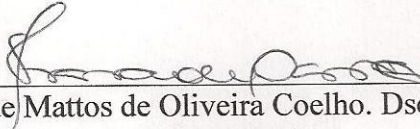
Bibliografia: f. 49-64.

1. Bovino - Doenças - Teses. 2. Mastite
- Teses. 3. Agentes intiinfeciosos -
Teses. 4. Drogas - Resistência em
microorganismos - Teses. 5. Enterobactérias
- Teses. 6. Beta lactamases - Teses. I.
Coelho, Shana de Mattos de Oliveira, 1980-.
II. Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Curso de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias. III. Título.

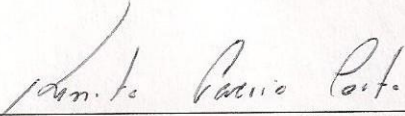
**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

GABRIELLI STEFANINI SANTIAGO

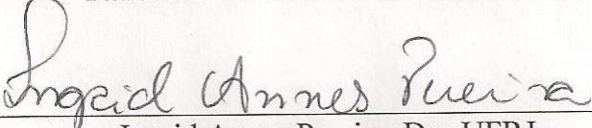
Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração em Sanidade Animal.



Shana de Mattos de Oliveira Coelho. Dsc.UFRRJ
(Orientadora)



Renata Garcia Costa. Dsc. FIOCRUZ



Ingrid Annes Pereira. Dsc.UFRJ

**“Onde há amor e sabedoria,
não tem temor e nem ignorância.”**

São Francisco de Assis

Dedico este trabalho a meus pais e irmãos,
Mell e amigos, pelo apoio recebido.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pela vida e por suas bênçãos derramadas: a linda família que me deste, os amigos mais que especiais, o amor aos animais. Obrigada, meu Deus!

Aos meus pais e irmãos: sem vocês esta conquista não teria o mesmo significado. Desculpem-me pelos momentos em que não pude estar junto com vocês. Obrigada pela compreensão e apoio em todos os momentos difíceis, e por acreditarem nos meus sonhos. Amo vocês!

Aos meus avós, pelo imenso carinho e amor, e também pelas orações; especialmente ao meu avô Valter (*in memoriam*).

À minha orientadora Shana, pela oportunidade de trabalhar nesse laboratório e fazer parte dessa equipe e, principalmente, por confiar em mim. Obrigada por toda ajuda, pela contribuição profissional e pela amizade.

À minha co-orientadora Miliane e à professora Irene, pela contribuição intelectual e pela motivação durante esse período.

Aos meus colegas de trabalho, que muito contribuíram para a realização do meu trabalho: obrigada. Em especial, aos queridos: Laura Ribeiro e Felipe Carlos Dubenczuk por todo auxílio durante os experimentos.

Às minhas colegas de graduação e mestrado, Anna Carolina Coelho Marín Rojas e Cássia Couto da Motta.

Aos amigos que fiz nos últimos anos: Bruno Rocha Pribul, Bruno Oliveira de Carvalho, Marcelo Santos de Oliva e Greiciane França Bronzato de Almeida. Obrigada pela contribuição para meu crescimento pessoal e profissional, pelos momentos divertidos e por me apoiarem sempre.

Às minhas amigas Ana Cláudia Tavares Miranda e Andresa Guimarães, agradeço pelo apoio e atenção dados em todos os momentos. Obrigada pela sincera amizade. Amo vocês!

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

A todos os funcionários do Instituto de Veterinária e do Prédio de Sanidade Animal (PSA), da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa agraciada durante o mestrado.

À Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pelos projetos que nos foram contemplados.

A todos que estiveram presente em minha vida durante esta etapa.

BIOGRAFIA

Gabrielli Stefaninni Santiago, ingressou no curso de Medicina Veterinária – da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – no ano de 2007, diplomando-se em janeiro de 2012.

Durante a graduação, foi estagiária no Laboratório de Virologia e Imunologia e monitora nas disciplinas de Sanidade Avícola, Anatomia Patológica Geral, Microbiologia Geral e Histologia Animal.

Estagiou no Laboratório de Bacteriologia Veterinária, do período de 2010 a 2012, realizando projetos na área de mastite bovina. Foi bolsista de iniciação científica da Faperj em 2011 com o projeto intitulado “Formação de biofilme durante as diferentes fases da curva de crescimento em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina”, sob a orientação da professora Dra. Shana de Mattos de Oliveira Coelho.

Em 2012, foi aprovada no processo de seleção do Curso de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, nível Mestrado, sob a orientação da professora Dra. Shana de Mattos de Oliveira Coelho.

RESUMO

SANTIAGO, Gabrielli Stefaninni. **Caracterização da Resistência Antimicrobiana e Estudo Fenogenotípico da Produção de Betalactamases em Enterobactérias Associadas à Etiologia da Mastite Bovina.** 67p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

A utilização de antimicrobianos na profilaxia das infecções intramamárias e na eliminação de prováveis fontes de infecção nas fazendas leiteiras constituem importantes medidas de controle da mastite bovina. No entanto, o uso inadequado de antimicrobianos pode gerar o aparecimento de cepas resistentes. As enterobactérias estão entre os principais agentes etiológicos da mastite bovina ambiental e são frequentemente resistentes aos antimicrobianos, em especial aos β -lactâmicos devido à produção de betalactamases. Algumas enterobactérias produzem betalactamases de amplo espectro (ESBL) como AmpC, TEM, SHV, CTX-M e carbapenemase que podem ser classificadas em diversos grupos dependendo da estrutura molecular e substrato de atuação. Além disso, podem desenvolver resistência a outros antimicrobianos que são frequentemente utilizados no tratamento de infecções causadas por enterobactérias. O presente estudo avaliou o perfil fenogenotípico de resistência aos β -lactâmicos, com ênfase na detecção de betalactamases, e outras classes de antimicrobianos em 42 isolados provenientes de 381 amostras de leite obtidas de 9 fazendas situadas na mesorregião do Rio de Janeiro-RJ de modo a contribuir com dados que ajudem no subsídio para a implementação de medidas de controle dessa enfermidade. As fazendas A e D apresentaram condições higiênico-sanitárias precárias, muita contaminação fecal e as maiores taxas de prevalência de enterobactérias no leite mastítico. Os isolados suspeitos de produzirem AmpC foram submetidos ao teste de disco aproximação que também foi realizado, em adição ao Etest, para os suspeitos de produzirem ESBL (2be). O Teste de Extrato Tridimensional (TET) foi realizado para todos estes suspeitos. A produção de carbapenemase foi avaliada por meio do Teste de Hodge Modificado e todos os isolados foram submetidos à técnica de PCR para busca dos genes *aacC2*, *qnr*, *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *bla_{CTX-M}* e *bla_{ampC}*. As enterobactérias predominantes nas amostras de leite foram o *Proteus mirabilis* (45%) e *Escherichia coli* (40%). O maior percentual de resistência foi à ciprofloxacina e os genes de resistência aos aminoglicosídeos (*aacC2*) e a quinolonas (*qnr*) foram detectados em 25% e 66,7% de isolados resistentes a estes antimicrobianos, respectivamente. Foi constatada uma elevada variabilidade no perfil fenotípico e a multirresistência foi detectada em 97,6% dos isolados avaliados. Todos os isolados produziram betalactamases, o grupo 1 foi predominante e 30% das betalactamases deste grupo foram classificadas como sendo do tipo induzível. Nenhum isolado apresentou o perfil fenotípico para ESBL (2be) nem carbapenemase. O TET confirmou a negatividade da produção de ESBL (2be) porém revelou ser pouco sensível na detecção de AmpC. Os genes *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *bla_{ampC}* e *bla_{CTX-M}* foram detectados em 61,9%, 42,8%, 23,8%, 9,5% dos isolados, respectivamente. A espécie *P. mirabilis bla_{TEM}* + pertencente ao grupo 1e e a espécie *E. coli* negativa para todos os genes pertencente ao grupo 2a foram prevalentes. Um total 66% dos isolados classificados como grupo 2 apresentou os genes *bla_{TEM}* e *bla_{SHV}* e 15% pertencentes ao grupo 1 apresentaram o gene *bla_{ampC}*. A variabilidade fenogenotípica detectada indica a presença mecanismos múltiplos de resistência antimicrobiana, o que é preocupante tendo em vista a disseminação da resistência bacteriana determinando um impacto clínico e epidemiológico para a medicina veterinária e humana.

Palavras-chave: Mastite bovina, Betalactamases, Enterobactérias.

ABSTRACT

SANTIAGO, Gabrielli Stefaninni. **Antimicrobial Resistance Characterization and Phenotypic Study of Betalactamase Production in Enterobacteria Associated with Bovine Mastitis**. 67p. Dissertation (Master's in Veterinary Science). Veterinary Institute, Department of Animal Parasitology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

The use of antibiotic in the prophylaxis of intramammary infections and in the elimination of its possible sources in dairy farms is an important control measure. However, the inappropriate use of antibiotics can result in the appearance of resistant strains. Enterobacteriaceae are the main etiological agents of environment bovine mastitis and are often resistant to antimicrobials, especially to beta-lactam antibiotics due to the production of beta-lactamases. Some Enterobacteriaceae can produce broad-spectrum beta-lactamases such as AmpC, TEM, SHV, CTX-M and carbapenemase and can be classified into several groups according the molecular structure and substrate activity. Furthermore, these bacteria may develop resistance to other antimicrobial agents which are used in the treatment of infections caused by enteric bacteria. The present study evaluated the profile fenogenotipic resistance to β -lactams, with emphasis on the detection of beta-lactamases, and other classes of antimicrobials in 42 isolates from 381 milk samples obtained from nine farms located in the middle region of the Rio de Janeiro-RJ so to contribute data to help in the grant for the implementation of measures to control this disease. Farms A and D had poor sanitary conditions, much fecal contamination and the highest rates of prevalence of Enterobacteriaceae in mastitic milk. The AmpC production was confirmed by disk approach that also was performed in addition to Etest for suspected ESBL (2be) producing. The Three-Dimensional Extract Test was conducted for all these suspects. The carbapenemase production was performed using the Modified Hodge Test and all isolates were subjected to PCR searching *aacC2*, *qnr*, *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *bla_{CTX-M}* and *bla_{ampC}*. The enterobacteria prevalent in milk samples were *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli*. The higher percentage of the resistance was to ciproflaxin and *aacC2* and *qnr* were detected in 25% and 66.7% of isolates resistant to these antibiotics, respectively. We observed a high variability in phenotypic profile and multidrug resistance was detected in 97.6% of isolates. The group 1 was predominant and 30% of betalactamases of this group were classified as inducible type. No isolate showed phenotypic profile for ESBL (2be) or carbapenemase. The TET confirmed the negativity of ESBL (2be) production but proved to be less sensitive in the detection of AmpC. The *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *bla_{CTX-M}* and *bla_{ampC}* genes were detected in 61.9%, 42.8%, 23.8%, 9.5% of isolates, respectively. Any isolate showed all *bla* genes simultaneously. The *P. mirabilis bla_{TEM}*+ belonging to a group 1e and *E. coli* negative for all genes belonging to a group 2a are prevalent. A total 66% of the isolates classified as group 2 presented *bla_{TEM}* and *bla_{SHV}* genes and 15% belonging to the group 1 showed *bla_{ampC}* gene. The pheno-genotypic variability detected indicates multiple mechanisms of antimicrobial resistance which is worrying due of the resistance bacterial spread determining a clinical and epidemiological impact for veterinary and human medicine.

Keywords: Bovine Mastitis, Betalactamases, Enterobacteria.

ÍNDICE DE FIGURAS

		Pág
Figura 1	Estrutura dos antimicrobianos β -lactâmicos (WILLIAMS, 1999).	8
Figura 2	Gráfico apresentando percentual de resistência das espécies de enterobactérias isoladas de leite proveniente de vacas com mastites.	32
Figura 3	Perfil eletroforético do gene <i>aacC2</i> (867 pb) em gel de agarose 1,5% (isolado positivo indicado com a seta). M= marcador 100 pb; 2 = isolado positivo; CP = controle positivo; 40 = isolado negativo; B = branco da reação de PCR.	33
Figura 4	Perfil eletroforético do gene <i>qnr</i> (627 pb) em gel de agarose 1,5% (isolado positivo indicado com a seta). M= marcador 100 pb; 16 = isolado positivo; CP = controle positivo; 30 = isolado negativo; B = branco da reação de PCR.	34
Figura 5	Indução da resistência pela presença do disco de imipenem pela “Zona D” formada.	39
Figura 6	a) Teste de aproximação em disco demonstrando quenão houve a deformação do halo do β -lactâmico em direção ao espaço do ácido clavulânico. b) Teste com fita de Etest [®] , não sendo possível a leitura da diferença entre o halo formado na região de ceftazidima e da associação ceftazidima-ácido clavulânico para classificação de ESBL (2be).	40
Figura 7	Teste de Extrato Tridimensional: a seta mostra a reentrância no halo, conferindo a esse isolado a confirmação da produção da enzima.	41
Figura 8	Teste de Hodge Modificado em ágar Cled (com indicador Andrade - HiMedia [®]): 3,4,7 - isolados negativos para produção de carbapenemase.	42
Figura 9	Perfil eletroforético dos gene <i>bla</i> testados em gel de agarose 1,5%. M= marcador 100 pb; B – branco da reação; 6 – isolado positivo para o gene <i>bla</i> _{TEM} (861pb); 41 – isolado positivo para o gene <i>bla</i> _{ampC} (634pb); 20 - isolado positivo para o gene <i>bla</i> _{CTX-M} (862pb); 18 – isolado positivo para o gene <i>bla</i> _{SHV} (931pb).	43

ÍNDICE DE QUADROS

	Pág
Quadro 1 Classificação de betalactamases bacterianas, segundo Bush-Jacoby (2010).	10
Quadro 2 Reações no meio de triagem Kligler Iron Agar (FIOCRUZ, 2006).	21
Quadro 3 Diferenciação de Enterobacteriaceae por testes bioquímicos, segundo Koneman et al. (2008).	23
Quadro 4 Zonas de inibição avaliadas pelo diâmetro dos antimicrobianos utilizados, segundo o CLSI (2008; 2012).	24
Quadro 5 Iniciadores empregados e condições de amplificação dos genes pela técnica de PCR.	28

ÍNDICE DE TABELAS

		Pág
Tabela 1	Espécies de enterobactérias encontradas em diferentes propriedades.	29
Tabela 2	Antibiotipagem das enterobactérias e presença dos genes de resistência a aminoglicosídeos e quinolonas.	35
Tabela 3	Antibiotipagem das bactérias avaliando todos os antimicrobianos testados.	36
Tabela 4	Classificação das betalactamases produzidas pelas distintas espécies de enterobactérias, a partir da análise interpretativa do teste de difusão em disco contendo antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos.	37
Tabela 5	Classificação das betalactamases do grupo 1 em induzíveis e não induzíveis segundo a formação de “zona D”.	39
Tabela 6	Distribuição dos genes detectados, perfis fenotípicos, grupos fenotípicos de produção de betalactamases e a origem dos isolados	43

LISTA DE ABREVIações E SÍMBOLOS

- AMH - ágar Müller-Hinton
- BHI – infusão de cérebro e coração
- CCS – contagem de células somáticas
- C. freundii* – *Citrobacter freundii*
- CIM – concentração inibitória mínima
- CIMg₂– cloreto de magnésio
- CMT – Califórnia Mastitis Test
- DEAC - *Escherichia coli* de aderência difusa
- DNA – ácido desoxirribonucléico
- EMB – Eosina Azul de Metileno
- E. aerogenes* – *Enterobacter aerogenes*
- E. cloacae* – *Enterobacter cloacae*
- EAEC - *Escherichia coli* enteroagregativa
- E. coli* – *Escherichia coli*
- EIEC - *Escherichia coli* enteroinvasora
- EHEC – *Escherichia coli* enterohemorrágica
- EPEC - *Escherichia coli* enteropatogênica
- ESBLs – Betalactamases de Espectro Estendido
- ETEC – *Escherichia coli* enterotoxigência
- h - horas
- H. alvei* – *Hafnia alvei*
- NaCl – cloreto de sódio
- KCl – cloreto de potássio
- K. pneumoniae* – *Klebsiella pneumoniae*
- LPS - lipopolissacarídeo
- MDR – bactérias multirresistentes
- MH – Müller-Hinton

MLS – macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas

mm – milímetros

mM – milimolar

M. morganii – *Morganella morganii*

MRSA – *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina

NDM – New Delhi Metalobetalactamase

nm - nanômetros

pb – pares de bases

PCR – reação em cadeia de polimerase (Polymerase Chain Reaction)

pH – potencial hidrogeniônico

pmol – picomol

P. mirabilis – *Proteus mirabilis*

RNA – ácido ribonucléico

S. aureus – *Staphylococcus aureus*

SEPEC - *Escherichia coli* septicêmica

S. marcescens – *Serratia marcescens*

TET – Teste de Extrato Tridimensional

U - unidades

UFC – unidades formadoras de colônias

UI – unidade internacional

UPEC - *Escherichia coli* uropatogênica

V – volts

µg – microgramas

µl – microlitro

°C – graus Celsius

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1	Importância das Enterobactérias na Etiopatogenia da Mastite Bovina	3
2.2	Resistência Antimicrobiana em Bastonetes Gram Negativos	6
2.2.1	Resistência aos β -lactâmicos	7
2.2.1.1	<i>bla</i> _{TEM}	11
2.2.1.2	<i>bla</i> _{SHV}	11
2.2.1.3	<i>bla</i> _{CTX-M}	12
2.2.1.4	<i>bla</i> _{ampC}	13
2.2.1.5	Carbapenemases	14
2.2.2	Resistência às quinolonas	15
2.2.3	Resistência aos aminoglicosídeos	16
2.2.4	Resistência ao sulfametoxazol+trimetoprim	16
2.3	Resistência aos Antimicrobianos na Mastite Bovina	17
3	OBJETIVOS	19
3.1	Objetivo Geral	19
3.2	Objetivos Específicos	19
4	MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1	Amostragem	20
4.2	Identificação das Enterobactérias	20
4.2.1	Diagnóstico presuntivo através do meio de triagem Kligler Iron Agar	20
4.2.2	Avaliação do perfil bioquímico	21
4.3	Deteção Fenotípica de Resistência aos Antimicrobianos	24
4.3.1	Avaliação da suscetibilidade antimicrobiana através do método de difusão em disco em ágar (CLSI, 2008; 2012)	24

4.3.1.1	Seleção dos discos	24
4.3.1.2	Preparo do inóculo	25
4.3.1.3	Execução da técnica	25
4.3.1.4	Leitura e interpretação	25
4.3.1.5	Controle de qualidade do teste	25
4.4	Confirmação da Produção de Betalactamases	25
4.4.1	Pesquisa de Betalactamases de Amplo Espectro (ESBL – 2be) e AmpC	25
4.4.1.1	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para avaliação de ESBL (2be) – através da fita de E-test	26
4.4.1.2	Teste de aproximação em disco para avaliação de ESBL	26
4.4.1.3	Teste de aproximação em disco para avaliação de AmpC	26
4.4.1.4	Avaliação da produção de AmpC e ESBLs, por meio do Teste de Extrato Tridimensional (TET)	26
4.4.2	Avaliação da produção de carbapenemase (<i>metalobetalactamase</i>)	26
4.4.2.1	Teste de Hodge modificado	27
4.5	Detecção de Genes de Resistência	27
4.5.1	Extração do DNA bacteriano	27
4.5.2	Técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) e eletroforese em gel de agarose	27
4.6	Análise Estatística	28
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1	Identificação das Enterobactérias	29
5.2	Detecção Fenogenotípica da Resistência Antimicrobiana	31
5.3	Detecção Fenogenotípica da Produção de Betalactamases	37
6	CONCLUSÕES	47
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
8	ANEXOS	65

8.1	ANEXO A Esquema de identificação de betalactamases.	65
8.2	ANEXO B Laudo de <i>E. coli</i> enviadas a FIOCRUZ para confirmação.	66
8.3	ANEXO C Avaliação de sensibilidade e especificidade para o TET.	67

1 INTRODUÇÃO

A mastite é uma inflamação da glândula mamária, sendo descrita até hoje como a doença mais comum e dispendiosa do gado leiteiro. Além das alterações dos seus principais componentes, deve-se considerar os aspectos de saúde pública, pela veiculação de microrganismos no leite, acarretando a perda da qualidade nutritiva e higiênica para o consumidor. A mastite bovina do tipo ambiental é associada principalmente às bactérias Gram negativas, microrganismos comumente pertencentes à família Enterobacteriaceae. Estes microrganismos são preferencialmente encontrados no habitat normal dos animais, em locais que apresentam esterco, urina, barro e camas orgânicas. Muitos fatores estão associados à ocorrência dessa mastite, como a estação do ano, limpeza do ambiente, nutrição, estado imunológico, raça, idade e período de lactação da vaca.

A resistência antimicrobiana em bactérias Gram negativas apresenta uma grande variedade de padrões relacionados à resistência natural bem como à resistência adquirida pela veiculação de genes intraespecíficos ou provenientes de espécies e gêneros diferentes. A produção de betalactamases codificadas por plasmídeos que conferem resistência às penicilinas, mas não às cefalosporinas de amplo espectro, é um dos principais mecanismos encontrados dentre os membros da família Enterobacteriaceae.

Em adição, algumas enterobactérias podem também produzir betalactamases de espectro estendido que podem ser classificadas filogeneticamente como “*Serina-Beta-Lactamases*” e “*Metallo-Beta-Lactamases*” que juntas formam os dois grandes grupos de enzimas que possuem a capacidade de degradar β -lactâmicos. A classificação molecular proposta por Ambler (1980) considera a homologia da sequência de nucleotídeos e aminoácidos, agrupando as betalactamases em quatro classes: A, B, C e D. Já a classificação funcional proposta por Bush e Jacoby (2010) dividem as betalactamases segundo suas características bioquímicas, enzimáticas e imunológicas em quatro grupos: 1, 2, 3 e 4 que se dividem em distintos subgrupos. Os grupos de enzimas mais encontrados em enterobactérias são o 1 (classe C) e 2 (classe A e D).

As enterobactérias produtoras de enzima do grupo 1 apresentam atividade aumentada contra cefalosporinas, especialmente cefoxitina que é utilizado como marcador de caracterização. O grupo 2 constitui o maior número de enzimas caracterizadas, destacando-se o subgrupo 2b que hidrolisam penicilinas e cefalosporinas e a variação 2be (ESBL propriamente dita) que apresenta amplo espectro sobre vários antimicrobianos como ceftazidima, cefotaxima e aztreonam, e são fortemente inibidos pelo ácido clavulânico.

As betalactamases são codificadas por genes chamados *bla*, que podem estar presentes no cromossomo bacteriano ou em plasmídeos. A expressão dos genes *bla* pode ser induzida pela presença dos β -lactâmicos ou estar continuamente ativada. Dentre os principais genes que codificam betalactamases de espectro estendido estão *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} e *bla*_{ampC} que codificam as enzimas TEM, SHV, CTX-M e AmpC, respectivamente.

As enzimas do grupo TEM, dependendo do tipo de substrato que hidrolisam, podem produzir penicilinases, betalactamases de amplo espectro (ESBL - 2be) ou betalactamases resistentes a inibidores (*Inhibitor Resistant TEM*).

O nome SHV está relacionado com as propriedades bioquímicas destas enzimas (Sulphydryl Variable) e as enzimas deste tipo podem hidrolisar diversos β -lactâmicos de acordo com as alterações que ocorrem próximo ou no seu sítio ativo podendo inclusive desenvolver resistência aos inibidores de betalactamases (*Inhibitor Resistant SHV* ou IRS).

As enzimas CTX-M (cefotaximases) constituem o grupo de ESBL de emergência mais recente, elas hidrolisam preferencialmente a cefotaxima e atualmente, são as ESBL mais frequentemente encontradas em espécies da família Enterobacteriaceae.

As enzimas do tipo AmpC tem atividade sobre oximiinocefalosporinas, assim como sobre penicilinas e monobactâmicos. Algumas são fracas hidrolisadoras de imipenem quando expressas em grandes quantidades, além de serem fracamente inibidas por ácido clavulânico.

Bactérias produtoras de betalactamases de espectro estendido também podem apresentar resistência a outros fármacos não β -lactâmicos, o que causa um verdadeiro dilema no que diz respeito à terapêutica a ser utilizada nesses casos. Além disso, estas bactérias podem conter genes de resistência a outros antimicrobianos, como as quinolonas (*qnr*) e aminoglicosídeos (*aacC2*) que são utilizados no tratamento de infecções causadas por enterobactérias.

O grupo das betalactamases é amplamente estudado em microbiologia clínica humana e é emergente no âmbito veterinário, podendo ser detectado em isolados provenientes de leite de vaca, carnes bovina, suína e de frango, e fezes de diversos animais. O conhecimento de padrões de resistência aos antimicrobianos é fundamental para o desenvolvimento de métodos preventivos efetivos para o controle da doença e para a elaboração de estratégias de tratamento quando necessário. Logo, o presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar o perfil de resistência antimicrobiana, em especial aos β -lactâmicos, em enterobactérias isoladas de amostras de leite bovino. Além disso, visa agregar conhecimento aos estudos relacionados a etiopatogenia da mastite bovina desenvolvidos pela equipe do Laboratório de Bacteriologia Veterinária nos últimos anos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Importância das Enterobactérias na Etiopatogenia da Mastite Bovina

A mastite é uma inflamação da glândula mamária, sendo descrita até hoje como a doença mais comum e dispendiosa do gado leiteiro (LANGONI et al., 2009; BRASIL, 2012). Dentre as causas desta inflamação estão: estresse, ferimentos físicos, metabolismo e infecção por bactérias invasivas e outros microrganismos (FREITAS et al., 2005; TOZZETTI et al., 2008).

Muitos prejuízos são causados por essa infecção, tanto para o consumidor quanto para o produtor. A infecção da glândula mamária altera os principais componentes do leite, e pode acarretar em veiculação de microrganismos no leite, acarretando a perda da qualidade nutritiva e higiênica para o consumidor (LANGONI et al., 2009). Considerando os prejuízos relacionados ao sistema de produção, destaca-se a intensidade do quadro clínico que pode acarretar morte do animal infectado devido aos efeitos sistêmicos das endotoxinas liberadas por esses agentes (HOGAN & SMITH, 2003).

São citados na literatura mais de 130 agentes envolvidos na sua etiologia, incluindo-se bactérias, fungos, algas e vírus (SILVA et al., 2008). Especificamente em relação à mastite ambiental, sua causa está associada às bactérias que vivem no ambiente de ordenha ou de curral, principalmente no esterco, na cama orgânica e até mesmo na água de bebida ou de limpeza. Logo, a fonte ou reservatório dessas bactérias contaminantes não é a glândula mamária de vacas infectadas, e sim principalmente, o ambiente onde os animais são criados (TYLER e CULLOR, 2006). A sua transmissão ocorre por contato direto da glândula mamária com material contaminado e principalmente no período entre as ordenhas (CASSOL 2010 *apud* PERES NETO et al., 2011).

Muitos fatores estão associados à ocorrência da mastite ambiental, como a estação do ano, limpeza do ambiente, nutrição, estado imunológico, raça, idade e período de lactação da vaca. Além disso, dois fatores de virulência auxiliam a multiplicação das enterobactérias na glândula mamária: a capacidade de sobreviver em condições de baixa tensão de oxigênio e sua habilidade de utilizar a lactose como fonte energética (HOGAN & SMITH, 2003).

A limpeza do local onde os animais vivem é de grande importância. O material utilizado como cama deve ser de preferência inorgânico para evitar a proliferação de microrganismos e então servir como mantenedor deles no ambiente. Aconselha-se ainda manter o animal em pé durante a primeira hora após a ordenha para reduzir a exposição da extremidade da teta às bactérias nesse período crítico no qual o esfíncter do teto está relaxado. Geralmente, para isso, os animais são alimentados após a ordenha fazendo com que eles fiquem em estação (RODENBURG, 2012).

Segundo Miguel (2010), a carga microbiana inicial do leite está diretamente associada à qualidade da água utilizada para limpeza das teteiras mecânicas. Muitas propriedades não utilizam água tratada e historicamente, a incidência de contaminação das águas subterrâneas, principalmente de poços profundos, geralmente tem sido considerada baixa. No entanto, nos últimos anos, as atividades agrícolas, focadas em grandes operações de criação intensiva, têm criado condições ambientais que possibilitam a contaminação biológica das águas subterrâneas. Em particular, lençóis freáticos superficiais em solos arenosos, tem alto risco de estarem contaminados. Poços mal vedados e mal localizados também são responsáveis por uma grande percentagem dos aquíferos contaminados (Centro de Vigilância Epidemiológica/CVE/SES-SP).

O período do ano também influencia na incidência de infecção por bactérias ambientais, assim como o período de lactação e anatomia do úbere das vacas. Durante o verão, a taxa é mais alta em vacas confinadas e em animais criados a pasto, a taxa é maior em períodos chuvosos e úmidos. No início da lactação, a infecção ocorre com maior frequência; e naqueles animais cujas raças possuem úberes mais pendulares há maior predisposição a lesões nos tetos e com isso facilita a penetração das bactérias, aquelas vacas mais velhas também sofrem com esse problema, pois possuem os ligamentos do úbere mais frouxos (HOGAN & SMITH, 2003).

Assim também, há influência de nutrientes no desenvolvimento das mastites como a deficiência de algumas vitaminas e minerais, pois eles podem auxiliar na manutenção ou no aumento da resistência da glândula mamária às infecções. Há relatos de tratamentos com suplementação de vitamina E e selênio podem diminuir os casos de mastite clínica no rebanho (SCHVARZ & SANTOS, 2012).

Dentre as bactérias ambientais mais comuns causadoras da mastite bovina de origem ambiental estão as enterobactérias (KAIPAINEN et al., 2002; RIBEIRO et al., 2006). Estas infectam a glândula mamária devido ao seu comportamento oportunista, que é veiculado pelas fezes dos animais, água e outros substratos ambientais, utilizando a via ascendente do canal galactóforo como porta de entrada (EBERHART 1979 *apud* MOREIRA et al., 2008).

As enterobactérias constituem o maior e mais heterogêneo grupo de microrganismos, são ubíquos e constituintes da microbiota intestinal normal da maioria dos animais (SANTOS, 2006). Os membros dessa família podem colonizar pessoas e animais, sendo os imunocomprometidos ou debilitados altamente suscetíveis às infecções. Os procedimentos invasivos e as mucosas traumatizadas e/ou cortadas são portas de entrada ao microrganismo (KONEMAN et al., 2008).

Essas bactérias pertencem à família Enterobacteriaceae, apresentam-se sob a forma de bacilos e são Gram negativas, medindo em média 1 a 5 µm de comprimento. Esses microrganismos são móveis, dotados de flagelos peritríquios, ou imóveis, não formadores de esporos. As enterobactérias fermentam açúcares originando uma variedade de produtos finais, reduzem o nitrato, são catalase positivas. Devido à ausência da atividade de citocromo-oxidase, as enterobactérias são oxidase negativas, podendo diferenciá-las de outros bacilos Gram negativos fermentadores e de não fermentadores. As colônias dessa família apresentam características diferenciadas em meio ágar EMB (Eosina Azul de Metileno) e ágar MacConkey (O'HARA, 2005; MADIGAN et al., 2010).

As endotoxinas são lipopolissacarídeos (LPS) farmacologicamente ativos que estão contidos no interior das paredes celulares das espécies Gram-negativas. Esses LPS são estruturados por três regiões: uma porção variável externa de carboidratos que determina a especificidade antigênica, um cerne ou centro de polissacarídeo que é estruturalmente similar entre as espécies e uma porção lipídica altamente conservada, denominada lipídeo A. Assim, quando há a liberação deste LPS, ocorre o choque endotóxico que pode causar febre, leucopenia, hemorragia capilar, hipotensão e colapso circulatório, podendo levar o hospedeiro à morte. Esses efeitos podem ser atribuídos primariamente ao lipídeo A, que é altamente antigênico e tem determinantes comuns a todas as cepas de bacilos Gram-negativos (KONEMAN et al., 2008).

Os principais gêneros pertencentes a essa família são: *Escherichia* sp., *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Morganella* spp., *Yersinia* spp., *Enterobacter* spp. e *Serratia* spp. (GONÇALVES, 2010).

Os membros do gênero *Escherichia* são habitantes do intestino de animais de sangue quente, incluindo humanos, embora não sejam os organismos dominantes nesse habitat. Algumas linhagens são de grande importância para seus hospedeiros enquanto outras são

patogênicas podendo causar doenças graves. *Escherichia coli*, um agente oportunista, é a espécie mais isolada em casos de mastite ambiental (SANTOS, 2006; MADIGAN et al., 2010). Os fatores de virulência incluem toxinas, adesinas, invasinas, presença de cápsula, captação de ferro, fator necrosante citotóxico. A sorotipagem é feita baseada em antígenos – O, H, K, sendo conhecido mais de 700 tipos antigênicos (SANTOS, 2006; COSTA, 2011). As cepas de *E. coli* enterovirulentas podem ser divididas em categorias: ETEC - *E. coli* enterotoxigênica, EPEC - *E. coli* enteropatogênica, EIEC - *E. coli* enteroinvasiva, EHEC - *E. coli* enterohemorrágica, EAEC - *E. coli* enteroagregativa, DAEC - *E. coli* de aderência difusa, UPEC - *E. coli* uropatogênica, SEPEC - *E. coli* septicêmica. Alguns métodos utilizados na detecção dessas bactérias são reações bioquímicas, sorotipagem, métodos fenotípicos baseados nas características de virulência e métodos de detecção molecular (NGUYEN et al., 2005; RASKO et al., 2008).

Outro agente de importância nas mastites bovina é do gênero *Klebsiella*, em especial a espécie *Klebsiella pneumoniae*. Essa bactéria está presente no ambiente e também na pele do teto podendo colonizar o tecido causando infecção no teto (ZADOKS et al., 2011). O gênero *Proteus* caracteriza-se pela rápida motilidade e pela produção da enzima urease e as espécies de *Serratia* e *Enterobacter* podem ser isoladas de água, esgoto, intestino de animais e humanos. Esses agentes também podem causar mastite em bovinos pela sua disseminação no ambiente (MADIGAN et al., 2010; ZADOKS et al., 2011).

As enterobactérias causam uma mastite que tende a se apresentar na forma clínica aguda e, algumas vezes na forma hiperaguda, em que se observa febre, perda de apetite, desidratação e, ocasionalmente, morte do animal (BRITO et al., 2009).

Estas bactérias evadem o sistema imunológico, como no caso de *Klebsiella* spp. que possui cápsula e camufla-se contra a opsonização mediada por anticorpos bloqueando a deposição de complemento. A vacinação com antígenos específicos de Gram negativos é uma opção para aumentar os títulos de anticorpos dos animais. Essa imunização primária é feita ao final da lactação com reforços durante o período da seca e ao parto (HOGAN & SMITH, 2003).

O teste realizado antes da ordenha para detecção de mastite clínica é a caneca de fundo preto ou caneca telada, na qual se podem observar os grumos e pus presentes no leite. A Contagem de Células Somáticas (CCS) no tanque de leite proveniente de animais com este tipo de mastite é menor que 300.000 células (HOGAN & SMITH, 2003; BRASIL, 2012).

O tratamento da mastite clínica é feito com antibioticoterapia muitas vezes associada a terapia de suporte – fluidoterapia, antiinflamatórios e ocitocina – (HENRIQUE, 2009). O controle dessa mastite é problemático, pois o contato das bactérias ambientais com a glândula mamária pode ser reduzido, porém nunca eliminado e depende do manejo. Então se deve reduzir a exposição da extremidade da teta a estes patógenos e melhorar a resistência das vacas a infecções intramamárias além de primar pelo uso correto de antimicrobianos com o intuito de evitar o desenvolvimento de resistência dos microrganismos (GARCIA, 2004; PERES NETO, 2011). Muitas vezes, a própria defesa do animal elimina a infecção mamária (aproximadamente 20 a 30% das infecções da glândula mamária). Dessa forma, a adoção de boas práticas de manejo, alimentação adequada e um ambiente livre de estresse podem contribuir para a redução das infecções (TOZZETTI et al., 2008).

Segundo o National Mastitis Council Research Committee Report (2004) o tratamento de mastite é a causa mais comum de resíduos de antimicrobianos no leite e muito se discute sobre a capacidade destes resíduos em induzir resistência a antimicrobianos em humanos (SILVA et al., 2008). Além disso, estes resíduos interferem na produção dos derivados, inviabilizando muitas vezes a produção destes (NETTO et al., 2005).

O Regulamento Industrial de Inspeção Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA - (BRASIL, 1981) proíbe a adição de qualquer substância química ao leite fluído destinado à alimentação humana. Os resíduos de antimicrobianos no leite são resultado da aplicação de diferentes substâncias antimicrobianas no rebanho leiteiro para prevenção ou tratamento das mastites. A presença desses resíduos no leite tem sido um dos maiores desafios impostos aos órgãos responsáveis pela saúde pública e à indústria de alimentos no mundo (NETTO et al., 2005). A Instrução Normativa 51 descreve a necessidade de realizar testes para verificar resíduos antimicrobianos no leite, alguns não podem estar presentes e o outros devem estar dentro do limite de segurança estabelecido (BRASIL, 2002). Quando presentes no leite, os resíduos podem causar reações de hipersensibilidade, interferir na manufatura de produtos lácteos pela inibição de culturas lácticas e induzir o aparecimento da resistência à antibioticoterapia (FONSECA & SANTOS, 2000). A resistência antimicrobiana nas enterobactérias é uma característica importante e os membros dessa família apresentam uma grande variedade de padrões de resistência natural além da resistência adquirida pela aquisição de genes provenientes de bactérias da mesma espécie e/ou de espécies e gêneros diferentes (LIVERMORE, 2003).

2.2 Resistência Antimicrobiana em Bastonetes Gram Negativos

A resistência aos antimicrobianos apresenta um problema de saúde pública mundial e seu aumento tem ocorrido de forma alarmante, sendo estimado que, o uso de fármacos para o tratamento de infecções possa resultar em perda de efetividade (WHO, 2007). Sua descoberta foi um grande avanço para a aplicação terapêutica tanto na medicina humana quanto na veterinária. Porém, a pressão seletiva, a qual os microrganismos tem sido expostos, tem feito com que eles desenvolvam mecanismos de proteção (MOTA et al., 2005).

A emergência da resistência antimicrobiana entre patógenos de impacto na saúde animal tem sido uma preocupação crescente em medicina veterinária. Isto se explica pelo fato de que a maioria das classes de agentes antimicrobianos utilizados possuem análogos humanos, refletindo diretamente na resistência antimicrobiana na medicina humana. Especificamente no caso da mastite, os resíduos dos antimicrobianos utilizados no rebanho podem ser ingeridos pelos seres humanos através de produtos lácteos ou ainda os agentes patogênicos podem ser transmitidos aos homens pela ingestão de produtos lácteos contaminados, pelo contato direto com os animais de produção ou através do ambiente (SRINIVASAN et al., 2007).

Segundo Fuchs (2004), a resistência bacteriana do tipo primário é apresentada por espécies naturalmente resistentes aos antimicrobianos. E a adquirida consiste em um fenômeno genético relacionado à existência de genes contidos em microrganismos que codificam diferentes mecanismos bioquímicos, impedindo a ação de diversos fármacos (FRERE, 1995; KAYE et al., 2000).

A resistência natural das bactérias é uma característica intrínseca que ocorre sem uma exposição prévia ao antimicrobiano. O grande número de espécies dentro da família das enterobactérias acarreta uma elevada variedade de padrões de sensibilidade natural (RISUEÑO et al., 2002). O conhecimento da resistência intrínseca das diferentes espécies auxilia na escolha das estratégias de tratamento empírico (RIVERÓN et al., 2003; RICE & BONOMO, 2005).

Dentre as formas de resistência natural em Gram negativos estão aquelas em que o antimicrobiano não atua no alvo por não penetrar a célula - por motivos de impermeabilidade da membrana externa ao tamanho da molécula ou pela característica hidrofílica – e/ou tamanho das proteínas da membrana externa, denominadas porinas (FLUIT et al., 2001;

BRASIL, 2007; BOERLIN & WHITE, 2010). Dentre os mecanismos mais comuns de resistência natural, destaca-se:

- resistência intrínseca a MLS (macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas) que ocorre devido a uma baixa permeabilidade da membrana exterior aos compostos hidrofóbicos (FLUIT et al., 2001);

- impermeabilidade da membrana plasmática aos macrolídeos devido ao seu tamanho molecular (BOERLIN & WHITE, 2010);

- permeabilidade limitada da membrana plasmática responsável pela resistência à penicilina, eritromicina, clindamicina e vancomicina (BRASIL, 2007).

Já a resistência adquirida é aquela na qual o microrganismo necessita de exposição prévia ao antimicrobiano para desenvolver mecanismos para burlar a ação dos medicamentos (MADIGAN et al., 2010). O desenvolvimento da resistência em uma bactéria ocorre por meio de mutações ou por aquisição de material genético extracromossômico proveniente de outras bactérias. Quando ocorre mutação, a bactéria pode adquirir resistência cromossômica por meio da alteração ou superprodução do alvo, por mudanças na síntese de proteínas ligadas à permeabilidade alterando a entrada e o acúmulo da droga dentro da célula ou dificultando o encontro do fármaco com o seu alvo (MOTA et al., 2005). Em caso de resistência por aquisição de material genético, a transferência de genes ocorre horizontalmente por meio de plasmídeos ou outro material genético móvel, como integrons e transposons. Desta maneira, uma bactéria pode adquirir a resistência a um ou a vários antimicrobianos sem a necessidade de ter sido exposto a este fármaco (RIVERÓN et al., 2003).

Tendo em vista os vários mecanismos de resistência aos fármacos utilizados atualmente, a comunidade científica e médica vem procurando por alternativas e novas estratégias para combater bactérias resistentes (SILVEIRA et al., 2006).

2.2.1 Resistência aos β -lactâmicos

A classe dos antimicrobianos β -lactâmicos é constituída por penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenemas (figura 1) (SOUSA et al., 1998). Estes fármacos estão entre os mais prescritos em todo o mundo devido a sua baixa toxicidade e constituem as principais escolhas terapêuticas para o tratamento de infecções causadas pelos gêneros da família Enterobacteriaceae juntamente às fluoroquinolonas (LIVERMORE, 1995; COQUE et al., 2008).

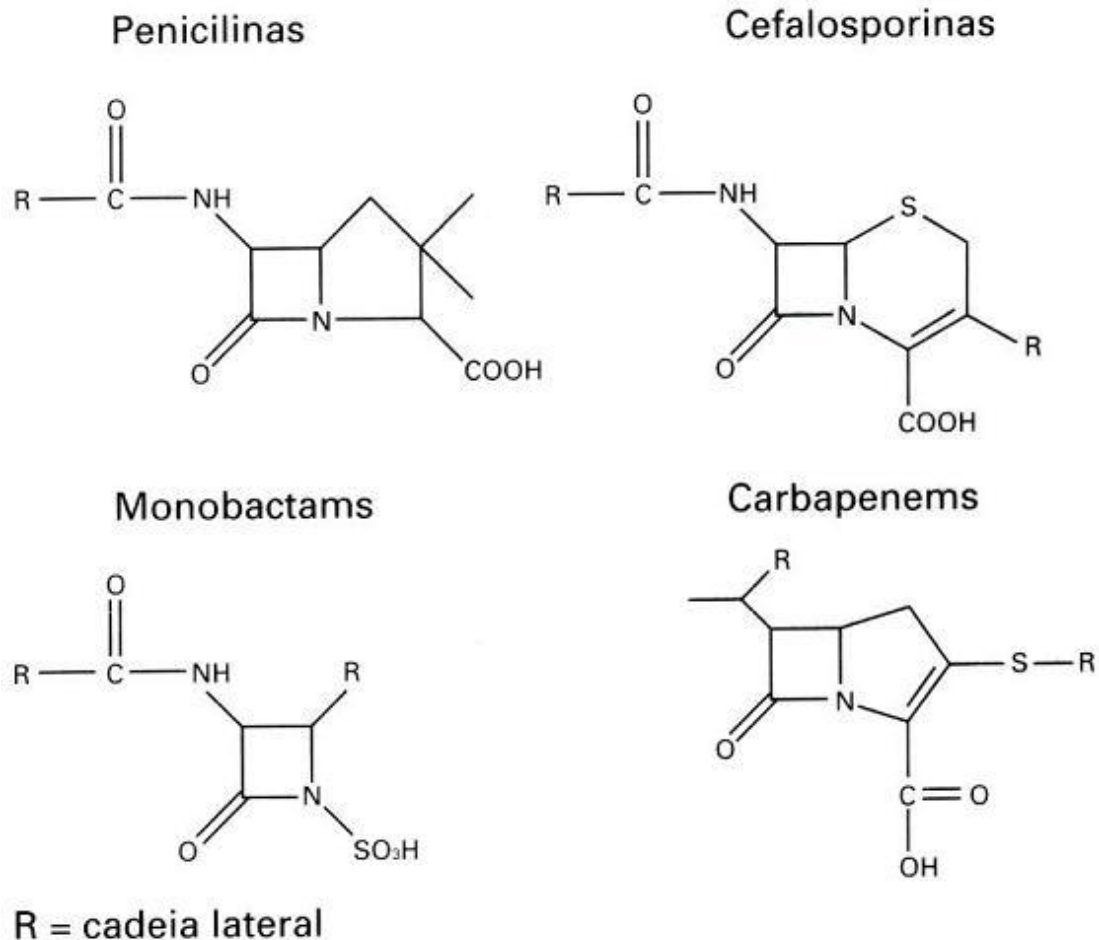


Figura 1: Estrutura dos antimicrobianos β -lactâmicos (WILLIAMS, 1999).

Os antimicrobianos β -lactâmicos inativam um conjunto de transpeptidases que catalisam ligações cruzadas na fase final de síntese do peptidoglicano (KASMAR & HOOPER, 2009). A classe dos β -lactâmicos contém o núcleo principal sendo um anel β -lactâmicos ligado a um radical. O radical é a parte que os diferencia em penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos, sendo esse último destituído de radical ligado ao núcleo β -lactâmicos. Apenas são ativos contra bactérias em crescimento e são desprovidos de qualquer atividade contra bactérias sem parede (NOGUEIRA, 2011).

A resistência aos β -lactâmicos apresentada por espécies desta família pode ser decorrente de diversos mecanismos, como a redução da permeabilidade ao fármaco pela perda ou redução na expressão de porinas, pela hiperexpressão de bombas de efluxo e pela produção de enzimas que inativam o fármaco, chamadas betalactamases (GUPTA et al., 2006; PEREZ et al., 2007). A resistência aos β -lactâmicos também dependerá da quantidade de enzima produzida, da habilidade em hidrolisar o antimicrobiano e da velocidade com que o β -lactâmico penetra pela membrana externa (BRADFORD, 2001; SOUSA Jr et al., 2004).

As betalactamases são enzimas capazes de catalisar a hidrólise do anel β -lactâmico através da hidroxilação irreversível da ligação amida do anel β -lactâmico, gerando compostos sem atividade antimicrobiana. A atividade de hidrólise do β -lactâmico pode variar de acordo com o tipo de substrato bem como com a suscetibilidade aos inibidores de betalactamases, como ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam (BUSH, 2001; SOUSA Jr et al., 2004). A produção de betalactamases é o mais importante mecanismo de resistência contra agentes β -

lactâmicos encontrado em bactérias Gram negativas. Estas enzimas são armazenadas no espaço periplasmático das bactérias Gram negativas (LIVERMORE, 1995; SANTOS, 2006).

Membros da família Enterobacteriaceae comumente expressam betalactamases codificadas por plasmídeos que conferem resistência às penicilinas mas não às cefalosporinas de amplo-espectro (LIVERMORE, 1995). Em 1983, um novo grupo de enzimas logo nomeadas de Betalactamases de Espectro Estendido foi detectado em cepas de *Serratia marcescens* e *Klebsiella pneumoniae* na Alemanha (KNOTHE et al., 1983). E este fenômeno já foi encontrado em outras enterobactérias, como em *Escherichia coli*, *Proteus* sp., e também em bacilos Gram negativos não-fermentadores de glicose, como a *Pseudomonas aeruginosa* (AMBLER, 1980).

A síntese de betalactamases de espectro estendido pode ser induzida em algumas espécies bacterianas durante a terapêutica antimicrobiana, tendo em vista que virtualmente todas as bactérias Gram negativas produzem estas enzimas (SADER et al., 1999).

Além disso, a produção de betalactamases de amplo espectro está frequentemente associada à resistência a outros antimicrobianos em patógenos multirresistentes (BUSH et al., 1995).

Dois esquemas são comumente utilizados para a classificação das betalactamases; a classificação molecular de Ambler (AMBLER, 1980) e a classificação funcional proposta por Bush, inicialmente em 1989, e ampliada por Bush-Jacoby-Medeiros (BUSH et al., 1995; BUSH & JACOBY, 2010) (quadro 1). A primeira baseia-se na homologia de aminoácidos entre as enzimas, e reconhece quatro classes, designadas de A a D. As classes A, C e D são enzimas que contém serina em seu sítio ativo; a classe B é representada pelas metaloenzimas, contendo zinco no sítio ativo. Já a classificação de Bush-Jacoby-Medeiros baseia-se na similaridade entre os perfis de substratos e inibidores das betalactamases, classificando as enzimas de 1 a 4, com subdivisões e é considerada de mais utilidade em estudos microbiológicos (TOLENTINO, 2009).

A detecção dessas enzimas pode ser feita de forma fenotípica e genotípica. Para identificação inicial de bactéria produtora de betalactamase deve-se utilizar a metodologia proposta pelo CLSI (2008; 2012), que utiliza antimicrobianos “marcadores” da possível presença dessas enzimas e a presença de halo menor que o descrito é considerado indicativo de isolado produtor de betalactamase. A confirmação desse fenômeno pode ser feita por testes adicionais dependendo do tipo de enzima suspeita como:

- Concentração Inibitória Mínima (CIM) - que pode ser realizado por meio do Etest que apesar do apresentar elevado custo para a realização em laboratório de rotina pode ser uma alternativa na confirmação de ESBL (SOUSA Jr et al., 2004);

- Aproximação em disco com os betalactâmicos distribuídos ao redor do disco de amoxicilina+ácido clavulânico para confirmação de ESBL (JARLIER et al., 1988);

- Teste enzimático tridimensional (TET) para a confirmação da produção de ESBL utilizando o disco de ceftazidima e AmpC utilizando o disco de cefoxitina (SHAHID et al., 2004; SOBIA et al., 2011);

- Teste de Hodge Modificado (THM) (CLSI, 2012) para confirmação da produção de carbapenemase com o disco de ertapenem, que é o mais sensível indicador da produção de carbapenemase.

As betalactamases são codificadas por genes chamados *bla*, que podem estar presentes no cromossomo bacteriano ou em plasmídeos. A expressão dos genes *bla* pode ser induzida pela presença dos β-lactâmicos ou estar continuamente ativada. Assim, as betalactamases podem estar presentes de forma induzível ou constitutiva (LIVERMORE, 1995).

Quadro 1. Classificação de betalactamases bacterianas, segundo Bush-Jacoby (2010).

Grupo segundo Bush-Jacoby (2009)	Classe Molecular (subclasse)	Substrato	Ação de inibidores	Características	Exemplo de enzimas
1	C	Cefalosporinas	Não	Melhor hidrólise de cefalosporinas do que de benzilpenicilinas; hidrolisa cefamicina.	<i>E. coli</i> AmpC, CMY-2, FOX-1, MIR-1, P99, ACT-1.
1 E	C	Cefalosporinas	Não	Hidrólise aumentada de ceftazidimae frequentemente outras oxiiimino- β -lactâmicos	GCI, CMY-37
2a	A	Penicilinas	Sim	Maior hidrólise de benzilpenicilinas do que cefalosporinas	PCI
2b	A	Penicilinas e cefalosporinas de menor espectro	Sim	Hidrólise similar de benzilpenicilinas e cefalosporinas	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Cefalosporinas de espectro estendido e monobactâmicos	Sim	Hidrólise aumentada de oxiiimino-betalactâmicos (cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, cefepime, aztreonam)	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	A	Penicilinas	Não	Resistência a ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam	TEM-30, SHV-10
2ber	A	Cefalosporinas de espectro estendido e monobactâmicos	Não	Hidrólise aumentada de oxiiimino- β -lactâmicos combinadas com a resistência a ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam	TEM-50
2c	A	Carbenicilinas	Sim	Hidrólise aumentada de carbenicilina	PSE-1, CARB-3
2ce	A	Carbenicilinas, cefepime	Sim	Hidrólise aumentada de carbenicilina, cefepime e cefpiroma	RTG-4
2d	D	Cloxacilina	Variável	Hidrólise aumentada de cloxacilina ou oxacilina	OXA-1, OXA-10
2de	D	Cefalosporinas de espectro estendido	Variável	Hidrólise de cloxacilina ou oxacilina e oxiiimino- β -lactâmicos	OXA-11, OXA-15
2df	D	Carbapenemas	Variável	Hidrólise de cloxacilina ou oxacilina e carbapenemas	OXA-23, OXA-48
2e	A	Cefalosporinas de espectro estendido	Sim	Hidrólise de cefalosporinas, inibida por ácido clavulânico mas não por aztreonam	CepA
2f	A	Carbapenemas	Variável	Hidrólise aumentada de carbapenemas oxiiimino- β -lactâmicos, cefamicinas	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	B (B1)	Carbapenemas	Não	Hidrólise de amplo-espectro incluindo carbapenemas mas não monobactâmicos	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1
	B (B3)				L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	B (B2)	Carbapenemas	Não	Hidrólise preferencial de carbapenemas	CphA, Sfh-1

2.2.1.1 *bla*_{TEM}

A designação de TEM deriva do nome da paciente (Temoniera) a partir da qual foi obtido o primeiro isolado de *Escherichia coli* produtor destas enzimas (Atenas, 1965) (DATTA et al., 1965 *apud* GONÇALVES, 2010). A primeira betalactamase mediada por plasmídeo em Gram negativa foi descrita nos anos 60, e continuam sendo mediadas por plasmídeos e também por transposons (BRADFORD, 2001).

As enzimas do grupo TEM apresentam a capacidade de hidrolisar penicilinas e, eventualmente, cefalosporinas de primeira geração, como cefalotina e cefaloridina. Essas enzimas integram-se nos grupos 2b, 2be, e 2br da classificação de Bush-Jacoby-Medeiros, dependendo do tipo de substrato que hidrolisam produzem: penicilinases, betalactamases de amplo espectro (ESBL) ou de betalactamases resistentes a inibidores (*Inhibitor Resistant TEM* ou IRT), respectivamente (DIAS, 2009). O grupo das ESBLs foi o grupo de betalactamases que teve maior número de novas enzimas descritas nos últimos anos e bactérias produtoras de betalactamases de espectro estendido já amplamente estudado em microbiologia clínica e emergentes em âmbito veterinário, podem ser recuperados a partir de leite de vaca, carnes bovina, suína e de frango, e fezes de animais (LI et al., 2007; LOCATELLI et al., 2009; BUSH & JACOBY, 2010; GESER et al., 2012; SILVA & LINCOPAN, 2012; DAHMEN et al., 2013).

Hoje em dia, existem 205 enzimas da família TEM: algumas destas enzimas conferem fenótipos de resistência aos inibidores, no entanto, a maioria são ESBL (<http://www.lahey.org/Studies>).

As propriedades catalíticas das enzimas TEM variam de acordo com as substituições aminoacídicas que afetam diretamente o sítio ativo e, portanto, resultam das alterações nucleotídicas que ocorrem em posições específicas do gene *bla*_{TEM} que as codifica. Algumas destas alterações aminoacídicas resultam em variações no perfil de hidrólise, aumentando sua capacidade para hidrolisar cefalosporinas de terceira geração (BRADFORD, 2001). O aumento do espaço físico do sítio ativo conseguido através das substituições aminoacídicas produz comumente um aumento da suscetibilidade ao ácido clavulânico. Estas substituições podem dar origem às enzimas ESBL, pois produzem uma alteração do sítio ativo, aos quais as cefalosporinas de terceira geração se adaptam estruturalmente. Assim, a coexistência do fenótipo ESBL e resistência aos inibidores, no que respeita a estas posições, parece ser incompatível (KNOX, 1995; BRADFORD, 2001).

Embora as betalactamases tipo TEM sejam mais frequentemente encontradas em *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* podem também ser detectadas em outras bactérias Gram negativas. No caso específico das ESBL do tipo TEM, estas tem vindo a ser detectadas em *Enterobacter* spp., *Morganella morganii*, *Proteus* spp., *Salmonella* spp. e *Pseudomonas aeruginosa* (JACOBY & MUNOZ-PRICE, 2005).

2.2.1.2 *bla*_{SHV}

O nome SHV está relacionado com as propriedades bioquímicas destas enzimas (SulpHyderyl Variable). Estas enzimas estão inseridas nos grupos 2b, 2be e 2br da classificação Bush-Jacoby-Medeiros, de acordo com os antimicrobianos β-lactâmicos que hidrolisam. Sendo as alterações que ocorrem perto ou no sítio ativo destas enzimas que mais influenciam o tipo de substratos que hidrolisam ou ainda podendo acarretar resistência aos inibidores de betalactamases (*Inhibitor Resistant SHV* ou IRS) (GONÇALVES, 2010; DIAS, 2009; MENDONÇA et al., 2008). Este gene, junto ao *bla*_{TEM}, é o mais disseminado.

A maioria das enzimas tipo SHV são ESBLs, sendo sobretudo produzidas por isolados de *Klebsiella pneumoniae*. A betalactamase SHV-1 é ubiqüitária e cromossômica em *K. pneumoniae* e confere resistência à ampicilina, amoxicilina, carbenicilina e ticarcilina (BUSH et al., 1995; LIVERMORE, 1995). Segundo Bradford (2001), SHV-1 é encontrada em 90% dos isolados clínicos de *K. pneumoniae*. Em *E. coli*, por sua vez, a enzima surge frequentemente codificada por genes plasmidiais.

A primeira descoberta de uma ESBL do tipo SHV (SHV-2) ocorreu em 1983, na Alemanha, numa cepa de *Klebsiella ozaenae* (GONÇALVES, 2010). Devido às substituições aminoacídicas (isoladas ou em associação) que conferem resistência às cefalosporinas de terceira geração, são descritas cerca de 60 ESBLs da família SHV (DIAS, 2009).

As SHV-ESBL são particularmente importantes na disseminação de resistências em isolados clínicos na Europa e América, sendo SHV-5 e SHV-12 das mais comuns deste grupo (JACOBY & MUNOZ-PRICE, 2005). Atualmente existem descritas 173 betalactamases do tipo SHV, relacionadas entre si pelo acúmulo de uma ou mais mutações (<http://www.lahey.org/Studies>).

2.2.1.3 *bla*_{CTX-M}

As enzimas CTX-M (cefotaximases) constituem o grupo de ESBL de emergência mais recente, elas hidrolisam preferencialmente a cefotaxima, daí a origem de seu nome (DIAS, 2009; GONÇALVES, 2010).

Essas começaram a ser identificadas no final dos anos 80, como resposta ao extenso uso das oximiinocefalosporinas, que são inerentemente mais resistentes à ação das betalactamases, para o tratamento de infecções por bacilos Gram negativos produtores de betalactamases dos grupos A, C e D (BOU et al., 2002). A primeira CTX-M foi isolada na Alemanha em 1989, tendo sido identificada em um isolado clínico de *Escherichia coli* e denominada CTX-M-1 (BAUERNFEIND et al., 1989; PITOUT et al., 2004). Posteriormente, a mesma enzima foi isolada na França (BARTHÉLÉMY et al., 1992; BAUERNFEIND et al., 1996). Na década de 90, foi descrita a primeira CTX-M no Brasil, e em 1992 foi descrita a CTX-M-2, isolada de cepas de *Salmonella* resistentes a cefotaxima durante uma epidemia na Argentina (BAUERNFEIND et al., 1992; SILVA & LINCOPAN, 2012).

Acredita-se que as ESBLs tipo CTX-M tenham originado de uma Enterobacteriaceae amplamente disseminada na natureza, *Kluyvera* spp., e foram adquiridas por transferência horizontal por meio da conjugação (HUMENIUK et al., 2002; OLSON et al., 2005).

Atualmente, as CTX-M são as ESBL mais frequentemente encontradas em espécies da família Enterobacteriaceae (TOLENTINO, 2009). Estas enzimas são classificadas filogeneticamente em cinco grandes grupos, de acordo com as suas seqüências aminoacídicas: o grupo CTX-M-1, o grupo CTX-M-2, o grupo CTXM-8, o grupo CTX-M-9 e o grupo CTX-M-25 (PITOUT et al., 2004; DIAS, 2009).

As β -lactamases CTX-M tem sido detectadas por todo o mundo e tem sido frequentemente associadas a surtos na Europa, América do Sul e Japão (BRADFORD, 2001).

O cenário epidemiológico das betalactamases CTX-M compreende o aparecimento de novas enzimas, a existência de múltiplos clones associados a surtos e a introdução frequente de vários elementos genéticos envolvidos na disseminação de *bla*_{CTX-M}. A disseminação destas enzimas tem ocorrido a uma tal escala que não poderia ser apenas consequência de pressão seletiva devida ao uso de cefalosporinas de terceira geração. De fato, a evolução deste grupo de enzimas foi influenciada, a nível molecular, por eventos de recombinação de *bla*_{CTX-M} com seqüências de inserção, transposons e pela transferência destes genes através de outros elementos genéticos móveis (BONNET, 2004; CANTÓN & COQUE, 2006).

2.2.1.4 *bla*_{ampC}

As enzimas do tipo AmpC tem atividade sobre oxiiinocefalosporinas, assim como sobre penicilinas e monobactâmicos. Algumas dessas enzimas são fracas hidrolisadoras de imipenem quando expressas em grandes quantidades, além de serem fracamente inibidas por ácido clavulânico (BUSH et al., 1995; POIREL et al., 2008; KAOA et al., 2010).

Esta classe de betalactamases, produzidas exclusivamente por bactérias Gram negativas, pertencem ao grupo funcional 1 da classificação de Bush e no grupo C pela classificação de Ambler (AGUILAR, 2009).

As betalactamases de tipo AmpC foram relatadas como enzimas de origem cromossômica constitutivas para diversas espécies pertencentes à família Enterobacteriaceae, incluindo *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Serratia marcescens*, *Hafnia alvei* (DIAS, 2009).

Em *Escherichia coli*, a produção constitui uma expressão não induzível e constitutiva, não sendo habitualmente suficiente para ter consequências fenotípicas nas estirpes que as produzem (PEREZ-PEREZ & HANSON, 2002). Podem ainda surgir mutantes resistentes que hiperexpressam constitutivamente esta enzima devido a mutações no gene repressor do gene *bla*_{ampC} (DIAS, 2009).

Nos últimos anos, a produção de enzimas de tipo AmpC tem contribuído com o alto índice de resistência aos β-lactâmicos em espécies que apresentam altos níveis de expressão constitutiva, devida a uma derepressão dos genes cromossômicos ou pela aquisição de AmpC mediadas por plasmídios (PÉREZ-PÉREZ & HANSON, 2002; YAGI et al., 2005).

Nas enterobactérias a produção de betalactamases cromossômicas é codificada por um gene estrutural denominado *bla*_{ampC} (THOMSON, 2001). Em *Citrobacter* spp, *Enterobacter* spp, *Serratia* spp, *Providencia* spp, *Proteus* spp. e *M. morganii* a expressão da enzima AmpC é induzível por agentes β-lactâmicos, como ampicilina e cefalosporinas de curto espectro. Nestes organismos, a produção da enzima é induzida pelo próprio tratamento antimicrobiano com β-lactâmicos podendo ocasionar falência terapêutica, mesmo que a bactéria tenha sido originalmente considerada sensível ao antimicrobiano no teste de sensibilidade laboratorial *in vitro* (OLIVEIRA, 2008).

Apesar da produção de AmpC aumentar significativamente na presença de um indutor, a retirada deste pode fazer com que a produção destas enzimas volte a seus níveis basais. No entanto, a hiperprodução permanente pode ocorrer e, normalmente, se deve a uma mutação no gene *bla*_{ampC}, e isto é cada vez mais frequente em isolados clínicos (THOMSON, 2001). No caso de mutação, os isolados são resistentes a todas as penicilinas e cefalosporinas (exceto de quarta geração) independentemente de um agente indutor (OLIVEIRA, 2008)

As AmpC plasmidiais (AmpCp) surgiram a partir de diversas AmpC cromossômicas. A primeira AmpCp descrita foi a enzima MIR-1, originada da betalactamase AmpC de *Enterobacter cloacae*. Desde esse primeiro relato, a descrição de AmpC plasmidial tornou-se mais prevalente (BRADFORD et al., 1997). A classificação das enzimas AmpC plasmidiais está baseada na codificação de origem cromossômica, diferenciando-se seis grupos com similaridade genética: ACC (originado de *H. alvei*), FOX (origem desconhecida), MOX (origem desconhecido), DHA (originada de *M. morganii*), CIT (originada de *C. freundii*) e EBC (originada de *E. cloacae*) (PÉREZ-PÉREZ & HANSON, 2002).

Na América do Sul, o primeiro relato de uma enzima AmpC plasmidial ocorreu no ano 1994, na Argentina, isolada de uma amostra de *Klebsiella pneumoniae* produtora de FOX-1. Anos depois, foi relatada a enzima CMY-2 na Argentina e, mais recentemente, identificada em *Escherichia coli* isolada em São Paulo, Brasil (GONZALEZ et al., 1994; RAPOPORT et al., 2008; PAVEZ et al., 2009).

No CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) não há padronização de testes para detectar isolados produtores de AmpC. Os testes fenotípicos para detecção de AmpC não são bem definidos, mas normalmente são baseados na sensibilidade às cefamicinas (cefotaxima) e resistência a todos os inibidores de betalactamases (THOMSON, 2001; SHAHID et al., 2004).

A distinção entre uma β -lactamase AmpC cromossômica endógena e uma AmpC codificada por um gene plasmídico nem sempre é fácil, mas é de extremo interesse em termos de vigilância epidemiológica, pois tem consequências importantes devido a fácil disseminação destes plasmídeos (PÉREZ-PÉREZ & HANSON, 2002).

2.2.1.5 Carbapenemases

A ocorrência de estirpes produtoras de carbapenemases tem vindo a aumentar ao longo dos anos. Este grupo fenotípico é constituído por uma combinação heterogênea de betalactamases de classe A (penicilinas), classe B (metaloenzimas) e classe D (oxacilinas) e partilham a capacidade de hidrolisar uma classe específica de antimicrobianos β -lactâmicos, os carbapenemas (DIAS, 2009).

A resistência aos antimicrobianos carbapenêmicos tem surgido lentamente em membros da família Enterobacteriaceae, porém esse perfil de sensibilidade está mudando devido ao desenvolvimento de sofisticados mecanismos de resistência contra os antimicrobianos β -lactâmicos (AGUILAR, 2009).

A resistência aos antimicrobianos carbapenêmicos por perda ou diminuição de expressão da porina tem sido relatada em diversas regiões do mundo e em diferentes espécies dessa família, principalmente em *K. pneumoniae*, *Enterobacter* spp. e *Escherichia coli*. A seleção *in vivo* de mutantes deficientes de porinas são originadas de espécies produtoras de AmpC ou ESBL que foram expostas a terapias prévias com antimicrobianos carbapenêmicos (BRADFORD et al., 1997; CROWLEY et al., 2002; POIREL et al., 2004; ELLIOTT et al., 2006; KACZMAREK et al., 2006; PALASUBRAMANIAM et al., 2007; PAVEZ et al., 2008).

Além desses mecanismos de resistência, há produção de enzimas que hidrolisam os carbapenemas. Dentre essas enzimas estão: as IMP - ativas frente ao Imipenem, que surgiram na Ásia e são mediadas por plasmídeos; as VIM (*Verona Integron-encoded β -lactamase*), por sua vez, foram descritas pela primeira vez na década de 90, encontram-se disseminadas na Europa, América do Sul e, em particular, na Ásia; a família GES/IBC (*Guiana Extended Spectrum e Integron-Borne β -lactamase*) descrita pela primeira vez após 2000, na França e na Grécia, respectivamente. Os genes que codificam GES são, frequentemente, encontrados em integrons e plasmídeos. A enzima KPC só foi descrita pela primeira vez em 2001, atualmente já foi documentada em diferentes bactérias por meio de estudos moleculares e diferenciada em KPC-1, 2, 3 e 4. Uma vez que estas enzimas possuem um espectro de atividade que inclui penicilinas e cefalosporinas de terceira geração foram inicialmente classificadas como ESBL (NORDMANN & POIREL, 2002; JACOBY & MUNOZ-PRICE, 2005; LEE & JEONG, 2005; HIRSCH & TAM, 2010; DIENSTMANN et al., 2010).

A mais recente enzima com esse potencial foi descoberta em 2008, denominada de New Delhi Metalobetalactamase (NDM) devido à sua origem geográfica. A NDM foi detectada em vários países da Ásia, Europa e América do Norte, particularmente em *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (ANVISA, 2011). No ano de 2012 já havia relatos de bactérias produtoras dessa enzima em alguns países da América do Sul, e em 2013 foi identificado em *Providencia rettgeri* e *Enterobacter cloacae*, no Rio Grande do Sul. O Teste de Hodge Modificado tem baixa sensibilidade na detecção desta nova metalobetalactamase

(ANVISA, 2013). O gene é carregado por plasmídeo sendo facilmente disseminado pelo mundo, sendo encontrado juntamente com outros tipos de betalactamases como ESBL e AmpC. Existe uma variante dessa enzima, a NDM-2, encontrada em *Acinetobacter baumannii* (LASCOLS et al., 2011).

Considerando que os carbapenemes são praticamente os únicos antimicrobianos possíveis de utilizar no controle de algumas infecções causadas por bactérias Gram negativas, o aparecimento de tais enzimas é, de fato, preocupante (LIVERMORE & WOODFORD, 2006). Embora apresentem um perfil de hidrólise variável entre os diferentes grupos, pode afirmar-se que as carbapenemases apresentam a capacidade teórica de hidrolisar todos os antimicrobianos β -lactâmicos disponíveis na prática clínica (DIAS, 2009).

2.2.2 Resistência às quinolonas

A resistência a quinolonas é geralmente causada por mutações cromossômicas, mas uma resistência mediada por plasmídeo foi descoberta por Martinez-Martinez e colaboradores em 1994 (MARTINEZ-MARTINEZ et al., 1998 *apud* MINARINI, 2008; WANG et al., 2004). Desde então, a investigação e a caracterização de determinantes plasmidiais responsáveis por este fenótipo tem sido exaustivamente reportadas (MINARINI, 2008).

A primeira quinolona utilizada foi o ácido nalidíxico, introduzida em 1962. Em meados dos anos 80, as ciprofloxacina e fluoroquinolona foram descobertas (STRAHILEVITZ et al., 2009). Essas moléculas surgiram a partir da purificação da cloroquina (agente usado contra a malária), percebeu-se que essas tinham atividade contra bactérias Gram negativas (MINARINI, 2008).

Uma vez introduzidas, as quinolonas influenciaram a seleção de bactérias resistentes (WANG et al., 2004). Com isso, iniciou-se a busca por quinolonas de maior espectro de atividade e também a busca pelo aumento da utilidade terapêutica, como por exemplo, a floração que resultou em maior solubilidade desses fármacos em soluções oftálmicas (MINARINI, 2008). Existem mais de 20 quinolonas descritas, dentre elas: ciprofloxacino, enroxacino, gatifloxacino, levofloxacina, lomefloxacino, moxifloxacino, norfloxacino, ofloxacino, trovafloxacino (GAMA, 2008).

Os principais mecanismos de resistência a esta classe dividem-se em três categorias: alterações na DNA-girase e topoisomerase IV- considerados sítios ativos de quinolonas; diminuição do acúmulo de antimicrobiano no interior da célula bacteriana por impermeabilidade de membrana e por hiperexpressão de sistemas de bomba de efluxo.

Elementos móveis têm sido descritos carregando o gene *qnr*, o qual confere baixo nível de resistência às quinolonas e são transferíveis horizontalmente (RUIZ; HAWKEY, 2003; JACOBY et al., 2003; SANTOS, 2006; MINARINI, 2008). O gene *qnr* possui variantes e, a enzima codificada por ele protege a DNA girase e a topoisomerase IV da inibição por quinolonas, conferindo resistência às quinolonas e aumento dos níveis de resistência às fluoroquinolonas (RUIZ, 2003). Além disso, o gene *qnr* é bastante detectado em plasmídeos que contém genes que codificam resistência a β -lactâmicos como o *bla*_{CTX-M} e *bla*_{ampC} (JACOBY et al., 2003; WANG et al., 2004; SANTOS, 2006; STRAHILEVITZ et al., 2009; NOGUEIRA, 2011).

As taxas de resistência variam de um país para outro e dependem de fatores epidemiológicos locais, sendo maiores em países em desenvolvimento devido ao uso de quinolonas menos ativas ou do uso da ciprofloxacina em dosagens baixas que podem selecionar mutantes. Outros fatores que levam a seleção de mutantes são a automedicação, falhas na posologia, interrupção do tratamento e negligências na identificação laboratorial das

amostras e seu perfil de suscetibilidade aos diversos antimicrobianos (PATERSON, 2006; SANTOS, 2006; MINARINI, 2008).

2.2.3 Resistência aos aminoglicosídeos

O grupo dos aminoglicosídeos inclui a gentamicina, tobramicina, ampicilina, netilmicina, canamicina, estreptomina, dibenkacina, e a neomicina. Apesar do desenvolvimento de novos β -lactâmicos e fluoroquinolonas, os aminoglicosídeos são usados no tratamento de infecções severas causadas por microrganismos Gram negativos (GALIMAND et al., 2003).

A utilização dessa classe no tratamento de mastite é feita desde 1960, principalmente em infecções causadas por bactérias Gram negativas (NETTO et al., 2005; RAIA Jr., 2006). No Brasil, não há restrições do uso desses antimicrobianos mesmo sabendo-se dos importantes efeitos colaterais – nefrotoxicidade e ototoxicidade - (RAIA Jr., 2006).

Esses antimicrobianos exercem seu efeito por interferirem na síntese de proteínas através da ligação irreversível à porção 16S rRNA da subunidade ribossomal 30S (TENSON & MANKIN, 2006). A passagem dessas moléculas pela parede das bactérias é mediada pela quebra das pontes entre os lipopolissacarídeos, já que elas não passam pelas porinas devido ao seu tamanho (MINGEOT-LECLERCQ et al., 1999).

Existem três mecanismos de resistência aos aminoglicosídeos: alteração de permeabilidade da membrana externa, diminuição do transporte para o interior da célula ou efluxo do antimicrobiano, diminuindo a concentração do mesmo dentro da célula bacteriana; modificação do sítio de ação por mutação nas proteínas ribossômicas ou na porção 16S rRNA; e modificação enzimática do antimicrobiano (GALIMAND et al., 2003).

O principal mecanismo de resistência aos aminoglicosídeos da família Enterobacteriaceae é a produção de enzimas de inativação desses compostos. Estas enzimas são atribuídas a três grupos: acetiltransferases (acetilação de um grupo amino / AAC), fosfotransferases (fosforilação de um grupo / APH hidroxilo) e adenililtransferases (adenilação de um grupo hidroxil / AAD ou ANT) (WASSEF et al., 2010; BAPTISTA, 2013). Dentro de cada classe, existem enzimas que atuam em diferentes regiões do antimicrobiano: há quatro nucleotidiltransferases, sete fosfotransferases e quatro acetiltransferases. Existe também uma enzima bifuncional (AAC, APH), que pode acetilar e fosforilar os seus substratos sequencialmente (KOTRA et al., 2000). Além disso, a modificação das enzimas pela seleção causa resistência à maioria dos aminoglicosídeos (HO et al., 2010).

Essas enzimas são frequentemente codificadas por genes contidos em plasmídeos mas também podem estar associados com elementos transferíveis, podendo carrear também genes de resistência a outras classes, inclusive aos β -lactâmicos de amplo espectro (WASSEF et al., 2010; GALIMAND et al., 2003).

2.2.4 Resistência ao sulfametoxazol+trimetoprim

O cotrimoxazol é uma associação de trimetoprim e sulfametoxazol. As sulfamidas foram os primeiros antimicrobianos eficazes empregados no tratamento das infecções no homem, descoberto na década de 1930. O trimetoprim vem sendo usado em combinação com sulfamidas desde 1968 quando se observou sinergismo desses dois compostos *in vitro* (HUOVINEN et al., 1995; VICENTE & PÉREZ-TRALLERO, 2010).

As sulfonamidas são análogos do ácido p-aminobenzóico e inibem competitivamente essa enzima, inibindo a produção de ácido dihidropteróico. E o trimetoprim atua interferindo

na ação da dihidrofolato redutase bacteriana, inibindo a síntese de ácido tetrahidrofólico. Com a associação, há o bloqueio sequencial das duas enzimas da biossíntese do ácido fólico dos microrganismos (HOFF, 2008).

A resistência a esta associação surge por aumento nos níveis de dihidrofolato redutase; produção de enzima alterada e diminuição da permeabilidade bacteriana ao trimetoprim (HOFF, 2008). Existem pelo menos 27 classes de plasmídeos que produzem 6 tipos de enzimas diferentes que conferem resistência a trimetoprim. A presença de vários genes em um mesmo elemento móvel favorece a seleção de microrganismos multirresistentes, como se tem observado em tratamentos prolongados com sulfametoxazol-trimetoprim (VICENTE & PÉREZ-TRALLERO, 2010).

A resistência a trimetoprim em enterobactérias carregadas por fezes tem demonstrado altos níveis em países desenvolvidos, inclusive em *E. coli* enterotoxigênica e *Shigella* spp (HUOVINEN et al., 1995).

2.3 Resistência aos Antimicrobianos na Mastite Bovina

O tratamento por meio do uso de antimicrobianos normalmente instituídos em casos de doenças infecciosas também é utilizado no tratamento das mastites, esse deve ser feito preferencialmente após secagem da vaca e uso de antimicrobianos intramamários (PERSSON et al., 2011).

Vários antimicrobianos são utilizados no tratamento da mastite bovina e também são muitas as formulações e classes disponíveis no mercado, porém a seleção depende do agente etiológico, do período de tratamento e a gravidade da infecção.

O uso indiscriminado pode ocasionar a resistência bacteriana além de dificultar o tratamento de infecções em animais trazendo graves consequências para a saúde animal (VIEIRA, 2010). A queda na resistência antimicrobiana é demonstrada em países onde o uso de antimicrobianos só é realizado com prescrição médica (PERSSON et al., 2011). O controle ineficaz da mastite também pode ocasionar problemas de saúde pública uma vez que patógenos de origem animal podem também ser transmitidos aos seres humanos através de produtos lácteos ou através do ambiente (SRINIVASAN et al., 2007; GESER et al., 2012).

Zafalon et al. (2008) descreve uma alta resistência aos antimicrobianos em isolados provenientes de leite de vacas com mastite, em especial aos β -lactâmicos. Nader Filho et al. (2007) encontrou um alto número de *Staphylococcus aureus* resistentes a mais de um princípio ativo, o que constitui em um motivo de preocupação pela dificuldade de tratamento dessas infecções.

Amostras de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) são reconhecidamente um dos principais problemas de infecção hospitalar, também com relatos de infecções em animais. Por todo o mundo, o aumento da prevalência de *S. aureus* multirresistentes causadores de mastite bovina é grave, com a redução da efetividade dos antimicrobianos e o aumento da morbidade e dos custos para combater essa doença (DIAS, 2010).

Em animais, o isolamento de MRSA foi primeiramente reportado por Devriese et al. (1972) a partir de leite de vacas mastíticas (SILVA, 2008). Os isolados de *S. aureus* resistentes à vancomicina são descritos em humanos e apesar da sua incidência ser pouco descrita em animais, Pribul (2011) obteve 23% de *Staphylococcus* spp. isolados de leite proveniente de vacas mastíticas resistentes a este glicopeptídeo.

Os dados para outros patógenos como *Streptococcus* spp. e bactérias Gram negativas (*E.coli* e *Klebsiella* spp.) são muito variáveis entre os estudos (HOE, 2004).

A escolha do medicamento a ser utilizado para o tratamento da mastite bovina deve ser feita após o conhecimento do perfil de sensibilidade dos microrganismos frente aos

antimicrobianos, a fim de auxiliar a tomada de decisões e minimizar riscos da seleção de transmissão dos mecanismos bacterianos da resistência (SRINIVASAN et al., 2007; ZAFALON et al. 2008).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral:

Avaliar fenogenotipicamente a resistência antimicrobiana, em especial a produção de betalactamases, em enterobactérias isoladas a partir de quadro de mastite bovina.

3.2. Objetivos Específicos:

- Avaliar o perfil fenotípico das enterobactérias associadas à etiologia da mastite bovina frente às quinolonas, aminoglicosídeos e sulfametoxazol+trimetoprim;
- Pesquisar os genes relacionados à resistência aos aminoglicosídeos e quinolonas, *aacC2*, *qnr*, respectivamente;
- Analisar de forma interpretativa o perfil fenotípico de resistência aos β -lactâmicos na busca pela produção de betalactamases;
- Pesquisar a produção de betalactamases e classificá-las em distintos grupos por meio de testes fenotípicos;
- Pesquisar os genes que conferem produção de betalactamases: *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{ampC}.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostragem

Foram visitadas 9 propriedades na mesorregião do Rio de Janeiro e o teste para identificação de mastite (CMT – Califórnia Mastitis Test) foi realizado nos quartos mamários de todas as vacas em lactação considerando possíveis perdas de animais durante a execução do experimento (SAMPAIO, 1998). O total de 20% das vacas que apresentaram resultado positivo para o teste do CMT foi selecionado para o presente estudo e em cada vaca foi coletada uma amostra de leite por teto, totalizando 381 amostras. As coletas do leite foram realizadas no período matutino, por meio de ordenha manual e individual segundo Fonseca e Santos (2000). As amostras foram obtidas imediatamente antes da ordenha, após antissepsia das tetas com álcool a 70%. Os jatos de leite foram colhidos diretamente em frascos estéreis, colocados em caixas isotérmicas com gelo e encaminhadas imediatamente ao Laboratório de Bacteriologia Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro para a incubação por 6hs a 37°C e posterior realização dos testes de identificação microbiológica.

4.2 Identificação das Enterobactérias

As amostras foram submetidas à rotina de identificação que consistiu no isolamento primário em ágar Sangue (ágar base HiMedia[®] com 5% sangue de carneiro desfibrinado), as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. As colônias com coloração de cinza a marrom, diâmetro entre 3 e 5mm, não hemolíticas, são sugestivas de enterobactérias sendo realizado então a coloração de Gram. Após confirmação de bastonetes Gram negativos, estes isolados foram repicados em ágar MacConkey (HiMedia[®]), no qual as colônias fermentadoras de lactose tornam o meio rosa e aquelas não fermentadoras ficam incolores (KONEMAN et al., 2008; HOGAN & SMITH, 2003).

Após a identificação presuntiva das colônias, as mesmas foram submetidas à coloração de Gram, para confirmação de suas características morfotintórias. Além disso, foram realizados o teste da catalase e do KOH a 3%, onde a formação de gel viscoso indicou resultado positivo. Posteriormente, realizou-se testes bioquímicos, para a diferenciação das espécies da família Enterobacteriaceae (KONEMAN et al., 2008).

4.2.1 Diagnóstico presuntivo através do meio de triagem Kligler Iron Agar

O ágar Kligler Iron (HiMedia[®]) foi utilizado para detectar a capacidade da bactéria fermentar a glicose e/ou a lactose. Este meio contém glicose em pequena concentração (0,1%), lactose em concentração superior (1%), o indicador de pH vermelho de fenol para detectar a produção de ácidos resultantes da fermentação dos hidratos de carbono, tiosulfato de sódio, substrato para a produção de H₂S, e sulfato de ferro para a detecção desse produto final. O meio foi inoculado por picada no cilindro e por estria na parte inclinada (rampa). É essencial que as culturas sejam observadas após 18 a 24 h de incubação para evitar que os hidratos de carbono sejam completamente utilizados e que ocorra degradação das peptonas, formando produtos finais alcalinos. A leitura da fermentação de lactose foi realizada pela mudança de cor da rampa, no fundo do cilindro a da glicose e no meio do cilindro a de H₂S. Após incubação puderam ser determinadas as atividades fermentativas, a produção de gás e a produção de H₂S (Quadro 2).

Quadro 2 . Reações no meio de triagem Kligler Iron Agar (FIOCRUZ, 2006).

Leitura	Interpretação	Diagnóstico presuntivo
Reação ácida (amarelo) e gás na profundidade. Reação ácida na superfície. Ausência de H ₂ S.	Fermentação da glicose e fermentação da lactose, inclusive com produção de gás.	<i>Escherichia, Klebsiella, Enterobacter, Providencia, Serratia</i>
Reação ácida e gás na profundidade. Superfície alcalina (vermelha). Presença de H ₂ S.	Fermentação da glicose sem ataque á lactose.	<i>Salmonella, Edwardsiella, Citrobacter, Proteus</i>
Reação ácida sem gás na profundidade, superfície alcalina. Ausência de H ₂ S.	Glicose fermentada apenas formando ácido; nenhuma ação sobre a lactose.	<i>Shigella, Salmonella, Proteus, Providencia, Serratia, Yersinia</i>
Meio inteiramente ácido com gás. Presença de H ₂ S.	Fermentação da glicose com gás; fermentação da lactose.	<i>Citrobacter, Proteus</i>
Meio inteiramente ácido sem gás. Ausência de H ₂ S.	Fermentação da glicose com formação de ácido; fermentação da lactose.	<i>Escherichia coli, Serratia</i>

4.2.2 Avaliação do perfil bioquímico

Após o diagnóstico presuntivo, foram feitos outros testes bioquímicos para determinar-se as espécies de enterobactérias isoladas segundo a metodologia realizada por Koneman et al.(2008) e a leitura foi feita a partir do quadro 3.

Para a realização das provas de descarboxilação de lisina e ornitina e dehidrolisação de arginina, foi utilizada uma base contendo peptona, extrato de levedura, dextrose e púrpura de bromocresol, com a qual foram preparadas as soluções de lisina, arginina e ornitina (Micromed[®]). As soluções foram distribuídas em tubos aos quais foi adicionada uma fina camada de óleo mineral, previamente esterilizado, à superfície do líquido, a fim de promover ambiente microaerófilo. Como controle, utilizou-se a solução base pura também acrescida de óleo mineral previamente esterilizado. Após a inoculação dos isolados e incubação à 37°C por até 7 dias, a leitura destas provas é interpretada como negativa quando a coloração do meio apresenta-se amarela indicando acidez em ocasião da fermentação da glicose. Na reação positiva, ocorre fermentação do meio para ativação das enzimas de descarboxilação e posteriormente o meio vira para coloração violeta, indicando alcalinidade do meio em função da descarboxilação ou dehidrolisação dos aminoácidos. A base usada como controle sempre apresentou resultado negativo.

As provas de Voges-Proskauer (VP) e Vermelho de Metila (VM) foram realizadas através da utilização do caldo MR-VP (VETEC[®]) que apresenta na sua composição glicose, peptona, água e fosfato. A utilização da glicose, apresentando a produção de acetilmetilcarbinol (acetoína), é indicada pela coloração rosa na prova do VP após a adição de

0,2 mL de α -naftol a 5% e 0,6 mL de KOH (40%) no caldo contendo o inóculo incubado por 24 a 48 horas à 35°C. A prova do VM é utilizada para a detecção de ácidos mistos. É detectado através da viragem da coloração do caldo para vermelho após a adição do reativo vermelho de metila.

A produção de indol e avaliação da motilidade foram realizadas em meio ágar Sulfeto Indol Motilidade (SIM - VETEC[®]). A produção de indol está baseada na formação de um complexo de cor vermelha quando o indol, produzido pela bactéria, reage com o grupo aldeído do p-dimetilaminobenzaldeído (reativos de Kovacs). A motilidade é considerada positiva quando ocorre difusão do microrganismo na zona de inoculação. A leitura é feita após 24h de incubação à 35°C.

A capacidade de hidrolisar gelatina através da enzima gelatinase foi testada inoculando uma partícula da colônia em meio contendo 1% de gelatina e incubando-o em estufa bacteriológica à 35°C por 24 a 48h. Em seguida, os tubos foram levados à geladeira por 15 minutos para realização da leitura, nos tubos onde a gelatina permaneceu liquefeita mesmo após o resfriamento, foram considerados positivos.

A capacidade do microrganismo utilizar o citrato como única fonte de carbono foi avaliada através da inoculação dos isolados em ágar citrato Simmons (VETEC[®]). Após incubação por 24h à 35°C, foi observada a coloração dos tubos, onde a alteração de verde para azul, indicava alcalinização do meio após a utilização do citrato.

A capacidade do microrganismo utilizar o malonato como única fonte de carbono foi avaliado através da inoculação dos isolados em caldo malonato (MERCK[®]). Após incubação por 24h à 35°C, foi observada a coloração dos tubos, onde a alteração de verde para azul, indicando alcalinização do meio após a utilização do malonato.

Quadro 3. Diferenciação de Enterobacteriaceae por testes bioquímicos, segundo Koneman et al. (2008).

	<i>Escherichia coli</i>	<i>Shigella sonnei</i>	<i>Shigella</i> <i>outras</i>	<i>Edwardsiella tarda</i>	<i>Salmonella sp</i>	<i>Salmonella typhi</i>	Arizona	Citrobacter			Klebsiella		Enterobacter					Hafnia alvei	Serratia			Proteus		<i>Morganella morganii</i>	Providencia			Yersinia		
								<i>freundii</i>	<i>diversus</i>	<i>amalonaticus</i>	<i>pneumoniae</i>	<i>oxytoca</i>	<i>cloacae</i>	<i>aerogenes</i>	<i>agglomerans</i>	<i>sakasakii</i>	<i>gergoviae</i>		<i>marcescens</i>	<i>liquefaciens</i>	<i>rubidae</i>	<i>vulgaris</i>	<i>mirabilis</i>		<i>rettgeri</i>	<i>alcalifaciens</i>	<i>stuartii</i>	<i>enterocolitica</i>	<i>pseudotuberculosis</i>	<i>pestis</i>
Indol	+	-	V	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	V	V	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	V	-	-	
Vermelho de Metila	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	V	V	-	-	V	V	V	V	V	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Voges-Proskauer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	V	+	+	V	+	V	+	-	V	-	-	-	-	V	-	-
Simmons Citrato	-	-	-	-	V	-	+	+	+	+	+	+	+	+	V	+	+	V	+	+	V	V	V	-	+	+	+	-	-	-
H ₂ S (TSI)	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Motilidade	V	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	V	+	+	+	+	+	V	+	+	V	+	+	V	1	1	2
Gelatina (22°C)	-	-	-	-	-	-	+	-	-	V	-	-	V	V	V	-	-	-	V	+	V	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Lisina Descarboxilase	V	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	V	+	+	V	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arginina Dihidrolase	V	-	V	-	V	-	V	V	V	+	-	-	+	-	-	+	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Onitina Descarboxilase	V	+	-	+	+	-	+	V	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-
Malonato	-	-	-	-	-	-	+	V	+	-	+	+	V	V	V	V	+	V	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gás de D-Glucose	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	V	+	+	+	V	V	V	V	+	V	V	V	-	-	-	-
Lactose	+	-	-	-	-	-	V	V	V	V	+	+	V	+	V	+	V	V	-	V	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sucrose	V	-	-	-	-	-	-	V	V	V	+	+	+	+	V	+	+	V	+	+	+	+	V	-	V	V	V	+	-	-

(1) -37°C +22°C; (2) -37°C -22°C; (V) variável

4.3 Detecção Fenotípica de Resistência aos Antimicrobianos

4.3.1 Avaliação da suscetibilidade antimicrobiana através do método de difusão em disco em ágar (CLSI, 2008; 2012)

4.3.1.1 Seleção dos discos

O teste de difusão em disco foi efetuado segundo a metodologia recomendada pelos Clinical and Laboratory Standards Institute veterinário e humano (CLSI, 2008 e 2012), utilizando-se os antimicrobianos das classes aminoglicosídeo, cefalosporinas, monobactâmicos, penicilinas, penicilina associada com inibidores (ácido clavulânico), quinolona, sulfonamida - (Sensidisc DME®) descritos na tabela abaixo (quadro 4). Um isolado foi considerado multirresistente quando houve resistência igual ou maior a duas classes de antimicrobiano.

Quadro 4. Zonas de inibição avaliadas pelo diâmetro dos antimicrobianos utilizados, segundo o CLSI (2008; 2012).

Antimicrobianos			Zonas de inibição (mm)		
Nome	Classificação	µg	Resistente	Intermediário	Sensível
Amoxicilina+AC (AMC)	Aminopenicilina+AC*	30	≤13	14-17	≥18
Amoxicilina (AMO)	Aminopenicilina	10	≤13	14-16	≥17
Ampicilina (AMP)	Aminopenicilina	20	≤13	14-16	≥17
Aztreonam** (ATM)	Oxiimino-monobactâmico	30	≤17	18-20	≥21
Cefalotina** (CFL)	Oxiimino-cefalosporina	30	≤14	15-17	≥18
Cefepime (CPM)	Oxiimino-cefalosporina	30	≤20	21-23	≥24
Cefoxitina (CFO)	Cefamicina	30	≤14	15-17	≥18
Ceftazidima (CAZ)	Oxiimino-cefalosporina	30	≤17	18-20	≥21
Ceftriaxona (CRO)	Oxiimino-cefalosporina	30	≤13	14-20	≥21
Ciprofloxacina (CIP)	Quinolona	5	≤15	16-20	≥21
Gentamicina (GEN)	Aminoglicosídeo	10	≤12	13-15	≥16
Imipenem (IPM)	Carbapenema	10	≤13	14-15	≥16
Neomicina (NEO)	Aminoglicosídeo	30	≤12	13-16	≥17
Norfloxacina (NOR)	Quinolona	10	≤12	13-16	≥17
Oxacilina** (OXA)	Penicilina	1	≤17	-	≥18
Penicilina (PEN)	Benzilpenicilina	10UI	≤28	-	≥29
Sulfametoxazol-trimetoprim (SUT)	Sulfa combinada	25	≤10	11-15	≥16

*AC – ácido clavulânico **Foi utilizado para a realização de testes complementares em alguns isolados. A avaliação da suscetibilidade à oxacilina para os suspeitos de pertencerem ao grupo 2d ou 2br, aztreonam para os suspeitos do grupo 2ber e cefalotina para separação dos grupos 2b e 2e.

4.3.1.2 Preparo do inóculo

Após 18 a 24 horas de incubação a 35°C, as colônias foram inoculadas em Caldo Müller-Hinton (MH) (HiMedia®) e incubadas à 35°C até se obter uma turvação equivalente à variação de 0,08 a 0,13 para leitura de absorbância no comprimento de onda 625nm, em espectrofotômetro (QUIMIS Q798DP). Esta leitura equivale à escala de 0,5 de MacFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC).

4.3.1.3 Execução da técnica

Os inóculos, após ajustes, foram semeados em ágar Müller-Hinton (AMH) com suabe e em seguida os discos foram dispostos na placa. As placas foram incubadas à 35°C.

4.3.1.4 Leitura e interpretação

Após 18h incubadas, foram realizadas as leituras das placas de difusão em disco. A leitura deu-se pela avaliação do halo formado em torno de cada disco de antimicrobiano sendo o valor obtido comparado ao descrito pelo CLSI. Foram utilizados os CLSI veterinário e humano, pois alguns antimicrobianos preconizados para avaliação da produção de betalactamases não são preconizados para uso veterinário. A produção e então classificação de betalactamases foi avaliada utilizando o esquema (anexo A) desenvolvido segundo considerações propostas por Bush-Jacoby (2010).

4.3.1.5 Controle de qualidade do teste

As cepas padrão, fornecidas pelo INCQS – FIOCRUZ, *E.coli* ATCC25922 e *K.pneumoniae* ATCC700603, foram utilizadas como controle para cada teste realizado (CLSI, 2008).

4.4 Confirmação da Produção de Betalactamases

4.4.1 Pesquisa de Betalactamases de Amplo Espectro (ESBL-2be) e AmpC

Os isolados que se apresentaram resistentes à cefotaxima e ceftazidima e sensíveis ao clavulanato associado a um betalactâmico, foram suspeitos de produzirem betalactamases de amplo espectro (ESBL-2be), cuja confirmação foi realizada pelos testes de Concentração Inibitória Mínima e aproximação em disco.

Aqueles que se apresentaram resistentes à cefoxitina foram suspeitos de produzirem betalactamases do tipo AmpC, cuja confirmação foi realizada pelo teste de aproximação em disco.

Em adição, os isolados suspeitos de produzirem ESBL (2be) e AmpC também foram submetidos ao teste de extrato tridimensional.

4.4.1.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para avaliação de ESBL (2be) – através da fita de Etest

Foi realizado por meio da padronização do inóculo, semeadura com suabe em ágar Müller-Hinton (MH) (HiMedia[®]) e posteriormente depositou-se uma fita de Etest[®] (Probac[®]) contendo ceftazidima/ceftazidima+ácido clavulânico. O resultado foi obtido após a incubação por 18 horas à 35°C, sendo positivo para a produção de ESBL quando houve uma redução significativa da CIM (> ou igual 2 diluições) na presença do inibidor ou uma deformação da elipse de inibição na fita de Etest[®] (SOUSA Jr et al., 2004).

4.4.1.2 Teste de aproximação em disco para avaliação de ESBL

No centro da placa de ágar MH contendo o inóculo padronizado, foi depositado um disco de amoxicilina+ácido clavulânico e, ao redor deste foram colocados discos dos β -lactâmicos aztreonam, cefotaxima, ceftazidima e ceftriaxona a uma distância de 20mm, centro a centro. Após a incubação por 18 horas à 35°C, foi realizada a leitura: havendo uma deformação no halo de inibição do β -lactâmico próximo ao disco contendo o clavulanato foi considerado como resultado positivo para a produção de ESBL (JARLIER et al., 1988).

4.4.1.3 Teste de aproximação em disco para avaliação de AmpC

No centro da placa contendo o inóculo ajustado, foi depositado um disco de imipenem e a uma distância de 15mm foram dispostos discos de ceftazidima e ceftriaxona. Após a incubação por 18 horas a 35°C, a presença de uma deformação do halo de sensibilidade ao redor das cefalosporinas próximo ao imipenem indicou a produção de AmpC induzível (MARTÍNEZ-ROJAS, 2009).

4.4.1.4 Avaliação da produção de AmpC e ESBLs (2be), por meio do Teste de Extrato Tridimensional (TET)

Os isolados suspeitos de produzirem betalactamases do tipo AmpC e ESBL foram testados também pelo Teste de Extrato Tridimensional (TET). Estes foram inoculados em ágar MacConkey, e foi obtido um peso de 10-15mg de cada isolado que em seguida, foram inoculadas em microtubos com 0,5mL de água peptonada e incubadas por uma hora à 37°C. Posteriormente, para a lise da parede das células, foram realizadas 5 repetições de congelamento-descongelamento, para obtenção do extrato das enzimas que ficam em suspensão. Em uma placa de ágar MH foi semeada a cepa de *E. coli* (ATCC 25922) e nela foram dispostos discos de ceftazidima (30 μ g) e cefoxitina (30 μ g) para pesquisa de ESBL e AmpC, respectivamente. Com uma lâmina estéril, realizou-se um corte no ágar em direção radial iniciando-os a 5mm da borda do disco de antimicrobiano e 50 μ L da suspensão de enzimas foi colocado no poço. As placas de ágar MH foram incubadas à 35°C por 18h e a formação de uma reentrância no halo formado em volta do disco de antimicrobiano indicou que houve produção de enzimas (SHAHID et al., 2004; SOBIA et al., 2011).

4.4.2 Avaliação da produção de carbapenemase (*metalobetalactamase*)

Os isolados resistentes ao imipenem foram também submetidos ao teste de difusão em disco com ertapenem, considerando os critérios estabelecidos pelo CLSI (2012). E todos os

isolados suspeitos de produzirem esta carbapenemase foram testados pelo teste de Hodge Modificado.

4.4.2.1 Teste de Hodge modificado

A cepa padrão de *E. coli* ATCC 25922 foi semeada sobre a superfície do ágar MH e um disco de ertapenem (10µg) foi colocado no centro da placa. De forma perpendicular ao disco as cepas sugestivas para produção de carbapenemases foram semeadas. Após 16-20 horas de incubação, a 35°C, o crescimento da cepa padrão de *E. coli* dentro da zona de inibição inicialmente causada pelo disco de ertapenem indicou a produção de carbapenemase (CLSI, 2012).

4.5 Detecção de Genes de Resistência

4.5.1 Extração do DNA bacteriano

A extração do DNA bacteriano, foi realizada segundo a metodologia de Chapman et al. (2001), com modificações. Após o crescimento bacteriano em 5mL de caldo BHI (MERCK®), por 12-16h em temperatura ambiente em agitador a 150rpm, uma alíquota de 1,5mL da cultura foi transferida para microtubos, centrifugado por 5 minutos a 1239g e o sobrenadante foi descartado. Repetiu-se o procedimento 03 vezes para cada isolado. As células foram ressuspensas em 600 µL de solução de extração (TrisHCl 200 mM pH 8,0; EDTA 25 mM pH 8,0; SDS 1%, NaCl 25 mM) e agitadas em Vortex, sendo incubadas a 65°C por 30 min. Após o tempo estipulado, os tubos foram resfriados a temperatura ambiente e foi adicionado 600 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico [1-1(24:1)], seguido de uma homogeneização por 2 min e centrifugação a 14549g por 10 min. A fase superior foi transferida para um novo microtubo (aproximadamente 400 µL) e adicionado 2 volumes de etanol 100 % gelado, seguido de incubação a 20 °C por 2 ou 12 h para a precipitação do DNA. Posteriormente, os microtubos foram centrifugados a 14549g por 30 min, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado com etanol 70 % (aproximadamente 500 µL). Depois de seco a temperatura ambiente em uma capela de exaustão, os sedimentos foram ressuspensos em 30 µL de água ultrapura e armazenados a -20 °C.

O DNA total extraído, foi quantificado aplicando-se as amostras juntamente com 1 µL de SYBR Green (Invitrogen®) diluído em gel de agarose 0,8 % e submetendo-o à eletroforese. Após a corrida, o gel foi visualizado sobre luz ultravioleta e documentado no fotodocumentador de géis (L-PIX EX). A estimativa da concentração de DNA foi feita por comparação com o padrão de intensidade de banda do marcador Lambda (λ) (Promega®), nas concentrações de 25 e 50 ng e a qualidade determinada pela ausência de rastro ao longo do gel.

4.5.2 Técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) e eletroforese em gel de agarose

Foram avaliados os genes de resistência à quinolona (*qnr*) (WANG et al., 2004), aminoglicosídeos (*aacC2*) (HO et al., 2010) cujos produtos têm tamanhos 627pb e 897pb, respectivamente. Para avaliação dos genes de betalactamases de amplo espectro foram utilizados os primers *bla_{TEM}* (MINARINI et al., 2007), *bla_{SHV}* (SHAHID, 2010), *bla_{CTX-M}* (GESER et al., 2012), *bla_{AmpC}* (SOBIA et al., 2011), com produtos de tamanhos 861pb,

931pb, 862bp, 634bp, respectivamente. As sequências nucleotídicas dos primers e as referências que foram utilizadas como bases para otimização das reações de amplificação encontram-se indicados no quadro 4.

Quadro 5. Iniciadores empregados e condições de amplificação dos genes pela técnica de PCR.

Gene	Primers	Ciclo
<i>qnr</i>	TCA GCA AGA GGA TTT CTC A GGC AGC ACT ATT ACT CCC A	30 x (94°C 45s, 48°C 45s, 72°C 45s)
<i>aacC2</i>	TAG AGG AGA TAT CGC GAT GC ATT ATC ATT GTC GAC GGC CT	94°C 3 min.; 35 x (94°C 1min.; 58°C 2 min.; 72°C 3min.); 72°C 5min.
<i>bla_{CTX-M}</i>	AAA AAT CAC TGC GCC AGT TC CCG TCG GTG ACG ATT TTA GCC	94°C 15 s, 35 x (94°C 30s, 55°C 30 s, 72°C 30 s), 72°C 7 min.
<i>bla_{SHV}</i>	TTT ATC GGC CCT CAC TCA AGG GCT GCG GGC CGG ATA ACG	94°C 3min.; 32 x (94°C 30s; 56°C 30s; 72°C 60s); 72°C 10min.
<i>bla_{AmpC}</i>	CCC CGC TTA TAG AGC AAC AA TCA ATG GTC GAC TTC ACA CC	95°C 15min.; 35 x (94°C 60s; 58°C 2min.; 72°C 3 min.); 72°C 10 min.
<i>bla_{TEM}</i>	ATG AGT ATT CAA CAT TTC CGT G TTA CCA ATG CTT AAT CAG TGA G	30x (95°C 30s; 42°C 1min.; 72°C 1 min.)

As concentrações utilizadas foram Tampão 10X (10 mM Tris_HCl, pH 9.0; 50 mM KCl, and 0.1% Triton X-100), 1,25 mM de CaCl_2 , 5pmol de cada *primer* (Invitrogen®) 0,2 mM de dNTP (ThermoScience®) e 2 U de *TAQ* polimerase (Fermentas®) em um volume total de reação de 20µl contendo 2µl do DNA extraído.

Os produtos do PCR foram avaliados por meio de eletroforese em gel de agarose (1,5%) e revelados com Sybr Green (Invitrogen®) diluído. O gel foi visualizado sobre luz ultravioleta e documentado no fotodocumentador (L-PIX EX) utilizando marcador de tamanho molecular de 100 pb (Fermentas®).

4.6 Análise Estatística

Os resultados foram expressos em percentuais e as análises estatísticas da média obtida pelos resultados em duplicata. O TET, para detecção das enzimas do tipo ESBL (2be) e AmpC, foi avaliado quanto à sua sensibilidade e especificidade.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Identificação das Enterobactérias

Do total de 381 amostras de leite provenientes de vacas mastíticas, 356 bactérias foram isoladas, sendo observada a presença de bastonetes Gram negativos em 11% (n=42). A distribuição das espécies identificadas a partir de cada fazenda estudada está exposta na tabela 1.

Tabela 1 - Espécies de enterobactérias encontradas em diferentes propriedades.

Fazenda	Percentual de Enterobactérias (%)	Espécies identificadas
A	26,53 (N=13)	<i>Escherichia coli</i> (46,15%; n=6) <i>Proteus mirabilis</i> (38,46%; n=5) <i>Citrobacter freundii</i> (7,70%; n=1) <i>Serratia marcescens</i> (7,70%; n=1)
B	12,50 (N=1)	<i>Serratia marcescens</i> (100%; n=1)
C	16,28 (N=7)	<i>Proteus mirabilis</i> (71,43%; n=5) <i>Escherichia coli</i> (14,29%; n=1) <i>Serratia rubidae</i> (14,29%; n=1)
D	17,65 (N=18)	<i>Proteus mirabilis</i> (50,00%; n=9) <i>Escherichia coli</i> (38,89%; n=7) <i>Citrobacter freundii</i> (5,56%; n=1) <i>Enterobacter aerogenes</i> (5,56%; n=1)
E	0,0 (N=0)	-
F	0,0 (N=0)	-
G	0,0 (N=0)	-
H	0,0 (N=0)	-
I	4,62 (N=3)	<i>Escherichia coli</i> (100%; n=3)

Legenda: A - Seropédica, B – Rio Claro, C – Pirai, D – Passa Três, E – Rio Claro; F – Rio Claro; G – Paracambi; H – Paracambi; I – Rio Claro.

As espécies de enterobactérias com maior percentual nas amostras de leite provenientes de vacas mastíticas, foram *Proteus mirabilis* e *Escherichia coli*, com percentual de 43,23% (19/42), e de 40,48% (17/42), respectivamente. Todos os isolados identificados no laboratório como *Escherichia coli* foram confirmados por meio de testes fenotípicos pela Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ (laudo número: 384/12), que também avaliou a presença dos genes de virulência: *ipaH*, *eae-A*, *stx-2*, *stx-1*, *LT*, *eagg*, *ST*, *ribO157* e a soroglutinação para as cepas EPEC e EIEC. Nenhum dos isolados do presente estudo apresentou esses genes e aglutinou para os antissoros (anexo B). Assim, excluiu-se a possibilidade dessas cepas serem patogênicas.

Escherichia coli é considerada um dos principais agentes da mastite bovina, caracterizando uma contaminação por origem ambiental. As infecções estão relacionadas ao comportamento oportunista do agente, veiculado principalmente pelas fezes dos animais para o canal galactóforo (SANTOS, 2006; MOREIRA et al., 2008). Em trabalho paralelo realizado no nosso laboratório de Bacteriologia, a doutoranda do Programa de Pós Graduação em

Ciência, Tecnologia e Inovação Agropecuária, Tatiani Abreu de Alencar, vem realizando um estudo sobre os aspectos das condições higiênico-sanitárias em unidades leiteiras em municípios do Rio de Janeiro como subsídio para implantação de medidas de controle da mastite bovina. Para esse experimento, a discente realizou uma lista de checagem das atividades do setor da ordenha através de um diagnóstico investigativo em todas as fazendas, na tentativa de se detectar as possíveis fontes de contaminação. Após a avaliação, pode-se constatar que as fazendas A e D apresentaram condições higiênico-sanitárias precárias e muita contaminação fecal. Conforme dados expostos na tabela 1, estas fazendas apresentaram as maiores taxas de prevalência de enterobactérias no leite mastítico, 26,53% (13/49) e 17,65% (18/102), respectivamente.

A fazenda A - situada no município de Seropédica, de pequeno porte (25 vacas - aproximadamente 250L de leite por dia), apresentava ambiente úmido e com muita matéria orgânica. Apesar da higiene realizada nos tetos antes da coleta, os animais não recebiam alimentação após a ordenha e eram soltos novamente no ambiente contaminado. Esta prática pode propiciar a entrada de microrganismos ambientais pelo esfíncter ainda aberto.

A fazenda D, situada no município de Passa Três, caracterizada como de grande porte (200 vacas - 2000L de leite por dia), também apresentava falhas relacionadas às condições higiênico-sanitárias apesar de contar com uma assistência veterinária e zootecnista constante. As únicas enterobactérias isoladas a partir de quadro clínico foram provenientes desta fazenda (7,4% - 2/27). Nesta fazenda havia desvio de função na equipe técnica onde os responsáveis por funções como limpeza do curral, sala de espera e encaminhamento dos animais até a linha de ordenha entravam no fosso e manipulavam os equipamentos e utensílios de ordenha, não procedendo à higiene adequada para tais atividades. O pasto onde os animais ficavam era em terreno baixo e havia acúmulo de água fazendo com que essas vacas fossem, muitas vezes, sujas para serem ordenhadas. Além de servir como fonte de contaminação, esse ambiente propiciava vários problemas nos cascos dos animais como observado nas visitas realizadas na fazenda. A nutrição ali realizada também pode ser um fator de influência no sistema imunológico desses animais e conseqüentemente no desenvolvimento da mastite, visto que a alimentação dada aos animais era rica em concentrado, sendo portanto, deficiente em vitaminas e minerais.

A fazenda C (200 vacas com produção diária de 1700L de leite), situada no município de Piraí, também apresentou elevado percentual de enterobactérias no leite mastítico. Apesar dessa fazenda apresentar boas condições higiênico-sanitárias, foi observado que antes da ordenha as vacas recebiam banhos de água com mangueira de forma irregular. Outro importante aspecto a ser considerado é a questão genético-racial, pois os animais desta propriedade eram da raça holandesa. Esta raça, embora apresente características genéticas que lhe conferem maior produção de leite, possui tetos pendulares mais próximos ao chão e musculatura mais frouxa, predispondo à infecção. Outros fatores pré-disponíveis são os aspectos de conformação dos tetos como comprimento, fisiologia e a produção do tampão de queratina (OLIVEIRA et al., 2011). Em estudos que avaliou os fatores de riscos da mastite observou uma frequência menor de positividade ao exame microbiológico, em animais mestiços em relação à raça holandesa. Carneiro et al. (2009) e Coentão et al. (2008), relataram que a profundidade do úbere é um fator de risco importante, onde os animais que apresentam a base do úbere baixo ou próximo ao jarrete apresentam 1,73% vezes mais chances de terem a Contagem de Células Somáticas (CCS) acima de 200.000 células/mL do que os animais com a base acima do jarrete.

As fazendas E,F,G e H não apresentaram isolamento de enterobactérias e isto pode dever-se ao fato de apresentarem melhores condições higiênico-sanitárias.

O envolvimento da espécie *P. mirabilis* na etiologia da mastite bovina é subestimado e poucos relatos na literatura apontam para a sua importância. Segundo Hogan & Smith (2003), este gênero está presente no ambiente e pode contaminar as mangueiras e água usadas na lavagem dos tetos antes da ordenha. Sendo assim, a água também pode ser uma importante fonte de contaminação dos agentes ambientais. A discente Tatiani Alencar, em trabalho paralelo, também realizou a análise da água direto dos pontos de saída utilizados nas salas de ordenha e seu estudo revelou que a fazenda D, cuja prevalência de *P. mirabilis* foi de 50% (9/18), apresentou os maiores valores tanto para coliformes totais quanto para termotolerantes (90NMP/100mL e 9NMP/ mL, respectivamente). Estudando a qualidade da água utilizada em 25 pequenas propriedades leiteiras de Minas Gerais, Mallet & Cristina (2007) observaram que 68% não se encontravam dentro dos padrões estabelecidos pela legislação para coliformes termotolerantes.

Além disso, existe o risco de contaminação das águas com *Escherichia coli* O157. No rebanho, a *E. coli* O157 é onipresente tanto em bovinos de corte quanto de leite. Apesar de o bovino albergar esta bactéria, normalmente não é afetado por ela. Porém sua presença nas fontes de água aumenta o risco da qualidade do produto pela contaminação cruzada, que pode ter consequências abrangentes sobre a saúde e confiança dos consumidores. Em situações mais específicas para o ambiente de confinamento, a contaminação da água potável com *E. coli* O157 parece ser um problema generalizado. Esta bactéria tem sido detectada em diversas fontes de água do gado como lagos, riachos e reservatórios (SILVEIRA, 2010).

O esforço para resolver problemas associados à qualidade da água deve levar em conta os pontos de adequação e controle como as fontes de abastecimento, a realização de um levantamento das fontes e vulnerabilidade dos aquíferos, o conhecimento detalhado do sistema de captação, reserva e distribuição de água da propriedade bem como aplicação e mensuração correta de tratamento da água disponível na propriedade. Independente da avaliação que se faça dos sistemas de abastecimento, o processo de desinfecção nunca deve ser uma opção e sim uma obrigação que já é regulamentada pela Anvisa/MS Portaria 518 (Ministério da Saúde, 2005). Portanto, melhorar a qualidade física e microbiológica da água deve ser uma obrigação de todos os profissionais da pecuária envolvidos na produção (SANTOS, 2003)

Em 78% dos casos (33/42) o isolamento das enterobactérias foi concomitante com outros grupos bacterianos, como *Staphylococcus* spp, *Streptococcus* spp, *Listeria* spp e *Corynebacterium* spp, indicando uma infecção mista. O isolamento de enterobactérias juntamente com outras espécies bacterianas geralmente ocasiona mastite subclínica, sendo o agente prevalente o *Staphylococcus* spp. (RIBEIRO et al., 2003; ZADOKS et al., 2011). Nos casos onde houve apenas o crescimento de enterobactérias, não foi estabelecida uma espécie única prevalente, pois foram encontradas infecções puras causadas por *E.coli* (4/9), *Proteus mirabilis* (2/9), *Serratia marcescens* (1/9), *Enterobacter aerogenes* (1/9), *Citrobacter freundii* (1/9). No estudo realizado por Santos (2006), as enterobactérias foram isoladas individualmente em apenas 2,44% (2/82) e as infecções mistas com *Staphylococcus* spp. foram mais frequentes (12/18), com destaque para a associação de enterobactérias e Estafilococos Coagulase Negativa (ECN). Outros microrganismos são descritos em isolamentos bacterianos caracterizados por infecções mistas, com associação a *Corynebacterium* spp. e *Bacillus* spp. (LANGONI et al., 2000; PEDRINI & MARGATHO, 2003; FREITAS et al., 2005; ANDRADE et al., 2009).

5.2 Detecção Fenotípica da Resistência Antimicrobiana

Quanto ao perfil fenotípico de suscetibilidade antimicrobiana, foi detectado 26,2% de

resistência à gentamicina; 33,3% à norfloxacina; 42,9% à neomicina, 42,9% à sulfametoxazol+trimetoprim, 52,4% de resistência à ciprofloxacina. As espécies *Escherichia coli* e *Citrobacter freundii* foram as que apresentaram resistência a todos os antimicrobianos testados (figura 2). Em trabalho realizado por Srinivasan et al. (2007), *Escherichia coli* isoladas de vacas com mastite foram multirresistentes e ainda carream vários genes de resistência.

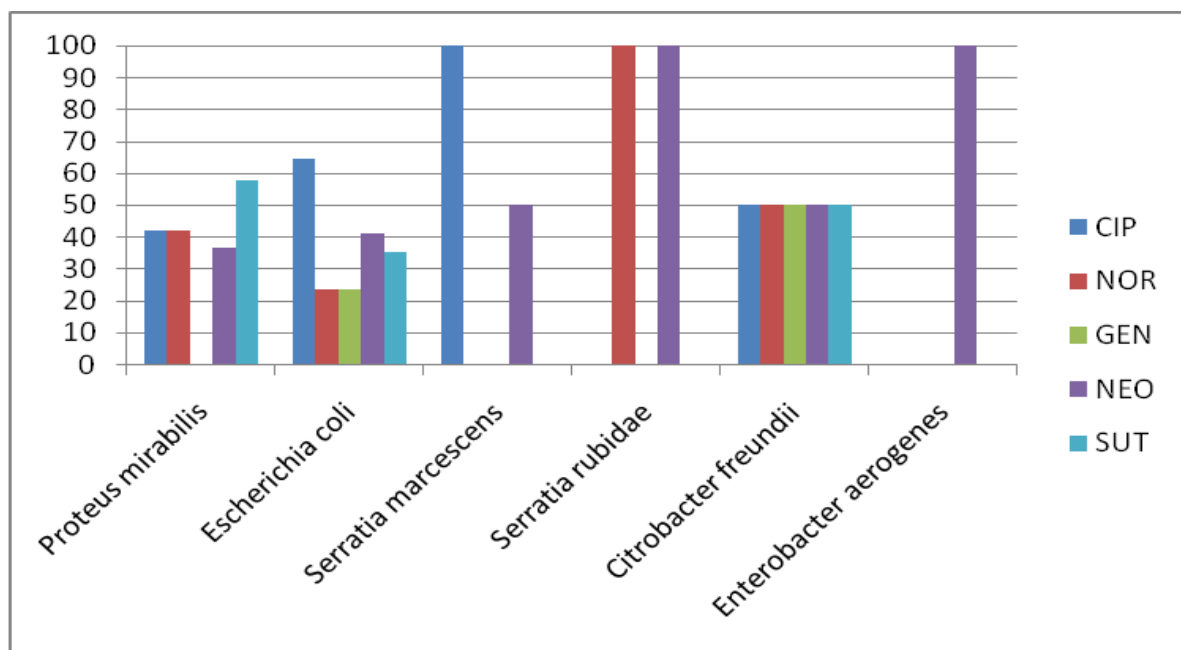


Figura 2. Gráfico apresentando percentual de resistência das espécies de enterobactérias isoladas de leite proveniente de vacas com mastites. Legenda: GEN – Gentamicina, NOR – Norfloxacina, SUT – Sulfametoxazol-Trimetoprim, NEO – Neomicina, CIP – Ciprofloxacina.

Antimicrobianos são uma importante ferramenta nos programas de controle da mastite. O controle das infecções do úbere de vacas leiteiras frequentemente inclui uma combinação de medidas preventivas para reduzir o número de novas infecções, tratamento da vaca seca com antimicrobianos, tratamento dos animais infectados e abate de animais cronicamente infectados. A utilização frequente de tratamento com antimicrobiano nesses animais tem sido relatado como um fator de risco para o desenvolvimento ou a seleção de bactérias resistentes a várias classes de antimicrobianos (BENGTSSON et al., 2009).

Após análise fenotípica da suscetibilidade aos antimicrobianos, a gentamicina apresentou melhor eficácia *in vitro* dentre os testados. Já a porcentagem de isolados resistentes à neomicina foi mais elevada, apesar destes fármacos pertencerem à mesma classe de antimicrobianos. A presença do gene *aacC2*, um dos responsáveis pela inativação enzimática dos aminoglicosídeos, foi detectada em 25% (5/20) dos isolados resistentes a pelo menos um aminoglicosídeo testado (figura 3). Ho et al. (2010) encontraram esse gene em 75,5% dos isolados de *E.coli* resistentes a gentamicina, já a correlação no presente trabalho foi de 50% (2/4). Os aminoglicosídeos continuam a desempenhar um papel importante na terapia antimicrobiana contra os agentes patogênicos Gram-negativos e Gram-positivos, geralmente em combinação com agentes β -lactâmicos (WASSEF et al., 2010). No Brasil, diferentemente de outros países, dentre os produtos utilizados para o tratamento de mastite registrados pelo Ministério da Agricultura, estão os aminoglicosídeos, associados ou não e a gentamicina é o principal representante utilizado (RAIA Jr, 2006).

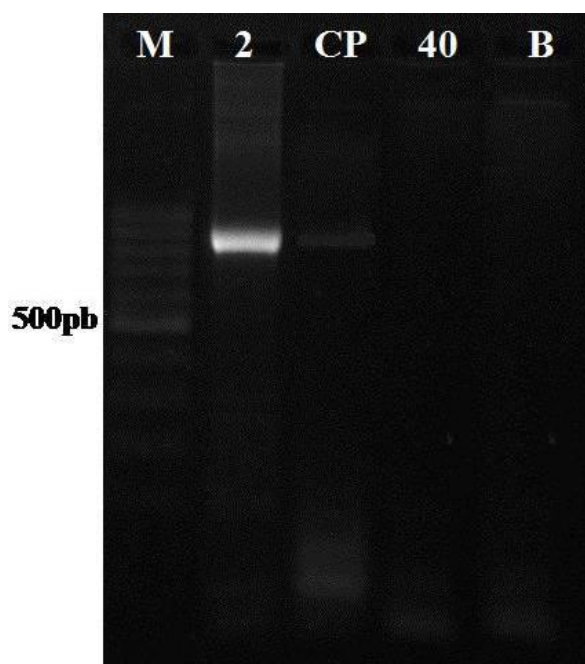


Figura 3. Perfil eletroforético do gene *aacC2* (867 pb) em gel de agarose 1,5% (isolado positivo indicado com a seta). M= marcador 100 pb; 2 = isolado positivo; CP = controle positivo; 40 = isolado negativo; B = branco da reação de PCR.

Os agentes antimicrobianos de espectro estendido, tais como fluoroquinolonas são utilizados ou recomendados para o tratamento da mastite causada por enterobactérias (WENZ et al., 2001; ERSKINE et al., 2002; HUXLEY, 2004). No presente estudo, foi detectado 52,38% (22/42) de resistência à ciprofloxacina e 33,3% (14/42) à norfloxacina. As taxas de resistência às fluoroquinolonas em isolados de origem animal vem aumentando ao longo dos anos e este fato é preocupante pois as fluoroquinolonas têm sido consideradas como alternativas atraentes para o tratamento de infecções causadas por cepas produtoras de ESBL (KIJIMA-TANAKA et al., 2003). O gene *qnr* foi detectado em 66,7% (10/15) dos isolados que apresentaram resistência a pelo menos uma fluoroquinolona testada (figura 4). A resistência a quinolonas também pode estar relacionada à diminuição da concentração do antimicrobiano dentro da célula, seja por modificações ou inexistência de porinas ou por mutação em genes regulatórios que afetam a atividade de uma gama de bombas de efluxo (HAWKEY, 2003).

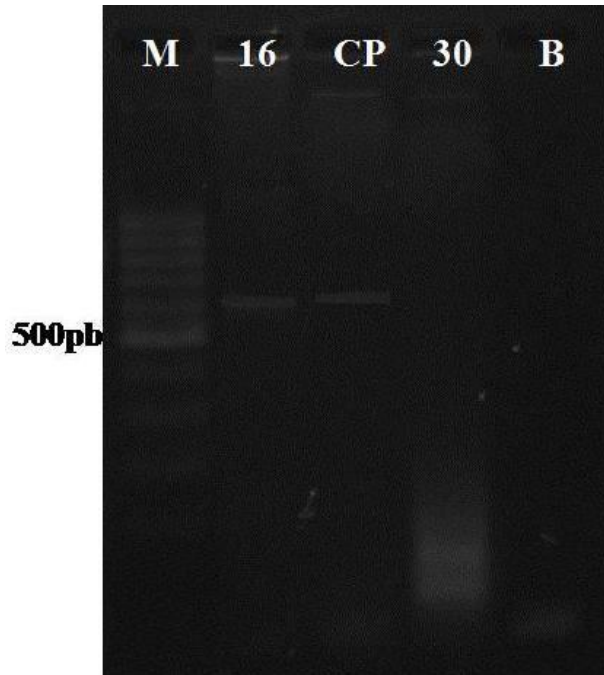


Figura 4. Perfil eletroforético do gene *qnr* (627 pb) em gel de agarose 1,5% (isolado positivo indicado com a seta). M= marcador 100 pb; 16 = isolado positivo; CP = controle positivo; 30 = isolado negativo; B = branco da reação de PCR.

A resistência ao sulfametoxazol+trimetoprim foi avaliada apenas pelo teste fenotípico, apresentando-se em 42,8% (18/42). Esse antimicrobiano vem sendo utilizado no tratamento das mastites e, de forma ilícita em algumas propriedades, como promotor de crescimento. A sua detecção vem sendo frequentemente encontrada em efluentes hospitalares, fonte de água municipal, efluentes de tratamento de água e esgoto, águas superficiais e em alguns casos águas subterrâneas (MEIRELES, 2008).

Foi observada uma grande heterogeneidade antimicrobiana considerando os aminoglicosídeos, quinolonas e a associação sulfametoxazol+trimetoprim, sendo detectados 13 perfis (Tabela 2), dentre os quais o perfil predominante foi o de sensibilidade a todos os antimicrobianos (perfil I – 28,5%). Em estudos com base em dados epidemiológicos e de tipagem genética desenvolvidos por vários grupos científicos mostrou grande heterogeneidade entre os isolados associados à mastite apontando para o fato de que os episódios de reinfecção poderiam ser frequentemente causados por diferentes cepas (LANG et al., 2009).

Tabela 2 – Antibiotipagem das enterobactérias e presença dos genes de resistência a aminoglicosídeos e quinolonas.

Espécie	Perfil	Resistência antimicrobiana	Frequência	<i>aacC2</i> *	<i>qnr</i> *	<i>aacC2+qnr</i> *
<i>P. mirabilis</i> (n=19)	1	-	6	-	1	-
	2	CIP-NOR-GEN-NEO-SUT	5	-	2	-
	3	CIP-SUT	1	-	1	-
	4	NOR	1	-	1	-
	5	NEO	1	-	1	-
	6	SUT	2	-	2	-
	7	CIP-NOR-SUT	1	-	1	-
	8	CIP-NOR-NEO-SUT	1	-	1	-
	9	GEN-SUT	1	-	-	-
<i>E. coli</i> (n=17)	1	-	5	2	-	-
	2	CIP-NOR-GEN-NEO-SUT	3	2	1	-
	10	CIP	2	-	-	-
	3	CIP-SUT	1	-	1	-
	7	CIP-NOR-SUT	1	-	1	-
	11	CIP-NEO	3	-	-	-
	12	CIP-GEN-SUT	1	-	-	-
5	NEO	1	-	-	-	
<i>S. marcescens</i> (n=2)	11	CIP-NEO	1	1	-	-
	10	CIP	1	-	-	1
<i>S. rubidae</i> (n=1)	13	NOR-NEO	1	1	-	-
<i>C. freundii</i> (n=2)	1	-	1	-	1	-
	2	CIP-NOR-GEN-NEO-SUT	1	-	-	-
<i>E. aerogenes</i> (n=1)	5	NEO	1	1	-	-

* número de isolados positivos para os genes

Legenda: GEN – Gentamicina, NOR – Norfloxacin, SUT – Sulfametoxazol-Trimetoprim, NEO – Neomicina, CIP – Ciprofloxacina.

Dentre os perfis apresentados na tabela 2, 61,5% (8/13) e 38,4% (5/13) apresentaram os genes *qnr* e *aacC2* respectivamente, que podem estar contidos em plasmídeos que contém genes que também codificam resistência aos β -lactâmicos. Um isolado, *Serratia marcescens*, pertencente ao perfil 10 apresentou os genes *qnr* e *aacC2* apesar de não expressar fenotipicamente a característica de resistência aos aminoglicosídeos.

A pressão seletiva por meio do uso de antimicrobianos atuais pode ser responsável pela ampla distribuição geográfica do *qnr*, principalmente pelo fato de sua ligação genética estar associada aos determinantes de resistência de outros antimicrobianos. Segundo Wang et al. (2004), a resistência às quinolonas é encontrada surpreendentemente em alta frequência (18% a 56%) em isolados produtores de betalactamases de amplo espectro. Por isso é importante a investigação sobre a possível contribuição de antimicrobianos não β -lactâmicos na emergência ou persistência de bactérias produtoras de betalactamases (LI et al., 2007).

A multirresistência foi detectada em 97,6% (41/42) dos isolados testados, uma vez que estes foram resistentes a duas ou mais classe antimicrobiana (Tabela 3).

Tabela 3. Antibiotipagem das bactérias avaliando todos os antimicrobianos testados.

Espécie	Perfil	Resistência antimicrobiana	Frequência
<i>Escherichia coli</i> (n= 17)	1	PEN	2
	2	AMIN - PEN	1
	3	QUIN - PEN	1
	5	PEN+AC - PEN	3
	4	QUIN - AMIN - PEN	1
	5	QUIN - PEN+AC - PEN	1
	6	QUIN - AMIN - SUT - PEN	2
	7	QUIN - AMIN - PEN+AC - PEN	2
	8	QUIN - SUT - CEF 4G - PEN+AC - PEN	1
	9	QUIN - AMIN - SUT - CEF 2G - PEN+AC - PEN	2
	10	QUIN - SUT - CEF 2G - CEF 3G - PEN+AC - PEN	1
<i>Proteus mirabilis</i> (n=19)	5	PEN+AC - PEN	1
	11	CEF 2G - PEN+AC - PEN	1
	12	CEF 2G - CEF 3G - PEN+AC - PEN	1
	13	SUT - CEF 3G - CEF 4G - PEN	1
	14	QUIN - CEF 3G - CEF 4G - PEN+AC - PEN	1
	16	CEF 2G - CEF 3G - CEF 4G - PEN+AC - PEN	3
	17	QUIN - SUT - CEF 2G - PEN+AC - PEN	1
	18	AMIN - CEF 3G - CEF 4G - PEN+AC - PEN	1
	19	SUT - CEF 2G - CEF 3G - CEF 4G - PEN+AC - PEN	1
	9	QUIN - AMIN - SUT - CEF 2G - PEN+AC - PEN	1
	20	QUIN - SUT - CEF 2G - CEF 3G - CEF 4G - PEN+AC - PEN	1
	21	QUIN - AMIN - SUT - CEF 3G - CEF4G - PEN+AC - PEN	1
	22	AMIN - SUT - CEF 2G- CEF 3G - CEF 4G - CARB - PEN+AC - PEN	1
	23	QUIN - AMIN - SUT - CEF 3G - CARB - PEN+AC - PEN	1
	24	QUIN - AMIN - SUT - CEF 2G - CEF 3G - CEF 4G - PEN+AC - PEN	1
25	QUIN-AMIN- SUT- CEF 2G-CEF 3G-CEF 4G-CARB- PEN+AC- PEN	2	
<i>Citrobacter freundii</i> (n=2)	26	CEF 3G - CEF 4G - PEN+AC - PEN	1
	9	QUIN - AMIN - SUT - CEF 2G - PEN+AC - PEN	1
<i>Enterobacter aerogenes</i> (n=1)	27	AMIN - CEF 2G - PEN+AC - PEN	1
<i>Serratia rubidae</i> (n=1)	28	QUIN - AMIN - CEF 2G - PEN+AC - PEN	1
<i>Serratia marcescens</i> (n=2)	7	QUIN - AMIN - PEN+AC - PEN	1
	29	QUIN - CEF 2G - PEN+AC - PEN	1

PEN – penicilina; PEN+AC – penicilina+ácido clavulânico; QUIN – quinolona; AMIN – aminoglicosídeo; SUT – sulfa+trimetoprim; CEF 2G – cefalosporina de 2ª geração; CEF 3G – cefalosporina de 3ª geração; CEF 4G – cefalosporina de 4ª geração; CARB – carbapenema.

Foram detectados 29 perfis de resistência antimicrobiana. Dentre as espécies isoladas, *Proteus mirabilis* teve o maior número de perfis de resistência identificados (16 perfis distintos) demonstrando a importância da disseminação de resistência antimicrobiana no ambiente. Além disso, a grande variedade de perfis demonstra que tais isolados podem conter plasmídeos contendo genes de resistência que conferem a característica de multirresistência observada fenotipicamente.

Em geral, a importância sobre a emergência e transferência de bactérias multirresistentes (MDR) de animais para a população humana via cadeia alimentar tem crescido consideravelmente. Cepas MDR de patógenos entéricos podem surgir a partir de reservatórios animais, devido à seleção dos agentes antimicrobianos utilizados como promotores de crescimento (RAMCHANDANI et al., 2005). No contexto da produção leiteira, mesmo que o leite produzido seja pasteurizado, o consumo de leite não-pasteurizado ainda existe principalmente na produção de queijo artesanal. Logo, a determinação de bactérias MDR em alimentos de origem animal, em toda a cadeia de produção, permite um monitoramento dos padrões disseminados e dados epidemiológicos que podem ser utilizados para a segurança alimentar, saúde animal e consequentemente causando impactos na saúde pública (SAINI et al, 2012).

5.3 Detecção Fenogenotípica da Produção de Betalactamases

Apesar do teste de difusão em disco com β -lactâmicos ter sido realizado para análise e caracterização das betalactamases, foi aferida a resistência de forma isolada às cefalosporinas de segunda e terceira geração, uma vez que tem sido amplamente utilizadas no tratamento das mastites. Após análise da suscetibilidade, foi possível detectar 47,6% (20/42) e 40,4% (17/42) de resistência às cefalosporinas de segunda e terceira geração, respectivamente. Nas fazendas estudadas, observou-se uma frequente administração desses antimicrobianos, principalmente ceftiofur e a cefalexina, para tratar os animais doentes e nos foi reportado que sua utilização só não era mais constante devido ao seu alto custo.

Após a análise interpretativa do teste de difusão em disco, com os diferentes grupos de antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos, as betalactamases produzidas pelas distintas espécies foram classificadas (tabela 3).

Tabela 4. Classificação das betalactamases produzidas pelas distintas espécies de enterobactérias, a partir da análise interpretativa do teste de difusão em disco contendo antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos (continua).

Espécie	Resistência antimicrobiana	Betalactamase	Isolados
<i>E. coli</i>	PEN	2a	10, 19, 22, 24, 33, 41
	AMC-AMO-AMP-PEN-OXA	2d	11, 15,42
	AMO-AMP-PEN	2br*	32, 40
	AMC-AMO-PEN-OXA	2d	5, 21
	AMC-AMO-AMP-PEN-CPM-OXA	2d	36
	AMC-AMO-AMP-PEN-CFO-CAZ-CRO	1e	27
	AMC-AMO-AMP-PEN-CFO	1	18, 35
<i>S. marcescens</i>	AMC-AMO-AMP-PEN-OXA	2d	20
	AMC-AMO-AMP-PEN-CFO	1	2

Tabela 4. Classificação das betalactamases produzidas pelas distintas espécies de enterobactérias, a partir da análise interpretativa do teste de difusão em disco contendo antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos (continua).

Espécie	Resistência antimicrobiana	Betalactamase	Isolados
<i>S. rubidae</i>	AMC-AMO-AMP-PEN-CFO	1	1
<i>E. aerogenes</i>	AMC-AMO-AMP-PEN-CFO	1	39
<i>C. freundii</i>	AMC-AMO-AMP-PEN-CPM-CAZ-CRO	Pen+Cef	31
	AMC-AMO-AMP-PEN-CFO	1	12
<i>P. mirabilis</i>	AMC-AMO-AMP-PEN-OXA	2d	29
	AMC-AMO-AMP-PEN-CPM-CRO	2ber	37
	AMC-AMO-AMP-PEN-CPM-CAZ-CRO	Pen+Cef	9
	AMO-AMP-PEN-CPM-CAZ	2b	16
	AMO-PEN-CPM-CAZ-CRO	2b	6
	AMC-AMO-AMP-PEN-CPM-CFO-CAZ-CRO	1e	8, 13, 17, 23, 25, 28
	AMC-AMO-AMP-PEN-CFO	1	14, 26, 34
	AMC-AMO-AMP-PEN-CFO-CAZ	1e	38
	AMC-AMO-AMP-PEN-CPM-CFO-CAZ-CRO-IPM	1e	3, 4, 30
	AMC-AMO-AMP-PEN-CAZ-CRO-IPM	2ber	7

* apresentou sensibilidade reduzida ao ácido clavulânico; Legenda: Pen+Cef = penicilinase e cefalosporinase
 Legenda: PEN – Penicilina, AMC – Amoxicilina + Ácido clavulânico, AMO – Amoxicilina, OXA – Oxacilina, CPM – Cefepime, CFO – Cefoxitina, CAZ – Ceftazidima, CRO – Ceftriaxona, IPM – Imipenem.

O grupo 1 foi predominante, sendo detectado em 47,6% (20/42) das espécies. A resistência a ceftazidima separou o grupo 1 em dois subgrupos: 1 (21,4% - 9/42) e 1e (26,2% - 11/42). As enzimas do grupo 1 são cefalosporinas pertencentes a classe molecular C e são codificadas principalmente por cromossomos em muitas enterobactérias e outros microrganismos. São geralmente resistentes ao ácido clavulânico, e apresentam atividade contra as cefamicinas, como a cefoxitina.

Muitas espécies incluindo *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae* e *Serratia marcescens*, são produtoras naturais de AmpC e sua expressão é baixa porém induzível ao contrário de *Proteus* spp. que normalmente apresenta este gene de forma plasmidial. Essa indução é percebida pela exposição da bactéria a alguns β -lactâmicos como amoxicilina, ampicilina, imipenem e ácido clavulânico (MARTÍNEZ-ROJAS, 2009; BUSH & JACOBY, 2010). Em trabalho realizado por Dunne & Hardin (2005), os autores sugerem a utilização do disco de imipenem na pesquisa desta indução que é frequentemente cromossomal, ao contrário do gene plasmidial que é sempre expresso. No presente trabalho, os 20 pertencentes ao grupo 1 foram testados a partir dessa metodologia que revelou 30% (6/20) e 70% (14/20) foram classificadas como sendo do tipo induzível e não induzível, respectivamente (figura 5).

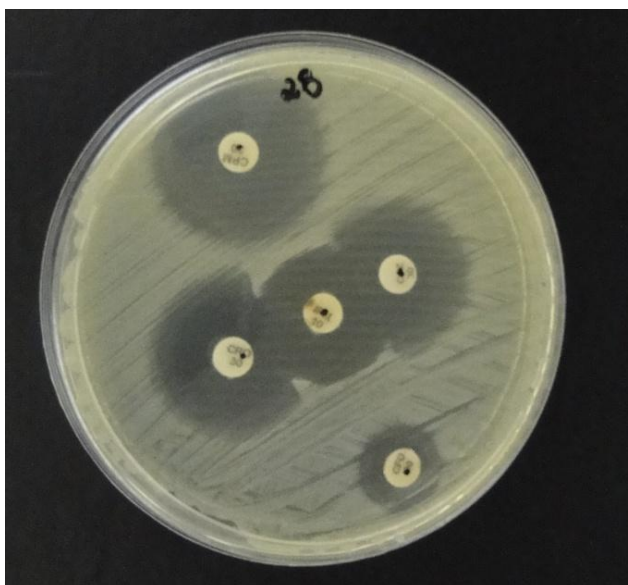


Figura 5- Indução da resistência pela presença do disco de imipenem pela “Zona D” formada.

As bactérias produtoras da enzima AmpC induzível pertenceram às espécies: *S. marcescens*, *S. rubidae*, *E. coli*, *P. mirabilis*, *E. aerogenes* (tabela 4).

Tabela 5 – Classificação das betalactamases do grupo 1 em induzíveis e não induzíveis segundo a formação de “zona D”.

Isolados	Espécie	CPM	CFO	CAZ	CRO	IPM	"ZONA D"	Característica da enzima do grupo 1
1	<i>S. rubidae</i>	S	R	S	S	S	SIM	induzível
2	<i>S. marcescens</i>	S	R	S	S	S	SIM	induzível
3	<i>P. mirabilis</i>	R	R	R	R	R	NÃO	não induzível
4	<i>P. mirabilis</i>	R	R	R	R	R	NÃO	não induzível
8	<i>P. mirabilis</i>	R	R	R	R	S	NÃO	não induzível
12	<i>C. freundii</i>	S	R	S	S	S	NÃO	não induzível
13	<i>P. mirabilis</i>	R	R	R	R	S	NÃO	não induzível
14	<i>P. mirabilis</i>	S	R	S	S	S	SIM	induzível
17	<i>P. mirabilis</i>	R	R	R	R	S	NÃO	não induzível
18	<i>E. coli</i>	S	R	S	S	S	SIM	induzível
23	<i>P. mirabilis</i>	R	R	R	R	S	NÃO	não induzível
25	<i>P. mirabilis</i>	R	R	R	R	S	NÃO	não induzível
26	<i>P. mirabilis</i>	S	R	S	S	S	NÃO	não induzível
27	<i>E. coli</i>	S	R	R	R	S	NÃO	não induzível
28	<i>P. mirabilis</i>	R	R	R	R	S	NÃO	não induzível
30	<i>P. mirabilis</i>	R	R	R	R	R	NÃO	não induzível
34	<i>P. mirabilis</i>	S	R	S	S	S	NÃO	não induzível
35	<i>E. coli</i>	S	R	S	S	S	NÃO	não induzível
38	<i>P. mirabilis</i>	S	R	R	S	S	SIM	induzível
39	<i>E. aerogenes</i>	S	R	S	S	S	SIM	induzível

Apesar de *Citrobacter freundii* ser descrita como espécie produtora de enzima induzível na presença de alguns β -lactâmicos (imipenem, por exemplo), no presente trabalho

essa espécie apresentou a produção da enzima AmpC de forma não induzível (BUSH & JACOBY, 2010). A detecção da origem desse gene será confirmada em estudos posteriores, já que a literatura atual não descreve a forma plasmidial nessa espécie.

Alguns autores descrevem a indução da produção desta betalactamase como sendo de origem cromossomal e a não indução, oriunda de plasmídeo, e que este teste da difusão em disco pode ser empregada para essa descrição. No entanto, Martínez-Rojas (2009) descreve que esta técnica fenotípica não é capaz de realizar essa diferenciação sendo necessárias técnicas mais apuradas como a transformação *in vitro*. O estudo pela busca da origem dos genes de resistência é de extrema importância devido à transferência horizontal por meio de plasmídeos que pode ocorrer entre espécies e gêneros diferentes facilitando a disseminação dos mecanismos de resistência em bactérias do ambiente.

Foi detectada uma elevada variedade de subgrupos pertencente ao grupo 2. Os isolados com sensibilidade reduzida ao ácido clavulânico e suspeitos de produzirem ESBL (2be) foram submetidos aos testes de aproximação em disco e CIM.

O teste de aproximação em disco para pesquisa de ESBL (2be), foi realizado (figura 6a) não sendo classificados como produtores de ESBL (2be).

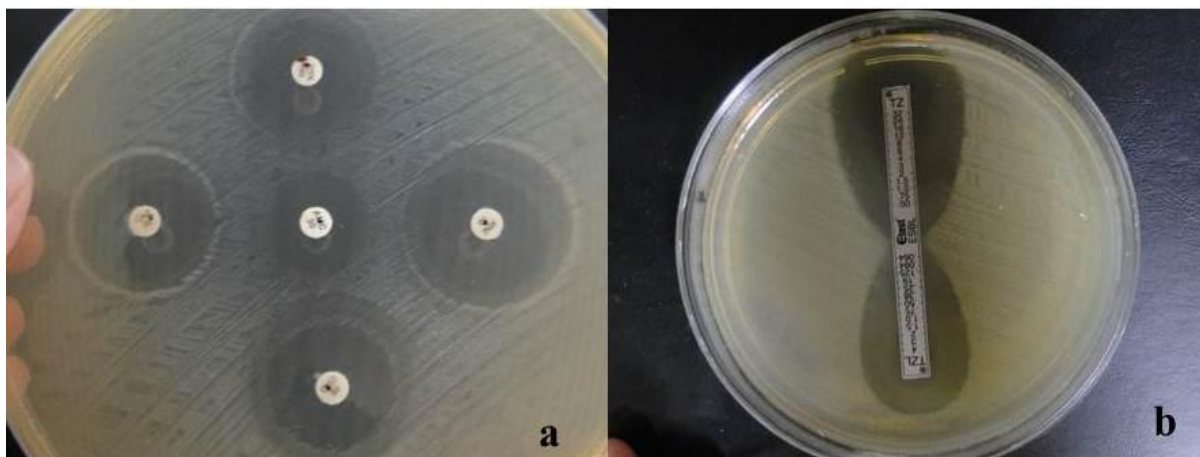


Figura 6 – a) Teste de aproximação em disco demonstrando que não houve a deformação do halo do β -lactâmico em direção ao do ácido clavulânico. **b)** Teste com fita de Etest[®], não sendo possível a leitura da diferença entre o halo formado na região de ceftazidima e da associação ceftazidima-ácido clavulânico para classificação de ESBL (2be).

Segundo o CLSI, o CIM deve ser realizado por microdiluição em caldo, no entanto, pela dificuldade encontrada na aquisição dos antimicrobianos em pó, principalmente o ácido clavulânico, realizou-se o CIM por meio do Etest[®]. Em diversos outros trabalhos como Vercauteren et al. (1997), Bradford (2001), Minarini et al.(2007), também utilizou-se o Etest[®]. Nenhum dos isolados testados no presente trabalho foi confirmado para a produção de ESBL (2be) por essa metodologia (figura 6b).

A detecção de enterobactérias produtoras de ESBL em amostras humanas é bem estudada, principalmente em ambiente hospitalar já sendo relatadas como agentes causadores de infecções ocorridas inclusive em pediatria. Há uma variação na distribuição dessas enzimas em relação às espécies e aos períodos estudados (TOLENTINO, 2009; DIAS et al., 2011; NOGUEIRA, 2011).

Em 8 isolados, foi realizado o teste de sensibilidade à oxacilina para diferenciação dos subgrupos 2br e 2d, no qual todos apresentaram resistência a este antimicrobiano sendo classificados como pertencentes ao grupo 2d. A enzima predominantemente encontrada nesse

subgrupo é a OXA, hidrolisando com maior especificidade a oxacilina. O gene *bla*_{OXA} não foi pesquisado porém não há relatos desse gene em isolados de leite mastítico e há poucos relatos desse gene em bactérias isoladas de animais (LI et al, 2007; DAHMEN et al., 2013). O grupo funcional 2 inclui as classes molecular A e D. Esse representa o maior grupo de betalactamases devido ao aumento da identificação de ESBL nos últimos anos e fazendo com que houvesse sua divisão em subgrupos. As enzimas hidrolisam preferencialmente benzilpenicilina e muitos derivados de penicilina, e podem hidrolisar também cefalosporinas, carbapenemas ou monobactâmicos (BUSH & JACOBY, 2010).

Os isolados pertencentes ao grupo 1 e 2 também foram submetidos ao TET (figura 7) que confirmou a produção da enzima do tipo AmpC e ESBL em 25% (5/20) e 5,5% (1/18), respectivamente.

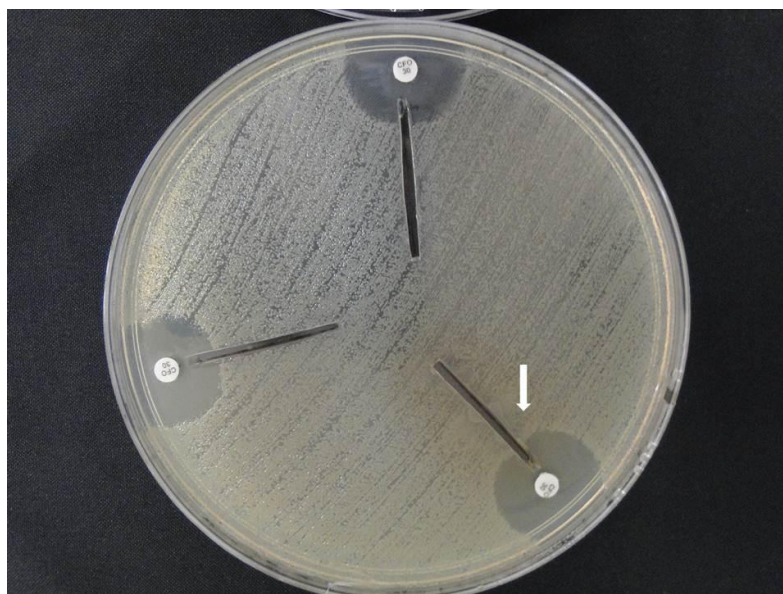


Figura 7– Teste de Extrato Tridimensional: a seta mostra a reentrância no halo, conferindo a esse isolado a confirmação da produção da enzima.

O TET não é preconizado para a verificação de betalactamases tipo ESBL e AmpC, porém foi realizado no presente estudo de forma experimental para possível confirmação dos isolados suspeitos de produzirem tais enzimas. Foram considerados como testes padrão para ESBL, o CIM e a resistência a cefoxitina para AmpC. Em relação à ESBL, o resultado do TET confirmou a negatividade da produção da enzima pelo isolado. Nos isolados pertencentes ao grupo 1, o TET também apresentou uma elevada especificidade (95%), porém uma baixa sensibilidade (25%) detectando apenas 5 isolados resistentes à cefoxitina (anexo C). Diferente da detecção da produção de betalactamase tipo ESBL, a do tipo AmpC não é padronizada pelo CLSI, sendo uma importante barreira ao conhecimento da prevalência e epidemiologia dessa enzima. Esses fatores causam dificuldade na utilização da técnica do extrato para a busca de AmpC visto que há uma dificuldade na padronização interlaboratorial dos testes considerados padrão podendo ser o problema da incorreta detecção das enzimas. Entretanto, a baixa confirmação pode estar ligada a outros mecanismos de resistência (SHAHID et al.,2004; SOBIA et al., 2011).

Um total de quatro isolados, sendo três pertencentes ao grupo 1 e um pertencente ao grupo 2, foram suspeitos de produzirem carbapenemase, devido a sua resistência ao imipenem. Esses isolados foram testados fenotipicamente pela difusão em disco com

ertapenem e pelo Teste Hodge Modificado (THM) (figura 8). Uma vez que esses isolados pertenciam ao gênero *Proteus*, a execução do THM em AMH foi dificultada pela sua intensa motilidade. Sendo assim, utilizou-se o meio Cled (com indicador Andrade - HiMedia®) devido à sua deficiência de íons e nenhum dos isolados expressou produção fenotípica de carbapenemase em ambos os testes. Isso pode ser explicado pelo fato de que existe uma variante da enzima AmpC que foi recentemente descrita com atividade hidrolítica contra o imipenem (BUSH & JACOBY, 2010). Segundo Kaoa et al. (2010), algumas dessas enzimas são fracas hidrolisadoras de imipenem quando expressas em grandes quantidades, o que parece explicar a resistência encontrada nestes isolados. Em estudos futuros esses isolados serão submetidos ao THM utilizando as cepas padrão *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA1705 (controle positivo) e *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA1706 (controle negativo) para sua validação.

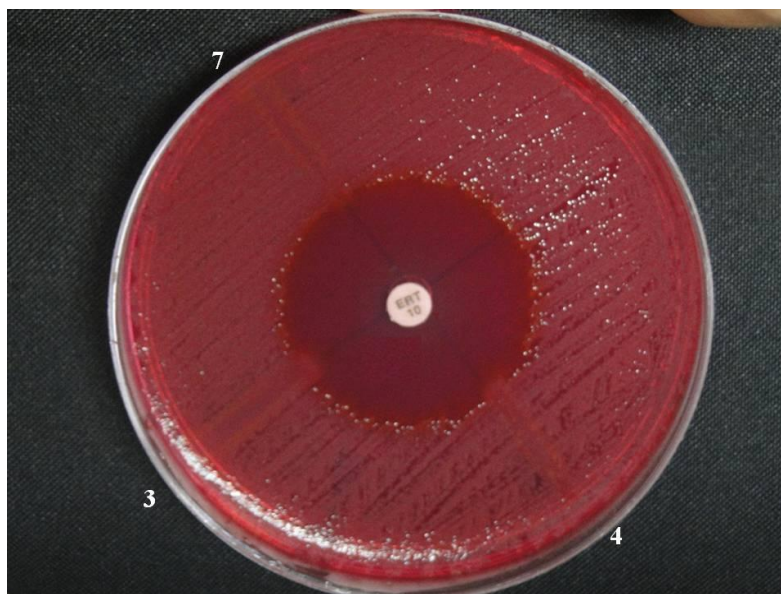


Figura 8- Teste de Hodge Modificado em ágar Cled (com indicador Andrade - HiMedia®): 3,4,7 - isolados negativos para produção de carbapenemase.

Dois isolados apresentaram resistência às penicilinas, ácido clavulânico e cefalosporinas, porém foram sensíveis à cefoxitina. Segundo classificação Bush-Jacoby-Medeiros, a resistência ao aztreonam indicaria que eles seriam classificados como grupo 2ber. Porém, ambos apresentaram sensibilidade a este antimicrobiano sendo, portanto classificados apenas como produtores de penicilinas e cefalosporinas. A detecção das betalactamases tem algumas limitações como a presença de outros mecanismos de resistência no mesmo microrganismo (alterações de permeabilidade, por exemplo) e produção simultânea de outras betalactamases, podendo ocorrer também a hiperprodução de uma betalactamase confundindo fenotipicamente a classificação do microrganismo (GRALHA, 2011). Dessa maneira, esses fatores podem interagir fazendo com que a leitura dos testes fenotípicos seja diferente das descritas para a classificação em grupos funcionais de Bush-Jacoby-Medeiros.

Após a realização da técnica de PCR dos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{ampC} e *bla*_{CTX-M} foram detectados em um total de 61,9% (26/42), 42,8% (18/42), 23,8% (10/42), 9,5% (4/42), isolados, respectivamente.

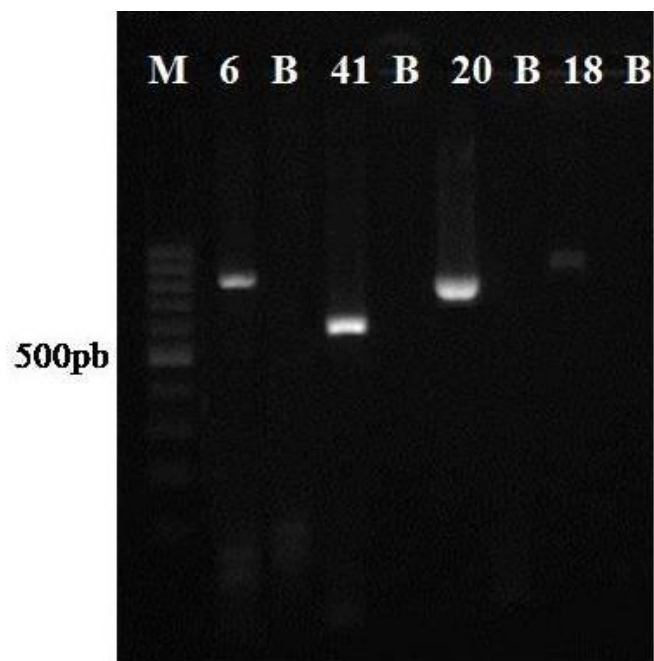


Figura 9. Perfil eletroforético dos gene *bla* testados em gel de agarose 1,5%. M= marcador 100 pb; B – branco da reação; 6 – isolado positivo para o gene *bla*_{TEM} (861pb); 41 – isolado positivo para o gene *bla*_{ampC} (634pb); 20 - isolado positivo para o gene *bla*_{CTX-M} (862pb); 18 – isolado positivo para o gene *bla*_{SHV} (931pb).

A tabela 5 apresenta a distribuição dos genes dentre as espécies avaliadas e fenotipicamente classificadas segundo a produção de betalactamase, considerando os locais de coleta.

Tabela 6 – Distribuição dos genes detectados, perfis fenotípicos, grupos fenotípicos de produção de betalactamases e a origem dos isolados (Continua).

Isolados	Espécie	Perfil fenotípico	Grupo fenotípico	Genes (<i>bla</i>)	Fazenda
1	<i>S. rubidae</i>	NOR NEO ³	1	CTX-M, SHV, TEM	C
2	<i>S. marcescens</i>	CIP ¹	1	CTX-M, SHV, TEM	B
3	<i>P. mirabilis</i>	GEN SUT ⁴	1e	-	C
4	<i>P. mirabilis</i>	CIP NOR NEO GEN SUT ⁴	1e	-	C
5	<i>E. coli</i>	- ⁴	2d	TEM, ampC	C
6	<i>P. mirabilis</i>	CIP NOR NEO GEN SUT ⁴	2b	SHV, TEM	C
7	<i>P. mirabilis</i>	CIP NOR NEO GEN SUT ⁴	2ber	SHV	C
8	<i>P. mirabilis</i>	CIP NOR NEO GEN SUT ²	1e	TEM	C
9	<i>P. mirabilis</i>	NEO ²	Pen+Cef	TEM	A
10	<i>E. coli</i>	CIP ⁴	2a	-	A
11	<i>E. coli</i>	- ³	2d	SHV, TEM, ampC	A
12	<i>C. freundii</i>	CIP NOR NEO GEN SUT ⁴	1	-	A
13	<i>P. mirabilis</i>	- ⁴	1e	TEM	A
14	<i>P. mirabilis</i>	CIP NOR NEO SUT ²	1	TEM	A

Tabela 6 – Distribuição dos genes detectados, perfis fenotípicos, grupos fenotípicos de produção de betalactamases e a origem dos isolados (Continuação).

Isolados	Espécie	Perfil fenotípico	Grupo fenotípico	Genes (<i>bla</i>)	Fazenda
15	<i>E. coli</i>	- ⁴	2d	-	A
16	<i>P. mirabilis</i>	SUT ²	2b	SHV, TEM	A
17	<i>P. mirabilis</i>	SUT ²	1e	SHV, TEM	A
18	<i>E. coli</i>	CIP NOR NEO GEN	1	SHV, TEM, ampC	A
19	<i>E. coli</i>	SUT ³ NEO ⁴	2a	ampC	A
20	<i>S. marcescens</i>	CIP NEO ³	2d	CTX-M, SHV, TEM	A
21	<i>E. coli</i>	- ³	2d	SHV, ampC	A
22	<i>E. coli</i>	CIP GEN SUT ⁴	2a	-	D
23	<i>P. mirabilis</i>	- ⁴	1e	-	D
24	<i>E. coli</i>	- ⁴	2a	-	D
25	<i>P. mirabilis</i>	CIP ²	1e	TEM	D
26	<i>P. mirabilis</i>	CIP NOR SUT ²	1	SHV, TEM	D
27	<i>E. coli</i>	CIP NOR SUT ²	1e	TEM, ampC	D
28	<i>P. mirabilis</i>	- ⁴	1e	SHV	D
29	<i>E. coli</i>	- ⁴	2d	-	D
30	<i>P. mirabilis</i>	CIP NOR NEO GEN SUT ²	1e	TEM	D
31	<i>C. freundii</i>	- ²	Pen+Cef	-	D
32	<i>E. coli</i>	CIP NEO ⁴	2br	SHV, ampC	D
33	<i>E. coli</i>	CIP NEO ⁴	2a	-	D
34	<i>P. mirabilis</i>	- ⁴	1	TEM	D
35	<i>E. coli</i>	CIP NOR NEO GEN SUT ²	1	SHV, TEM	D
36	<i>E. coli</i>	CIP ²	2d	SHV, TEM	D
37	<i>P. mirabilis</i>	NOR ²	2ber	TEM	D
38	<i>P. mirabilis</i>	- ²	1e	SHV, TEM, ampC	D
39	<i>E. aerogenes</i>	NEO ³	1	CTX-M, SHV, TEM	D
40	<i>E. coli</i>	CIP ⁴	2br	TEM	I
41	<i>E. coli</i>	CIP NOR NEO GEN SUT ³	2a	SHV, TEM, ampC	I
42	<i>E. coli</i>	CIP NEO ⁴	2d	TEM, ampC	I

Legenda: A- Seropédica, B – Rio Claro, C – Piraí, D – Passa Três, I – Rio Claro; Pen+Cef = penicilinase+cefalosporinase;¹- presença dos genes *aacC2* e *qnr*, ² - presença do gene *qnr*,³ - presença do gene *aacC2*, ⁴ - ausência dos genes. CIP – Ciprofloxacina, NOR – Norfloxacina, NEO – Neomicina, GEN – Gentamicina, SUT – Sulfametoxazol-Trimetoprim.

Dos isolados fenotipicamente resistentes a todos os antimicrobianos testados (quinolonas, aminoglicosídeos e sulfametoxazol-trimetoprim), 44,5% (4/9) foram isolados da fazenda C sendo todos pertencentes à espécie *P. mirabilis* (4,6,7 e 8). A antibioticoterapia nessa fazenda é realizada com penicilina e tetraciclina, não justificando a multirresistência pela pressão seletiva dessas classes. Porém, esses microrganismos são provenientes do ambiente e essa resistência seria então atribuída aos resíduos de antimicrobianos disseminados em água e solo. E dos isolados positivos para ambos os genes *aacC2* e *qnr*, 64,2% (9/14) foram isolados da Fazenda D, onde se faz uso de quinolonas e aminoglicosídeos no tratamento das vacas mastíticas.

Os quatro genes foram encontrados de forma variada nas fazendas avaliadas. Isso pode estar relacionado com o fato de que a disseminação de genes de resistência aos β -lactâmicos pode ser ampla na mesorregião do Rio de Janeiro, confirmando a facilidade dessa transmissão genética, seja por contaminação de ambiente (águas de um rio, por exemplo) ou por contato homem-animal, uma vez que muitos trabalhadores realizam o manejo dos animais em mais de uma fazenda, além de muitas vezes estas fazendas apresentarem o mesmo médico veterinário responsável.

A espécie *P. mirabilis* bla_{TEM} + pertencente ao grupo 1e (8,13,25,30) foi prevalente (4/42) e dentre estes, 75% (3/4) também apresentou o gene *qnr*. A espécie *E. coli* negativa para todos os genes pertencentes ao grupo 2a (10,22,24,33) também apresentou a mesma prevalência, sendo que dentre estas 75% (3/4) apresentaram resistência à ciprofloxacina. Como descrito na literatura, a resistência às quinolonas é encontrada em alta frequência em enterobactérias portadoras dos genes *bla*, sugerindo que esses genes de resistência estão contidos em um mesmo plasmídeo (WANG et al., 2004).

O segundo grupo prevalente foi *P. mirabilis* (3,4,23) pertencentes ao grupo 1e e negativo para todos os genes avaliados, inclusive os de resistência a quinolonas e aminoglicosídeos. Porém, destes 67% (2/3) apresentou resistência a pelo menos gentamicina e sulfametoxazol+trimetoprim. Esta resistência pode ser explicada pela ausência ou modificação em porinas. Villar et al. (1997) descreveu isolados bacterianos pertencentes às enterobactérias que possuíam tal característica. Recentemente, Hernández et al. (2010), estudou a relação entre as alterações na expressão de porinas e a diminuição da sensibilidade a β -lactâmicos. Esses autores encontraram isolados deficientes em porinas menos sensíveis a β -lactâmicos independentemente da produção de betalactamases e, aqueles isolados produtores de betalactamases eram também resistentes a carbapenemas. O efeito da perda de porinas foi menos notável quando se utilizou outra classe de antimicrobiano. Dessa forma, tal explicação é pertinente, visto a multirresistência fenotípica observada sem correlação com os genes avaliados.

Um total de 9,5% apresentou 3 genes (bla_{CTX-M} , bla_{SHV} , bla_{TEM}) sendo representada pelas espécies: *S. rubidae* (25% - 1/4), *S. marcescens* (50% - 2/4), *E. aerogenes* (25% - 1/4). Marcano et al. (2011), em estudo realizado na Venezuela, também encontrou os três genes nessas espécies, além disso é comum a ocorrência desses genes em várias combinações, em enterobactérias (SHAHID et al., 2011). A ocorrência de mais de um tipo de gene em um mesmo isolado é bastante comum, sendo a associação mais frequente bla_{SHV} e bla_{TEM} (OLIVEIRA et al., 2009).

Apesar dos genes *bla* serem frequentemente descritos no gênero *Citrobacter*, no presente estudo isso não foi observado, uma vez que de todos isolados negativos para os genes, 50% (2/4) era pertencente ao gênero *Citrobacter* (BRADFORD, 2001; SHAHID, 2010; SILVA & LINCOPAN, 2012). Porém, a pequena quantidade de isolados pertencentes a este gênero não nos permite generalizar o resultado encontrado.

Do total de 6 isolados classificados como grupo 2 (2b, 2br, 2ber) cujos exemplos mais comuns de enzimas detectadas são TEM, SHV e recentemente CTX-M, os genes bla_{SHV} e bla_{TEM} foram encontrados em 65% (4/6) corroborando com o fato de que esses genes tem sido considerados como os mais disseminados (GONÇALVEZ, 2010). Dentre os isolados não classificados segundo Bush-Jacoby-Medeiros, apenas um apresentou um gene, o bla_{TEM} .

Isolados classificados como grupo 2 subgrupos 2a (n=6) e 2d (n=8), cujos exemplos de enzimas mais comuns são PC₁ e OXA, também apresentaram os genes bla_{SHV} e bla_{TEM} mas provavelmente não expressaram essas características fenotipicamente. Essa explicação também parece ser pertinente para os isolados classificados como 2a, 2br, 2d positivos para o

gene *bla_{ampC}*. Especificamente em relação aos isolados do grupo 2d, pode haver também a presença do gene *bla_{OXA}* que não foi avaliado no presente estudo.

Apenas 15% (3/20) dos isolados pertencentes ao grupo 1 (1 e 1e) apresentaram o gene *bla_{ampC}*. A resistência à cefoxitina em isolados negativos à detecção desse gene pode ocorrer devido a uma diminuição de permeabilidade por porinas (THOMSON, 2001; DIAS et al., 2008). Este foi apenas um estudo preliminar e em etapas futuras será realizada a pesquisa de genes para detecção de outras enzimas do grupo 1, como a CMY-2, DHA-1, bem como a determinação da origem destes através da técnica de transformação bacteriana, segundo metodologia proposta por Inoue et al. (1990) (PÉREZ-PÉREZ. & HANSON, 2002; PHILIPPON et al., 2002).

Em trabalho desenvolvido em nosso laboratório por Melo (2013), foi constatado que a sequência do gene *mecA* de *Staphylococcus* de origem bovina apresentou diferenças significativas da sequência dos de origem humana, equino, roedor, cão e gato. Indicando que se deve investir na busca por homólogos do gene *mecA* para incrementar a detecção gênica desta resistência e que a utilização de *primers* elaborados para sua detecção em isolados origem bovina deve ser reconsiderada. O mesmo pode se aplicar para os nossos estudos com enterobactérias produtoras de betalactamases do grupo 1 negativas para o gene *bla_{ampC}*. Em etapas futuras, serão realizadas provas fenotípicas e genotípicas para melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na produção cromossômica e plasmidial desta enzima. Pois acreditamos que as enterobactérias resistentes à cefoxitina, porém negativas para o gene *bla_{ampC}*, podem apresentar outros genes relacionados a esta resistência ou outros mecanismos de resistência a este β -lactâmico, como diminuição de permeabilidade de membrana. Uma hipótese pertinente também é a existência de uma sequência de gene específica de amostras animais, cujos *primers* desenhados para isolados humanos não anelam.

Além disso, a incidência de microrganismos produtores de betalactamases de amplo espectro é difícil de ser determinada devido a diferenças existentes entre os métodos de detecção e interpretação utilizados por cada um dos países e instituições de saúde envolvidas além de diferirem muito em relação à notificação do aparecimento de tal fenômeno. Especificamente em relação às AmpC, o CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) não oferece nenhuma padronização de testes para detectar isolados produtores. Por estes motivos, a sua ocorrência é mundialmente subestimada e poucos dados são disponíveis na literatura no que tange ao controle de cepas produtoras em animais, especificamente em relação à mastite bovina (STEWART et al., 2001).

A elevada variabilidade fenogenotípica detectada nas enterobactérias isoladas de leite mastítico no presente estudo indica mecanismos múltiplos de resistência antimicrobiana em um mesmo isolado, o que é preocupante tendo em vista a disseminação da resistência por meio de incorporação de DNA livre presente no ambiente de produção leiteira e de elementos genéticos móveis, de forma intra ou interespecífica, determinando um impacto clínico e epidemiológico para a medicina veterinária e humana.

6. CONCLUSÕES

- Do total de 381 amostras de leite provenientes de vacas mastíticas, 356 bactérias foram isoladas, sendo observada a presença de enterobactérias em 11% (n=42).
- As enterobactérias predominantes nas amostras de leite avaliadas foram o *Proteus mirabilis* (45% - 19/42) e *Escherichia coli* (40% - 17/42) demonstrando a importância da higiene do ambiente e da qualidade da água utilizada na cadeia leiteira.
- Em 78% dos casos (33/42) o isolamento das enterobactérias foi concomitante com outros grupos bacterianos, indicando uma infecção mista.
- Foi detectado 52,4% de resistência à ciprofloxacina, 42,9% à sulfametoxazol-trimetoprim, 42,9% à neomicina, 33,3% à norfloxacina e 26,2% de resistência à gentamicina.
- Constatou-se uma elevada variabilidade no perfil fenotípico e a multirresistência foi detectada em 97,6% dos isolados avaliados, comprovando a dificuldade nas terapias utilizadas no tratamento das mastites.
- Os genes de resistência aos aminoglicosídeos (*aacC2*) e a quinolonas (*qnr*) foram detectados em 25% e 66,7% de isolados resistentes a estes antimicrobianos, respectivamente. Dessa forma, é importante que seja feito um monitoramento desses genes uma vez que podem estar contidos em um mesmo plasmídeo e podem ocorrer juntamente com genes de resistência aos β -lactâmicos.
- Todos os isolados produziram pelo menos um tipo de betalactamase, mesmo não sendo possível classificá-los pela inexistência de testes fenotípicos confirmatórios para alguns grupos.
- O grupo 1 foi predominante, sendo detectado em 47,6% (20/42) das espécies produtoras.
- O teste de disco aproximação revelou que 30% (6/20) e 70% (14/20) das betalactamases do grupo 1 foram classificadas como sendo do tipo induzível e não induzível, respectivamente.
- Nenhum isolado apresentou o perfil fenotípico para ESBL (2be) nem produziu carbapenemase.
- O Teste de Extrato Tridimensional confirmou a negatividade da produção de ESBL, porém revelou ser pouco sensível (25% de sensibilidade) na detecção de AmpC.
- Os genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{ampC} e *bla*_{CTX-M} foram detectados em um total de 61,9% (26/42), 42,8% (18/42), 23,8% (10/42), 9,5% (4/42), isolados, respectivamente.
- Os genes foram encontrados de forma variada nas fazendas visitadas.

- O gene *bla_{ampC}* foi encontrado em 15% (3/20) dos isolados caracterizados como produtores das enzimas do grupo 1.
- Um total 65% dos isolados classificados como grupo 2 apresentaram os genes *bla_{TEM}* e *bla_{SHV}*.
- A espécie *P. mirabilis* *bla_{TEM}* + pertencente ao grupo 1e e a espécie *E. coli* negativa para todos os genes pertencente ao grupo 2a foram prevalentes.
- A ausência ou modificação de porinas pode ser um mecanismo de resistência presente em alguns isolados estudados contribuindo para a resistência antimicrobiana.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR, M. A. P. Caracterização molecular da resistência aos carbapenêmicos em Enterobactérias isoladas em hospitais brasileiros. Dissertação (Farmácia). Universidade de São Paulo. 2009.

AMBLER, R. P. The structure of beta-lactamases. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological, v.289, n.1036, p. 321-331. 1980.

ANDRADE, U. V. C.; HARTMANN, W.; MASSON, M. L. Isolamento microbiológico, contagem de células somáticas e contagem bacteriana total em amostras de leite. ARS Veterinária, v.25, n.3, p.129-135. 2009.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alerta N° 01/2011. Disponível em: <<http://www.sesa.pr.gov.br/arquivos/File/AlertaKPCNDM281111.pdf>> Acessado em 20/junho/2013.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Nota Técnica N° 01/2013. Medidas de Prevenção e Controle de Infecções por Enterobactérias Multirresistentes. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/ea4d4c004f4ec3b98925d9d785749fbd/Microsoft+Word++NOTA+T%C3%89CNICA+ENTEROBACTERIAS+17+04+2013\(1\).pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/ea4d4c004f4ec3b98925d9d785749fbd/Microsoft+Word++NOTA+T%C3%89CNICA+ENTEROBACTERIAS+17+04+2013(1).pdf?MOD=AJPERES)> Acessado em 20/06/13.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Comunicação de Risco N° 001/2013 - GVIMS/GGTES-ANVISA. Circulação de micro-organismos com mecanismo de resistência denominado "New Delhi Metalobetalactamase" ou NDM no Brasil. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/b659c2004f8f0958835ff79a71dcc661/Comunica%C3%A7%C3%A3o+de+Risco+n+1+2013+sobre+NDM1%5B1%5D.pdf?MOD=AJPERES>> Acessado em 20/06/13.

BAPTISTA, M. G. de F. Mecanismos de Resistência aos Antimicrobianos. Dissertação (Ciências Farmacêuticas). Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia. Lisboa, 2013.

BARTHÉLÉMY, M.; PÉDUZZI, J.; BERNARD, H.; TANCRÈDE, C.; LABIA, R. Close amino acid sequence relationship between the new plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase MEN-1 and chromosomally encoded enzymes of *Klebsiella oxytoca*. Biochimica et Biophysica Acta, v. 1122, n. 1. p.15-22. 1992.

BAUERNFEIND, A.; CHONG, Y.; SCWEIGHART, S. Extended broad spectrum beta-lactamase in *Klebsiella pneumonia* including resistance to cephamycins. Infection, v.17, n.5, p. 316-321. 1989.

BAUERNFEIND, A.; CASELLAS, J. M.; GOLDBERG, M.; HOLLEY, M.; JUNGWIRTH, R.; MANGOLD, P.; ROHNISCH, T.; SCHWEIGHART, S.; WILHELM, R. A new plasmidic cefotaximase from patients infected with *Salmonella typhimurium*. Infection, v. 20, n. 3, p.158-63. 1992.

BAUERNFEIND, A.; STEPLINGER, I.; JUNGWIRTH, R.; ERNST, S.; CASELLAS, J. M. Sequences of beta-lactamase genes encoding CTX-M-1 (MEN-1) and CTX-M-2 and relationship of their amino acid sequences with those of other beta-lactamases. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v.40, n. 2, p.509-513. 1996.

BENGTSSON, B.; UNNERSTAD, H. E.; EKMAN, T.; ARTURSSON, K.; NILSSON-ÖST, M.; WALLER, K. P. Antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of acute clinical mastitis in dairy cows. Veterinary Microbiology, n.136, v.1-2, p.142-149. 2009.

β -lactâmicos Classification and Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant Enzymes. Disponível em <<http://www.lahey.org/Studies>> Acessado em abril de 2013.

BOERLIN, P.; WHITE, D. G. Resistência antimicrobiana e sua epidemiologia. In: GIGUÈRE, S.; PRECOTT, J. F.; BAGGOT, J. D.; WALKER, R. D.; DOWLING, P.M. (Org) Terapia antimicrobiana em medicina veterinária. São Paulo: Roca, 2010. p.27-34.

BONNET, R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v.48, n.1 ,p. 1-14. 2004.

BOU, G.; CARTELLE, M.; TOMAS, M.; CANLE, D.; MOLINA, F.; MOURE, R.; EIROS, J.M.; GUERRERO, A. Identification and broad dissemination of the CTX-M-14 beta-lactamase in different *Escherichia coli* strains in the northwest area of Spain. Journal of Clinical Microbiology, v. 40, n. 11, p. 4030-4036. 2002.

BRADFORD, P. A.; URBAN, C.; MARIANO, N.; PROJAN, S.J.; RAHAL, J. J.; BUSH, K. Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC beta-lactamase, and the Loss of an outer membrane protein. Antimicrobials Agents and Chemotherapy, v.41, n.3, p.563-569. 1997.

BRADFORD, P. A. Extended spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. Antimicrobial Agents Chemotherapy, v.14, n.4, p. 933-951. 2001.

BRASIL. 1981. RIISPOA. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/MercadoInterno/Requisitos/RegulamentoInspecaoIndustrial.pdf> Acesso em 25/julho/2013.

BRASIL. 2002. Instrução Normativa 51. Disponível em <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=8932>> Acessado em 25/julho/2013.

BRASIL. 2007. Resistência microbiana – mecanismos e impacto clínico. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo3/mecanismos.htm> Acessado em 25/03/2013.

BRASIL. 2012. Mastite bovina: controle e prevenção. Boletim Técnico, n.93, p.1-30.

BRITO, J. R. F.; BRITO, M. A. V. P.; ARCURI, E. F. Controle da mastite ou como reduzir a contagem de células somáticas do rebanho bovino leiteiro. Embrapa Gado de Leite. 2009. Disponível em <www.cnpqi.embrapa.br/lab/controlarmastite.doc> Acessado em 29/julho/2013.

BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v.39, n.6, p.1211-1233. 1995.

BUSH, K. New beta-lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. Clinical Infectious Diseases, v.32, n.7, p.1085-1089. 2001.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of β -lactamases. Antimicrob Agents Chemother, v. 54, n. 3, p. 969-976. 2010.

CARNEIRO, D. M. V. F.; DOMINGOS, P. F.; VAZ, A.K. Imunidade inata da glândula mamária bovina: resposta à infecção. Ciência Rural, v.39, n.6, p.1934-1943. 2009.

CANTÓN, R. & COQUE, T. M. The CTX-M beta-lactamase pandemic. Current Opinion in Microbiology, v.9, n.5, p.466-476. 2006.

Centro de Vigilância Epidemiológica/ CVE/SES-SP. Surtos de doenças transmitidas por água e alimentos. Disponível em <ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/hidrica/doc/surtodta_pergresp.pdf> Acessado em 29/julho/2013.

CHAPMAN, P. A.; ELLINN, M.; ASHTON, R.; SHAFIQUE, W. Comparison of culture, PCR and immunoassays for detecting *Escherichia coli* O157 following enrichment culture and immunomagnetic separation performed on naturally contaminated raw meat products. International Journal of Food Microbiology, v.68, n. 1-2, p.11-20. 2001.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard – Third Edition. CLSI document M31-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2008.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informal Supplement. CLSI document M100-S22. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2012.

COENTÃO, C. M.; SOUZA, G. N.; BRITO, J. R. F.; BRITO, M. A. V. P.; LILENBAUM, W. Fatores de risco para mastite subclínica em vacas leiteiras. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.60, n.2, p.283-288. 2008.

COQUE, T. M.; BAQUERO, F.; CANTON, R. Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. Euro Surveill, v.13, n.47, p.1-11. 2008.

COSTA, J. C. M. Influência de antimicrobianos, concentrações de glicose e variações de pH na produção de biofilmes por isolados de *Escherichia coli* obtidos de mastite bovina. Dissertação (Medicina Veterinária). Universidade Federal de Viçosa. 2011.

CROWLEY, B.; BENEDÍ, V.J.; DOMÉNECH-SÁNCHEZ, A. Expression of SHV-2 beta-lactamases and of reduced amounts of OmpK36 porin in *Klebsiella pneumoniae* results in increased resistance to cephalosporins and carbapenemicos. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v.46, n.11, p.3679-3682. 2002.

DAHMEN, S.; MÉTAYER, V.; GAY, E.; MADEC, J. Y.; HAENNI, M. Characterization of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-carrying plasmids and clones of Enterobacteriaceae causing cattle mastitis in France. Veterinary Microbiology, v.162, n.2-4, p.793-799. 2013.

DIAS, R. C. S.; BORGES-NETO, A. A.; FERRAIUOLI, G. I. D.; de-OLIVEIRA, M. P.; RILEY, L. W.; MOREIRA, B. M. Prevalence of AmpC and other beta-lactamases in enterobacteria at a large urban university hospital in Brazil. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, v. 60, n.1, p.79-87. 2008.

DIAS, D. J. A. Estudo dos principais mecanismos de resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos em bactérias patogênicas de Gram negativo. Dissertação (Genética Molecular e Biomedicina). Universidade Nova de Lisboa. 2009.

DIAS, N. L. Identificação de *Staphylococcus aureus* avaliação do seu potencial enterotoxigênico e resistência a meticilina pela técnica de PCR em amostras de leite da microrregião de Sete Lagoas-MG. Dissertação (Ciência Animal). 2010.

DIAS, A.; OLIVEIRA, G.; OLIVEIRA, H.; MARQUES, M.; RODRIGUES, F. Bacilos Gram-negativos produtores de beta-lactamases de espectro expandido num hospital pediátrico. Acta Médica Portuguesa, v.24, n. S2, p.197-206. 2011.

DIENSTMANN, R.; PICOLI, S. U.; MEYER, G.; SCHENKEL, T.; STEYER, J. Avaliação fenotípica da enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) em Enterobacteriaceae de ambiente hospitalar. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, v.46, n.1, p.23-27. 2010.

ELLIOTT, E.; BRINK, A.; VAN GREUNE, J.; ELS, Z.; WOODFORD, N.; TURTON, J.; WARNER, M; LIVERMORE, D. In-vivo development of ertapenem resistance in a case of pneumonia caused by *Klebsiella pneumoniae* with an extended-spectrum β -lactamases. Clinical Infectious Diseases, v.42, n.11, p.e95-e98. 2006.

ERSKINE, R.; BARLETT, P. C.; VAN LENTE, J. L.; PHIPPS, C. R. Efficacy of systemic ceftiofur as a therapy for severe clinical mastitis in dairy cattle. Journal of Dairy Science, v.85, n.10, p.2571-2575. 2002.

FLUIT, A. C; VISSER, M. R.; SCHMITZ, F. J. Molecular detection of antimicrobial resistance. Clinical Microbiology Reviews, n.4, v.14, p. 836-871. 2001.

FIOCRUZ. Manual de Procedimentos para o Diagnóstico Laboratorial de *Salmonella* spp. Manual Técnico. 2006.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. Qualidade do leite e controle da mastite. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. 175p.

FREITAS, M. F. L.; PINHEIRO JÚNIOR, J. W.; STAMFORD, T. L. M.; RABELO, S. S. de A.; SILVA, D. R. da; SILVEIRA FILHO, V. M. da; SANTOS, F. G. B.; SENA, M. J. de; MOTA, R. A. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus coagulase* positivos isolados de leite de vacas com mastite no Agreste do Estado de Pernambuco. Arquivos do Instituto Biológico, v.72, n.2, p.171-177, 2005.

FRERE, J. M. Beta-lactamase and bacterial resistance to antibiotics. Molecular Microbiology, v.16, p.385-395, 1995.

FUCHS, F. D. Princípios gerais do uso de antimicrobianos. In: FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. Farmacologia clínica: fundamentos da terapêutica racional. 3ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p.393-399.

GALIMAND, M.; COURVALIN, P.; LAMBERT, T. Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in Enterobacteriaceae due to 16S rRNA methylation. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v.47, n.8, p.2565-2571. 2003.

GAMA, B. A. Análise da resistência antimicrobiana e de genes de virulência de *Enterococcus* spp. Dissertação (Ciências). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2008.

GARCIA, A. Mastitis contagiosa vs. ambiental. 2004. Disponível em <http://pubstorage.sdstate.edu/AgBio_Publications/articles/ExEx4028S.pdf> Acessado em 06/março/2013

GESER, N. ; STEPHAN, R.; HÄCHLER, H. Occurrence and characteristics of extended spectrum β -lactamase (ESBL) producing Enterobacteriaceae in food producing animals, minced meat and raw milk. BMC Veterinary Research, v.8, n.21. 2012.

GONÇALVES, T. M. P. Caracterização de genes que codificam beta-lactamases de espectro alargado em *Enterobacteriaceae* de origem hospitalar. Monografia (Ciências Farmacêuticas). Universidade Fernando Pessoa. 2010.

GONZALEZ, L. M.; PEREZ-DIAZ, J. C.; AYALA, J.; CASELLAS, J.M; MARTINEZ-BELTRAN, J.; BUSH, K.; BAQUERO, F. Gene sequence and biochemical characterization of FOX-1 from *Klebsiella pneumoniae*, a new AmpC-type plasmid-mediated beta-lactamase with two molecular variants. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v.38, n.9, p.2150-2157. 1994.

GRALHA, R. E. F. Métodos de pesquisa de beta-lactamases em amostras clínicas – estudo de revisão. Dissertação (Ciências Farmacêuticas). Universidade Fernando Pessoa. 2011.

GUPTA, E.; MOHANTY, S.; SOOD, S.; DHAWAN, B.; DAS, B. K.; KAPIL, A..Emerging resistance to carbapenems in a tertiary care hospital in north India. Indian Journal of Medical Research, v.124, n.1, p.95-98. 2006.

HAWKEY, P.M. Mechanisms of quinolone action and microbial response. Journal of Antimicrobial and Chemotherapy, v.51, s1, p. 29–35.2003.

HENRIQUE, M. 2009. Tratamento da mastite – uso de outras medidas que não antibióticos. 2009. Disponível em <<http://marcosveterinario.blogspot.com.br/2009/05/tratamento-da-mastite-uso-de-outras.html>> Acessado em 29/julho/2013.

HERNÁNDEZ, J. R.; CONEJO, M. C.; PASCUAL, A. Actividad comparativa del ertapenem frente a *Klebsiella pneumoniae* productor de betalactamasas de espectro extendido o betalactamasas de AmpC plasmídicas: efecto inóculo y papel de la pérdida de porinas. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, v.28, n.1, p.27-30. 2010.

HIRSCH, E. B. & TAM, V. H. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug resistant infection. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v.65, n.6, p.1119-1125. 2010.

HOE, F. Tendências da resistência aos antimicrobianos no tratamento de mastite (Artigos técnicos). 2004. Disponível em <[HTTP://reagro.com.br/plus/modulos/noticias/ler.pho?cdnoticia=709](http://reagro.com.br/plus/modulos/noticias/ler.pho?cdnoticia=709)> Acessado em 24/07/2013.

HOFF, R. Análise de resíduos de sulfonamidas em alimentos por eletroforese capilar e espectrometria de massas. Dissertação (Biologia Celular e Molecular). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2008.

HO, P. L.; WONG, R. C.; LO, S. W.; CHOW, K. H.; WONG, S. S.; QUE, T. L. Genetic identity of aminoglycoside-resistance genes in *Escherichia coli* isolates from human and animal sources. Journal of Medical Microbiology, v.59, n.6, p.702-707. 2010.

HOGAN, J. & SMITH, K. L. Coliform mastitis. Veterinary Research, v.34, n.5, p. 507–519, 2003.

HUOVINEN, P.; SUNDSTRÖM, L.; SWEDBERG, G.; SKÖLD, O. Trimethoprim and Sulfonamide Resistance. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v.39, n.2, p.279-289. 1995.

HUXLEY, J. Clinical forum- *E.coli* mastitis. Cattle Practice, v. 9, p.1-7. 2004.

HUMENIUK, C.; ARLET, G.; GAUTIER, V.; GRIMONT, P.; LABIA, R.; PHILIPPON, A. Beta-lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v.46, n.9, p.3045-3049. 2002.

INOUE, H.; NOJIMA H.; OKAYAMA H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. Gene, v. 96, n.1, p. 23028. 1990.

JACOBY, G. A.; CHOW, N.; WAITES, K. B. Prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v.47, n.2, p.559-562. 2003.

JACOBY, G. A. & MUNOZ-PRICE, M. The new beta-lactamases. The New England Journal of Medicine, v. 352, p.380-391. 2005.

JARLIER, V.; NICOLAS, M.H.; FOURNIER, G.; PHILIPPON, A. Extended broadspectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. Reviews of Infectious Diseases, v.10, n.4, p.867–878.1988.

KACZMAREK, F. M.; DIB-HAJJ, F.; SHANG, W.; GOOTZ, T. D. High-level carbapenem resistance in a *Klebsiella pneumonia* clinical isolate is due to the combination of bla(ACT-1) beta-lactamase production, porin OmpK35/36 insertional inactivation, and down-regulation of the phosphate transport porin phoE. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, n.50, n.10, p.3396-3406. 2006.

KAIPAINEN, T.; POHJANVIRTA, T.; SHPIGEL, N. Y. et al.. Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from bovine clinical mastitis. Veterinary Microbiology, v.85, p.37-46, 2002.

KAOA, C.; LIUA, M.; LINB, C.; HUANGA, Y.; LIUA, P.; CHANGB, C.; SHIA, Z. Antimicrobial susceptibility and multiplex PCR screening of *AmpC* genes from isolates of *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, and *Serratia marcescens*. Journal of Microbiology, Immunology and Infection, v.43, n.3, p.180-187. 2010.

KASMAR, A. G. & HOOPER, D. Farmacologia das Infecções Bacterianas: síntese da parede celular. In: GOLAN, D. E. (Org) Princípios de Farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. 2ed. p. 562- 578.

KAYE, K. S.; FRAIMOW, H. S. ABRUTYN, E. Pathogens resistant to antimicrobial agents – Epidemiology, molecular mechanisms and clinical management. Infections Diseases Clinical of North America, v. 14, p. 293-317, 2000.

KIJIMA-TANAKA, M.; ISHIHARA, K.; MORIOKA, A.; KOJIMA, A.; OHZONO, T.; OGIKUBO, K.; TAKAHASHI, T.; TAMURA, Y. A national surveillance of antimicrobial resistance in *E. coli* isolated from food-producing animals in Japan. Journal of Antimicrobiology and Chemotherapy, v.51, n.2, p.447-451. 2003.

KNOX, J. R. Extended-spectrum and inhibitor-resistant TEM-type betalactamases: mutations, specificity, and three-dimensional structure. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v.39, n. 12, p.2593-2601. 1995.

KNOTHE, H.; SHAH, P.; KRUMERY, V.; ANTAL, M.; MITSUHASHI, S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumonia* and *Serratia marcescens*. Infection, v.11, n.6, p.313-317.1983.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN Jr, W. C. Diagnóstico Microbiológico, 5.ed. Rio de Janeiro: Editora MEDS, 2008.

KOTRA, L. P.; HADDAD, J.; MOBASHERY, S. Minireview – Aminoglycosides: Perspectives on Mechanisms of Action and Resistance and Strategies to Counter Resistance. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 44, n. 12, p. 3249-3256. 2000.

- LANG, P.; LEFÉBURE, T.; WANG, W.; ZADOKS, R. N.; SCHUKKEN, Y.; STANHOPE, M. J. Gene content differences across strains of *Streptococcus uberis* identified using oligonucleotide microarray comparative genomic hybridization. Infection, Genetics and Evolution, v. 9, n.2, p.179–188. 2009
- LANGONI, H.; LAURINO, F.; FACCIOLI, P. Y.; SILVA, A. V.; MENOZZI, B. D. Cultivo microbiológico e a sensibilidade no isolamento de patógenos nas mastites bovinas. Veterinária e Zootecnia, v.16, n.4, p.708-715, 2009.
- LANGONI, H.; ARAÚJO, W. N. de; SILVA, A. V. da; SOUZA, L.C. de Tratamento da mastite bovina com amoxicilina e enrofloxacin bem como a sua associação. Arquivos do Instituto Biológico, v.67, n.2, p.177-180, 2000.
- LASCOLS, C.; HACKEL, M.; MARSHALL, S. H.; HUJER, A. M.; BOUCHILLON, S.; BADAL, R.; HOBAN, D.; BONOMO, R. A. Increasing prevalence and dissemination of NDM-1 metallo-beta-lactamase in India: data from the SMART study (2009). Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v.66, p.1992-1997. 2011.
- LEE, S. & JEONG, S. Nomenclature of GES-type extended-spectrum beta-lactamases. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 49, n.5 , p.2148-2150. 2005.
- LI, XZ; MEHROTRA, M.; GHIMIRE, S.; ADEWOYE, L. Review: β -lactam resistance and β -lactamases in bacteria of animal origin. Veterinary Microbiology, v.121, n., p.197-214. 2007.
- LIVERMORE, D. M. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. Clinical Microbiology Reviews, n.8, v.4, p.557-84. 1995.
- LIVERMORE, D. M. Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. Clinical Infectious Diseases, v. 36, s.1, p. 11-23. 2003.
- LIVERMORE, D. M. & WOODFORD, N. The beta-lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. Trends in Microbiology, v.14 , n.9, p.412-420. 2006.
- LOCATELLI, C.; CARONTE, I.; SCACCABAROZZI, L.; MIGLIAVACCA, R.; PAGANI, L.; MORONI, P. Extended-spectrum beta-lactamase production in *E. coli* strains isolated from clinical bovine mastitis. Veterinary Research Communications, v.33, n., p.S141-S144. 2009.
- MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. Microbiologia de Brock. 12.ed. Porto Alegre: ArtMed, 2010.
- MALLET, T.; CRISTINA, A. Quantificação e identificação de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Aeromonas hydrophila* de águas utilizadas em pequenas propriedades leiteiras. Anais do XXIV Congresso Nacional de Laticínios. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, v.62, n.357, p.394-400. 2007.

MARCANO, D.; JESÚS, A.; HERNÁNDEZ, L.; TORRES, L. Frecuencia de enzimas asociadas a sensibilidad disminuida a betalactámicos en aislados de enterobacterias, Caracas, Venezuela. Revista Panamericana de Salud Pública, v.30, n.6, p.529-534. 2011.

MARTÍNEZ ROJAS, D. D. D. Betalactamasas tipo AmpC: generalidades y métodos para detección fenotípica. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología, v.29, n.2, p.78-83. 2009.

MEIRELES, M. A. O. M. Uso de antimicrobianos e resistência bacteriana: aspectos socioeconômicos e comportamentais e seu impacto clínico e ecológico. Monografia (Especialista em Microbiologia). Universidade Federal de Minas Gerais. 2008.

MELO, D.A. Implicações da utilização de parâmetros humanos na detecção do gene *Meca* em *Staphylococcus* spp. isolados de mastite bovina e seus impactos na predição da resistência aos β -lactâmicos em ambientes de produção leiteira. Dissertação (Ciências Veterinárias). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 2013.

MENDONÇA, N.; MANAGEIRO, V.; ROBIN, F.; SALGADO, M. J.; FERREIRA, E.; CANICA, M.; BONNET, R. The Lys234Arg substitution in the enzyme SHV-72 is a determinant for resistance to clavulanic acid inhibition. Antimicrobial Agents of Chemotherapy, v.54, n. 5, p.1806-1811. 2008.

MINARINI, L. A. R.; GALES, A. C.; PALAZZO, I. C. V.; DARINI, A. L. C. Prevalence of community-occurring extended spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in Brazil. Current Microbiology, v. 54, p. 335–341. 2007.

MINARINI, L. A. R. Estudo dos mecanismos de resistência às quinolonas em enterobactérias isoladas de alguns estados brasileiros. Tese (Biociências Aplicadas à Farmácia). Universidade de São Paulo. 2008.

MINGEOT-LECLECQ, M; GLUPCZYNSKI, Y.; TULKENS, P. M. Minireview – Aminoglycosides: Activity and Resistance. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 43, n.4, p.727-737. 1999.

MIGUEL, P. R. R. Incidência de contaminação no processo de obtenção do leite e suscetibilidade a agentes antimicrobianos. Dissertação (Zootecnia). Universidade Estadual do Oeste do Paraná. 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Vigilância em Saúde Ambiental. Portaria MS n.º 518/2004 / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação Geral de Vigilância em Saúde Ambiental – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2005.

MOREIRA, M. A. S.; FERREIRA, A. B.; TRINDADE, T. F. S. L.; REIS, A. L. O.; MORAES, C. A. Resistência a antimicrobianos dependente do sistema de efluxo multidrogas em *Escherichia coli* isoladas de leite mastítico. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.60, n.6, p.1307-1314, 2008.

MOTA, R. A.; SILVA, K. P. C. da; FREITAS, M. F. L. de; PORTO, W. J. N.; SILVA, L. B. G. da Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, v. 42, n. 6, p. 465-470. 2005.

NADER FILHO, A.; FERREIRA, L. M.; do AMARAL, L. A.; ROSSI Jr, O. D.; OLIVEIRA, R. P. Sensibilidade antimicrobiana dos *Staphylococcus aureus* isolados no leite de vacas com mastite. Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo, v.74, n.1, p.1-4. 2007.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL RESEARCH COMMITTEE REPORT. Bovine Mastitis Pathogens and Trends in Resistance to Antibacterial Drugs. In: NMC Annual Meeting Proceedings, 2004. p. 400- 414.

NETTO, D. P.; LOPES, M.O.; OLIVEIRA, M. C. S.; NUNES, M. P.; MACHINSKI Jr., M.; BOSQUIROLI, S. L.; BENATTO, A.; BENINI, A.; BOMBARDELLI, A. L. C.; FILHO, D. V. et al. Levantamento dos principais fármacos utilizados no rebanho leiteiro do Estado do Paraná. Animal Sciences, v.27, n.1, p.145-151. 2005.

NGUYEN, T. V; Le VAN, P.; Le HUY, C.; GIA, K. N.; WEINTRAUB, A. Detection and Characterization of Diarrheagenic *Escherichia coli* from Young Children in Hanoi, Vietnam. Journal of Clinical Microbiology, v.43, n.2, p.755-760. 2005.

NOGUEIRA, K. S. Prevalência e caracterização molecular de beta-lactamases de espectro ampliado (ESBL) em enterobactérias isoladas no Hospital de Clínicas de Curitiba. Tese (Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Paraná. 2011.

NORDMANN, P. & POIREL, L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. Clinical Microbiology and Infection, v.8, n.6, p.321-331. 2002.

O'HARA C, M. Manual and automated instrumentation for identification of Enterobacteriaceae and other aerobic gram-negative bacilli. Clinical Microbiology Reviews, v. 18, n. 1, p. 147-62, 2005.

OLIVEIRA, K. R. P. β -lactamases na família Enterobacteriaceae: métodos de detecção e prevalência. Dissertação (Ciências Médicas). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2008.

OLIVEIRA, C. F; DAL-FORNO, N. L. F.; ALVES, I. A.; HORTA, J. A.; RIEGER, A.; ALVES, S. H. Prevalência das famílias TEM, SHV e CTX-M de β -lactamases de espectro estendido em *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp no Hospital Universitário de Santa Maria, Estado do Rio Grande do Sul. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.42, n.5, p. 556-560. 2009.

OLIVEIRA, J. M. B.; VANDEERLEI, D. R.; BRANDESPIM, D. F.; MOTA, R. A.; JÚNIOR, J. W. P. Análise do perfil de sensibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus* spp. isolados de vacas com mastite subclínica do agreste do Estado de Pernambuco. Veterinária e Zootecnia, v.18, n.4 s.3. 2011.

OLSON, A. B.; SILVERMAN, M.;BOYD, D. A.; McGEER, A.; WILLEY, B. M.; PONG-PORTER, V.; DANEMAN, N.; MULVEY, M. R. Identification of a progenitor of the CTX-M-9 group of extended-spectrum beta-lactamases from *Kluyvera georgiana* isolated in Guyana. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v.49, n.5, p.2112-2115. 2005.

PALASUBRAMANIAM, S.; KARUNAKARAN, R.; GIN, G. G.; MUNIANDY, S.; PARASAKTHI, N. Imipenem-resistance in *Klebsiella pneumoniae* in Malaysia due to loss of OmpK36 outer membrane protein coupled with AmpC hyperproduction. International Journal of Infectious Diseases, v.11, n.5, p.472-474. 2007.

PATERSON, D. L. Resistance in Gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. The American Journal of Medicine, v.119, n.6A, S20-S28. 2006.

PAVEZ, M.; NEVES, P.; DROPA, M.; MATTÉ, M. H.; GRINBAUM, R. S.; ELMOR DE ARAÚJO, M. R.; MAMIZUKA, E. M.; LINCOPAN, N. Emergence of carbapenem-resistant *Escherichia coli* producing CMY-2-type AmpC (beta)-lactamase in Brazil. Journal of Medical Microbiology, v.57, p.1590-1592. 2008.

PAVEZ, M.; MAMIZUKA, E. M.; LINCOPAN, N. Early dissemination of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v.53, n.6, p.2702. 2009.

PEDRINI, S. C. B. & MARGATHO, L. F. F. Sensibilidade de microrganismos patogênicos isolados de casos de mastite clínica em bovinos frente a diferentes tipos de desinfetantes. Arquivos do Instituto Biológico, v.70, n.4, p. 391-395, 2003.

PERES NETO, F.; ZAPPA, V. Mastite em vacas leiteiras – Revisão de literatura. Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária, ano IX, n.16, 2011.

PÉREZ-PÉREZ, F. J. & HANSON, N. D. Detection of plasmid-mediated AmpC betalactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. Journal of Clinical Microbiology, v.40, n.6, p.2153-2162. 2002.

PEREZ, F.; ENDIMIANI, A.; KUJER, K. M.; BONOMO, R. A. The continuing challenge of ESBLs. Current Opinion in Pharmacology, v.7, p.459-469. 2007.

PERSSON, Y.; NYMAN, A. J.; GRÖNLUND-ANDERSSON, U. Etiology and antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of subclinical mastitis in dairy cows in Sweden. Acta Veterinaria Scandinavica, v.53, n.36, p.1-8. 2011.

PHILIPPON, A.; ARLET, G.; JACOBY, G. A. Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 46, n.1, p.1-11. 2002.

PITOUT, J. D.; HOSSAIN, A.; HANSON, N. D. Phenotypic and molecular detection of CTX-M β -lactamases produced by *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. Journal of Clinical Microbiology, v.42, n.12, p.5715-5721. 2004.

POIREL, L.; HÉRITIER, C.; SPICQ, C.; NORDMANN, P. In vivo acquisition of high-level resistance to imipenem in *Escherichia coli*. Journal of Clinical Microbiology, v.42, n.8, p.3831-3833. 2004.

POIREL, L.; NAAS, T.; NORDMANN, P. Genetic support of extended-spectrum beta-lactamases. Clinical Microbiology and Infection, v.14, p.75-81. 2008.

PRIBUL, B. R. Correlação entre o perfil de resistência antimicrobiana e a bacteriocinas em *Staphylococcus spp.* isolados de casos de mastite bovina ocorridos no estado do Rio de Janeiro. Dissertação (Ciências Veterinárias). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 2011.

RAIA Jr, R. B. Fatores fisiológicos, clínicos e farmacológicos, determinantes de resíduos de antimicrobiano no leite, avaliados em protocolos terapêuticos de mastite em bovinos leiteiros. Tese (Toxicologia e Análises Toxicológicas). Universidade de São Paulo. 2006.

RAMCHANDANI, M.; MANGES, A. R.; DEB ROY, C.; SMITH, S. P.; JOHNSON, J. R.; RILEY, L. W. Possible animal origin of human-associated, multidrug-resistant, uropathogenic *Escherichia coli*. Clinical Infectious Diseases, v.40, n.2, p.251-257. 2005.

RAPOPORT, M.; MONZANI, V.; PASTERAN, F.; MORVAY, L.; FACCONI, D.; PETRONI, A.; GALAS, M. CMY-2-type plasmid-mediated AmpC beta-lactamase finally emerging in Argentina. International Journal of Antimicrobial Agents, v.31, n.4, p.385-387. 2008.

RASKO, D. A.; ROSOVITZ, M. J.; MYERS, G. S. A.; MONGODIN, E. F.; FRICKE, W. F.; GAJER, P.; CRABTREE, J.; SEBAIHA, M.; THOMSON, N. R.; CHAUDHURI, R. et al. The pangenome structure of *Escherichia coli*: comparative genomic analysis of *E. colicommensal* and pathogenic isolates. Journal of Bacteriology, v.190, n.20, p.6881-6893. 2008.

RICE, L. B.; BONOMO, R. A. Genetic and Biochemical mechanisms of bacterial. In: Viçlor Lorian, M. D. (Eds), Antibiotics in Laboratory Medicine. Nova Iorque: 2005. p. 441-476.

RIBEIRO, M. E. R.; PETRINI, L. A.; AITA, M. F.; BALBINOTTI, M.; STUMPF JR, W.; GOMES, J. F.; SCHRAMM, R. C.; MARTINS, P. R.; BARBOSA, R. S. Relação entre mastite clínica, subclínica infecciosa e não infecciosa em unidades de produção leiteiras na região sul do Rio Grande do Sul. Revista Brasileira Agrociência, v. 9, n. 3, p.287-290, 2003.

RIBEIRO, M. G.; COSTA, E. O.; LEITE, D. S. et al.. Fatores de virulência em linhagens de *Escherichia coli* isoladas de mastite bovina. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.48, p.724-731, 2006.

RISUEÑO, F. N.; CARDONA, E. M.; OTERO, B. M. Lectura interpretada del antibiograma de enterobacterias. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, n.20, v.5, p.225-234, 2002.

RIVERÓN, F. F.; HERNÁNDEZ, J. L.; MARTÍNEZ, L. M. P.; BETARTE, C. M. Resistencia bacteriana. Revista Cubana Medicina Militar, v. 32, n.1, p.44-48, 2003.

RODENBURG, J. Mastitis Prevention for Dairy Cattle: Environmental Control. 2012. Disponível em <<http://www.omafra.gov.on.ca/english/livestock/dairy/facts/90-104.htm>> Acessado em 29/julho/2013.

RUIZ, J. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v.51, n.5, p.1109-1117. 2003.

SADER, H.S.; SAMPAIO, J. L. M.; ZACCOLI, C.; JONES, R. N. Results of the 1997 SENTRY antimicrobial surveillance program in three Brazilian medical centers. Brazilian Journal of Infectious Diseases, v.3, n.2, p.63-79. 1999.

SAINI, V.; McCLURE, J. T.; LÉGER, D.; KEEFE, G. P.; SCHOLL, D. T.; MORCK, D. W.; BARKEMA, H. W. Antimicrobial resistance profiles of common mastitis pathogens on Canadian dairy farms. Journal of Dairy Science, v.95, n.8, p.4319-4332. 2012.

SAMPAIO, I. B. M. Estatística aplicada à experimentação animal. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia. 1998. 185p.

SANTOS, J. L. 2003. Disponível em <<http://pt.engormix.com/MA-pecuaria-corte/administracao/artigos/qualidade-da-agua-pecuaria-de-leite-t361/124-p0.htm>> Acessado em 31 de julho de 2013.

SANTOS, C. D. M. *Staphylococcus* sp e Enterobactérias Isoladas de Mastite Recorrente em Oito Rebanhos da Região de Uberlândia – MG: perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos. Dissertação (Ciências Veterinárias). Universidade Federal de Uberlândia. 2006.

SCHVARZ, D. W. & SANTOS, J. M. G. Mastite bovina em rebanhos leiteiros: ocorrência e métodos de controle e prevenção. Revista em Agronegócios e Meio Ambiente, v.5, n.3, p.453-473. 2012.

SHAHID, M.; MALIK, A.; AGRAWAL, M.; SINGHAL, S. Phenotypic detection of extended-spectrum and AmpC β -lactamases by a new spot-inoculation method and modified three-dimensional extract test: comparison with the conventional three-dimensional extract test. Journal of Antimicrobial and Chemotherapy, v.54, n.3, p.684-687. 2004.

SHAHID, M. *Citrobacter* spp. simultaneously harboring *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{ampC}, and insertion sequences IS26 and *orf513*: an evolutionary phenomenon of recent concern for antibiotic resistance. Journal of Clinical Microbiology, v.48, n.5, p.1833-1838. 2010.

SHAHID, M.; SINGH, A.; SOBIA, F.; RASHID, M.; MALIK, A.; SHUKLA, I.; KHAN, H. M. *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, and *bla*_{SHV} in Enterobacteriaceae from North-Indian tertiary hospital: high occurrence of combination genes. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, v.4, n.2, p.101-105. 2011.

SILVA, M. A. Utilização de PCR multiplex para o diagnóstico etiológico da mastite bovina. Dissertação (Ciência Animal). Universidade Federal de Minas Gerais. 2008.

SILVA, K. C. & LINCOPAN, N. Epidemiologia das betalactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, v.48, n.2, p.91-99. 2012.

SILVA, C. C.; VARGAS, C. G.; LUND, R. G.; LADEIRA, S.; GONZALES, H. de L.; NASCENTE, P. da S. Suscetibilidade *in vitro* de bactérias causadoras de mastite frente a antimicrobianos. 2008. Disponível em <http://www.ufpel.edu.br/cic/2008/cd/pages/pdf/CA/CA_00928.pdf> Acessado em 26 de janeiro de 2013.

SILVEIRA, G. P.; FARUK, N.; GESSER, J. C.; SÁ, M. M. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. Química Nova, v.29, n. 4, p.844-855, 2006.

SILVEIRA, J. B. Investigação de *Escherichia coli* O157:H7 em Carne Moida no Estado do Rio Grande do Sul. 2010. Disponível em <<http://hdl.handle.net/10183/24802>> Acessado em 31 de julho de 2013.

SOBIA, F.; MOHAMMAD, S.; SINGH, A.; KHAN, H. M.; SHUKLA, I.; MALIK, A. Occurrence of *bla*_{ampC} in cefoxitin-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from a North Indian tertiary care hospital. New Zealand Institute of Medical Laboratory Science, v.65, n.1, p.5-9. 2011.

SOUSA, J. C.; PEIXE, L. V.; FERREIRA, H.; PINTO, M. E.; NASCIMENTO, M. S. J.; SOUSA, M. I.; CABRAL, M. Antimicrobianos. In: FERREIRA, W. F. C. & SOUSA, J. C. (Eds) Microbiologia. Lisboa: Lidei, 1998. v.1, p. 239-269.

SOUSA Jr, M. A.; FERREIRA, E.S.; CONCEIÇÃO, G.C. Betalactamases de espectro ampliado: um importante mecanismo de resistência bacteriana no laboratório clínico. NewsLab, n.63, p.152-174. 2004.

SRINIVASAN, V.; GILLESPIE, B. E.; LEWIS, M. J.; NGUYEN, L. T.; HEADRICK, S. I.; SCHUKKEN, Y. H.; OLIVER, S. P. Phenotypic and genotypic antimicrobial resistance patterns of *Escherichia coli* isolated from dairy cows with mastitis. Veterinary Microbiology, v. 124, p. 319-328, 2007.

STEWART, C.D.; RASHEED, J.K.; HUBERT, S.K.; BIDDLE, J.W.; RANEY, P.M.; ANDERSON, G.J.; WILLIAMS, P.P.; BRITAIN, K.L.; OLIVER, A.; MCGOWAN, J.E.; TENOVER, F.C. Characterization of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from 19 laboratories using the National Committee for Clinical Laboratory Standards Extended-Spectrum B-lactamase detection methods. Journal of Clinical Microbiology, v.39, n.8, p.2864-2872. 2001.

STRAHILEVITZ, J.; JACOBY, G. A.; HOOPER, D. C.; ROBICSEK, A. Plasmid-Mediated Quinolone Resistance: a Multifaceted Threat. Clinical Microbiology Reviews, v.22, n.4, p.664-689. 2009.

TENSON, T. & MANKIN, A. Antibiotics and the ribosome. Molecular Microbiology, v.59, n.6, p.1664-77. 2006.

THOMSON, K. S. Controversies about extended-spectrum and AmpC beta-lactamases. Emerging Infectious Diseases, v.7, n.2, p.333-336. 2001.

TOLENTINO, F. M. Detecção e identificação dos genes de beta-lactamases *blaSHV*, *blaTEM* E *blaCTX-M* em *Klebsiella pneumoniae* isoladas em um Hospital Terciário do Estado de São Paulo. Dissertação (Microbiologia). Universidade Estadual Paulista. 2009.

TOZZETTI, D. S.; BATAIER, M.B. N.; ALMEIDA, L. R. de Prevenção, controle e tratamento das mastites bovinas – Revisão de Literatura. Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária, ano VI, n.10, 2008.

TYLER, J. W.; CULLOR, J. S. Sanidade e Distúrbios da Glândula Mamária. In: SMITH, B. P. Medicina Interna de Grandes Animais. 3 ed. Barueri: Manole, 2006. p.1019-1037.

VERCAUTEREN, E.; DESCHEEMAEKER, P.; IEVEN, M.; SANDERS, C. C.; GOOSSENS, H. Comparison of screening methods for detection of extended-spectrum beta-lactamases and their prevalence among blood isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. In a Belgian teaching hospital. Journal of Clinical Microbiology, v.35, n.9, p.2191-2197.1997.

VICENTE, D. & PÉREZ-TRALLERO, E. Tetraciclina, sulfamidas y metronidazol. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, v.28, n.2, p.122-130.2010.

VIEIRA, J. F. S. Estudo retrospectivo sobre agentes de mastites e sua sensibilidade a antimicrobianos em explorações de Montemor-o-Velho. Dissertação (Medicina Veterinária). 2010.

VILLAR, H. E.; DANIEL, F.; LIVERMORE, D. M. Permeability to carbapenems of *Proteus mirabilis* mutants selected for resistance to imipenem or other beta-lactams. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v.40, p.365-370. 1997.

YAGI, T.; WACHINO, J.; KUROKAWA, H.; SUZUKI, S.; YAMANE, K.; DOI, Y.; SHIBATA, N.; KATO, H.; SHIBAYANA, K.; ARAKAWA, Y. Practical methods using boronic acid compounds for identification of class C β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. Journal of Clinical Microbiology, v.43, n.6, p.2551-2558. 2005.

ZADOKS, R. N. ; MIDDLETON, J. R.; McDOUGALL, S.; KATHOLM, J.; SCHUKKEN, Y. H. Molecular Epidemiology of Mastitis Pathogens of Dairy Cattle and Comparative Relevance to Humans. Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia, v.16, n.4, p. 357-372.2011.

ZAFALON, L. F.; ARCARO, J. R. P.; NADER FILHO, A.; FERREIRA, L. M.; CASTELANI, L.; BENVENUTTO, F. Investigação de perfis de resistência aos antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados na ordenha de vacas em lactação. Revista do Instituto Adolfo Lutz, v.67, n.1, p.118-125. 2008.

WANG, M.; SAHM, D. F.; JACOBY, G. A.; HOOPER, D. C. Emerging plasmid-mediated quinolone resistance associated with the *qnr* gene in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in the United States. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 48, n.4, p.1295-1299. 2004.

WASSEF, M. A.; EL SHERIF, R. H.; EL SHENOIFY, A. E.; GHAITH, D. M. Phenotypic and Genotype patterns of aminoglycoside Resistance in Gram negative bacilli. Journal of American Science, v.6, n.9, p.781-786. 2010.

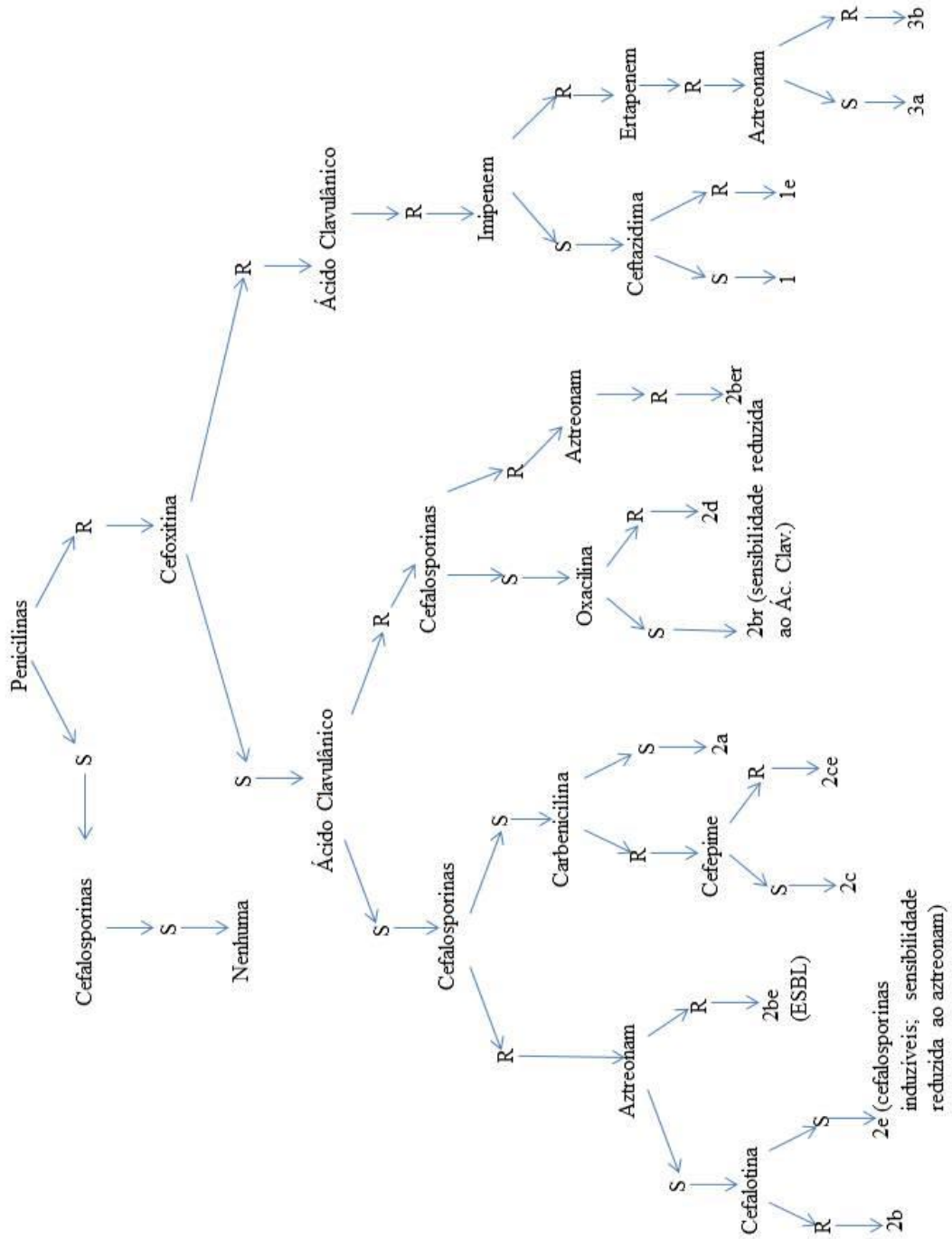
WENZ, J. R.; BARRINGTON, G. M.; GARRY, F. B.; DINSMORE, R.; CALLAN, R. J. Use of systemic disease signs to assess disease severity in dairy cows with acute coliform mastitis. Journal of the American Veterinary Medical Association, v.218, n.4, p.567-572. 2001.

WHO. World Health Organization. Critically importante antibacterial agentes for human medicine: categorization for the development of risk management strategies to contain antimicrobial resistance due to nonhuman use. Report of the second WHO Expert Meeting, Copenhagen, p.29-31. 2007. Geneva: WHO, 2007. Disponível em <http://www.who.int/foodborne_disease/resistance/antimicrobials_human.pdf> Acessado em março de 2013.

8. ANEXOS

8.1 ANEXO A

Esquema de identificação de betalactamases.



8.2 ANEXO B

Laudo da FIOCRUZ para confirmação da identificação fenotípica de *E. coli*.

Ministério da Saúde
Fundação Coordenação de Epidemiologia e Informação – FIOCRUZ
Laboratório de Enterobactérias
Centro de Res. Mac. e Entomofauna: Bacteriologia



Destinatário: Drª SHANA MATTOS DE OLIVEIRA COELHO

Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO - UFRJ
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA VETERINÁRIA

Endereço: BR-465, KM 7 - SEROPÉDICA / RIO DE JANEIRO - CEP: 23.890-000

Data da emissão do laudo: 18 / 10 / 2012

Data do recebimento da cepa: 22 / 08 / 2012

Nº. Do Laudo: 384 / 12

Nº da Folha: 01 / 01

Nº. IOC	Nº. ORIGEM	FONTE	IDENTIFICAÇÃO	GEMES **
447	01	AN	Escherichia coli *	Negativo
448	04	AN	Escherichia coli *	Negativo
449	05	AN	Escherichia coli *	st (*)
450	06	AN	Escherichia coli *	Negativo
451	07	AN	Escherichia coli *	Negativo
452	08	AN	Escherichia coli *	Negativo
453	09	AN	Escherichia coli *	Negativo
454	10	AN	Escherichia coli (H2S+) *	st2 (-)
455	11	AN	Escherichia coli *	st2 (-)
456	12	AN	Escherichia coli *	Negativo
457	13	AN	Escherichia coli *	Negativo
458	14	AN	Escherichia coli *	Negativo
459	15	AN	Escherichia coli *	Negativo
460	16	AN	Escherichia coli *	Negativo
461	17	AN	Escherichia coli *	Negativo
462	18	AN	Escherichia coli *	Negativo
463	19	AN	Escherichia coli *	Negativo
464	22	AN	Escherichia coli *	Negativo
465	25	AN	Escherichia coli *	Negativo
466	27	AN	Escherichia coli *	Negativo
467	26c	AN	Escherichia coli *	Negativo
468	2PDA	AN	Escherichia coli *	Negativo
469	7PDA	AN	Escherichia coli (H2S+) *	Negativo
470	2PDB	AN	Escherichia coli (H2S-) *	Negativo
471	700	AN	Escherichia coli *	Negativo
472	77A	AN	Escherichia coli *	Negativo
473	82B	AN	Escherichia coli *	Negativo
474	142B	AN	Escherichia coli *	Negativo
475	145B	AN	Escherichia coli *	Negativo
476	155A	AN	Escherichia coli *	Negativo
477	160B	AN	Escherichia coli *	Negativo
478	163B	AN	Escherichia coli *	Negativo
479	182C	AN	Escherichia coli *	Negativo
480	195A	AN	Escherichia coli *	Negativo
481	198D	AN	Escherichia coli *	Negativo
482	202C	AN	Escherichia coli *	Negativo
483	202E	AN	Escherichia coli *	Negativo

Márcia Keri
Responsável Técnico

Gláucia Helena de A.
Responsável pelo Laboratório

Domício Ferreira
Revisor

Diane M. Faleiros dos Reis

* Não aplicável nos enterococos.

** PCR: genes

pat;
cazA;
stx-2;
stx-1;
LT;
eagg;
ST;
fto 157

8.3 ANEXO C

Avaliação de sensibilidade e especificidade para o TET, considerando como técnica padrão a suscetibilidade à cefoxitina

% Sensibilidade = verdadeiros positivos/ verdadeiros positivos + falsos negativos

% Especificidade= verdadeiros negativos/ verdadeiros negativos + falsos positivos

TET	Cefoxitina		Total
	R	S	
+	VP (5)	FP (1)	6
-	FN (15)	VN (21)	36
Total	20	22	42

Sensibilidade: 25% e Especificidade: 95%