

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**PERFIL MOLECULAR E PESQUISA DE BETA-
LACTAMASES DE ESPECTRO AMPLIADO DE
ISOLADOS DE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* EM
REBANHOS BOVINOS LEITEIROS NO ESTADO DE SÃO
PAULO**

DIEGO BORIN NÓBREGA

Botucatu - SP
Novembro/2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**PERFIL MOLECULAR E PESQUISA DE BETA-
LACTAMASES DE ESPECTRO AMPLIADO DE
ISOLADOS DE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* EM
REBANHOS BOVINOS LEITEIROS NO ESTADO DE SÃO
PAULO**

DIEGO BORIN NÓBREGA

Dissertação apresentada junto ao Programa
de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Simone Baldini
Lucheis

Botucatu - SP
Novembro/2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Nóbrega, Diego Borin.

Perfil molecular e pesquisa de beta-lactamases de espectro ampliado de isolados de *Klebsiella pneumoniae* em rebanhos bovinos leiteiros no Estado de São Paulo / Diego Borin Nóbrega. – Botucatu : [s.n.], 2012

Dissertação – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu

Orientador: Simone Baldini Lucheis

Capes: 50502000

1. Bovino de leite. 2. Leite. 3. Eletroforese. 3. Mastite.

Palavras-chave: Ambiente; Beta-lactamases de espectro ampliado; Eletroforese em Campo Pulsátil (PFGE); *Klebsiella pneumoniae*; Leite; Mastite.

Nome do Autor: Diego Borin Nóbrega

Título: PERFIL MOLECULAR E PESQUISA DE BETA-LACTAMASES DE ESPECTRO AMPLIADO DE ISOLADOS DE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* EM REBANHOS BOVINOS LEITEIROS NO ESTADO DE SÃO PAULO.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^ª Dr^a Simone Baldini Lucheis

Presidente e Orientadora

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Hélio Langoni

Membro

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof^ª Dr^a Elizabeth Oliveira da Costa Freitas Guimarães

Membro

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

FMVZ – USP – São Paulo

Data da Defesa: 30 de novembro de 2011.

*D*EDICATÓRIA

NÓBREGA, D. B.

Dedico,

*Primeiramente aos meus pais (**Eudes Nóbrega** e **Maria Helena Borin Nóbrega**) por toda confiança que depositaram em mim desde a escolha do curso de graduação até o presente momento. Por toda paciência que possuem em todos os momentos do dia, ouvindo novidades, boas e más notícias, desabafos, reclamações e de tudo que os faço passar. Por me apoiarem em todas as escolhas, até mesmo nas que só percebo estarem erradas depois de já feitas. Por estarem ao meu lado sempre que precisei. Por me ensinarem que a felicidade está presente nas pequenas coisas, e por me mostrarem qual é o caminho a ser trilhado.*

*Ao meu **pai**, dedico este trabalho, cujo resultado ele já conhecia desde o início. Se hoje eu tenho motivação para estudar e seguir em frente, é porque tive um exemplo dentro de minha própria casa de uma pessoa inteligente, dedicada e persistente.*

*A minha **mãe**, dedico este trabalho. Minha melhor amiga e maior confidente, sempre se mostra confiante em meu futuro. Admiro muito seu eterno otimismo e sua alegria. Admiro sua força e sua liderança. E admiro seu carinho, atenção e generosidade que são responsáveis por manter nossa família sempre tão unida, mesmo a distância.*

Espero sempre ser um pouco de cada um de vocês, espero chegar aonde vocês chegaram. Espero ser motivo de orgulho e de muitas alegrias para vocês.

*Dedico este trabalho também à minha linda irmã **Thalita Borin Nóbrega**. Muito obrigado pela sua amizade! Sei que ainda tenho um grande caminho pela frente e me tranquiliza o fato de saber que sempre poderei contar com você! Sei que não te elogio com frequência, mas saiba que admiro muito a pessoa que você se tornou. Nunca fui muito bom em expressar sentimentos com palavras, mas isso não exclui o fato que eles estão presentes!*

Acredito no fato de que cada etapa na nossa vida, cada situação que vivenciamos contribuem para a formação de quem realmente somos. Não acredito que não somos capazes de escolher e trilhar nosso caminho, nem que algum objetivo é inalcançável. Agradeço muito a minha família pela pessoa que sou e que serei no futuro.

Muito obrigado! Tudo o que fiz foi sempre pensando em vocês!

AGRADEDECIMENTOS

NÓBREGA, D. B.

Agradeço

A todos os **produtores rurais** que permitiram que este estudo fosse desenvolvido em suas propriedades.

Ao professor **José Paes de Almeida Nogueira Pinto**. Um verdadeiro exemplo de professor, sempre disposto a ajudar. Agradeço muito o senhor por tudo que fez por mim, desde a graduação até o presente momento. Saiba que vejo no senhor a imagem de um professor e principalmente de um amigo. Muito obrigado!

Ao professor **José Carlos Pantoja**. Agradeço por todos os conselhos que me deu e por toda a confiança que tem depositado em mim. Admiro demais sua inteligência e sua capacidade. Posso dizer seguramente que você é a pessoa mais inteligente que conheço e o profissional que mais me motivou, e poder presenciar tudo o que você conquistou e conquistará sempre irá me motivar ainda mais. Poder conviver com pessoas como você, por mais que seja apenas por um breve período, é bastante gratificante. Obrigado por tudo!

A todos meus colegas de **pós-graduação e residentes**. Vocês tornaram a vida em Botucatu mais fácil. Agradeço bastante por estarem presentes durante toda esta etapa que passei. Muito obrigado!

Aos meus amigos de graduação, especialmente **Renato Saito Siqueira** (Vet), **Matheus Millo Hoppe** (Num Sei), **Luiz Felipe dos Santos Lorenzo** (KLB), **Parmesão**, **Larissa Mourad Ozeki** (Guaia) e **Cristina de Faria Mantovani** (Xegs). Muito obrigado por estarem juntos comigo mesmo após nossa formatura! Nossos encontros quase que mensais sempre me motivaram a seguir em frente! Fico contente de ter conhecido vocês durante nossa graduação, e mais contente ainda em mesmo após três anos de formados, ainda mantermos contato! Muito obrigado!

Agradeço ao amigo **Rodrigo Costa da Silva**. Uma pessoa incrível com um futuro brilhante pela frente. Poder conviver com você durante estes dois anos foi muito gratificante. Agradeço demais sua companhia e sua amizade! Espero um dia ter o prazer de trabalhar ao seu lado. Muito obrigado!

Aos meus amigos de Araçatuba, especialmente **Fernando Igarashi**, **Ari Bedran**, **Rafael Zanata** e **André Veronese** (ae!). Vocês mesmo distantes são as pessoas que mais confio na minha vida! Afinal vocês são irmãos, e família

vem sempre em primeiro lugar! Espero realmente poder contar com vocês o resto da minha vida. Muito obrigado!

Agradeço aos meus avos, **Eudes Nóbrega**, **Zilda Nóbrega** e **Luzia Bertozzo Borin** que com muita dedicação, amor e carinho, auxiliaram meus pais nos momentos de dificuldade, permitindo que a esperança e a determinação nunca estivessem ausentes nas vidas de seus filhos e netos. Muito obrigado.

Agradeço ao meu avô **Aristides Borin** (*in memoriam*) por tudo o que me ensinou, mas principalmente por tudo o que ensinou a minha mãe. Se hoje ela é uma pessoa que tanto admiro, tenho certeza que ela herdou suas melhores características. Muito obrigado.

Agradeço a todos meus **familiares** que sempre estiveram torcendo por mim.

Agradeço aos secretários **Wanderley Forlin** e **Sérgio Favero**, pelas conversas sobre futebol e outros temas, descontração e amizade acima de tudo.

Agradeço ao amigo **Benedito Donizete Menozzi**, uma pessoa muito dedicada que colaborou muito com todas as etapas da minha pós-graduação. Muito obrigado.

Agradeço a **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo** (FAPESP) por acreditar no presente estudo (Processos 2009/03294-0 e 2010/08104-1) e por auxiliar na minha estadia na cidade de Botucatu. Muito obrigado.

Agradeço ao professor **Hélio Langoni** por tudo o que me ensinou, dentro e fora da sala de aula. O dia em que entrei na sala do senhor com o cabelo comprido pedindo iniciação científica com certeza mudou minha vida para sempre. Olhando para trás fica fácil perceber que aquele dia foi um daqueles dias que só reconhecemos a importância depois de muito tempo. Agradeço ainda mais o senhor por me receber em seu grupo novamente após a minha graduação. Admiro bastante sua liderança, sua capacidade de tornar simples o que para mim é algo de outro mundo. Admiro a confiança que o senhor deposita nos seus alunos, e admiro o fato de o senhor sempre nos defender em todas as situações. Posso afirmar seguramente que tudo, tudo mesmo o que eu conquistar será graças ao senhor. E nunca me esquecerei

disto. Poucas pessoas que conheci na vida conquistaram meu respeito por sua capacidade e inteligência. Afirmo seguramente que o senhor é uma delas. Muito obrigado!

Agradeço a professora **Simone Baldini Lucheis**, por tudo o que fez por mim durante estes dois anos. Mesmo não me conhecendo, aceitou me orientar durante esta jornada, fato pelo qual serei eternamente grato. Admiro muito sua paciência e inteligência. Agradeço muito toda a confiança que a senhora deposita em mim e espero que eu possa ser digno desta. Foi uma enorme surpresa saber que a senhora de alguma maneira conheceu meus familiares no passado. Desta maneira me sinto mais a vontade como se eu também a conhecesse a mais tempo. Sempre me lembrarei da viagem que fizemos juntos o professor Hélio, a senhora e eu para Albuquerque. Lá pude conhecê-los como pessoas e não só renomados pesquisadores, e poder apreciar a companhia de pessoas realmente admiráveis. Gostaria que a senhora soubesse também que se eu atingir meus objetivos, se eu me tornar tudo o que sonho em me tornar, grande parte do caminho foi percorrido devido a sua ajuda e influência. Por isso e muito mais, agradeço novamente. Muito obrigado!

*“Você não pode conectar os pontos olhando para frente;
você só pode conectar os pontos olhando para trás.
Assim, você precisa acreditar que os pontos irão se
conectar de alguma maneira no futuro”*

*Steve Jobs
(1955 – 2011)*

***L*ISTA DE *T*ABELAS**

LISTA DE TABELAS

Página

TABELA 1. Frequência absoluta (n), frequência relativa (%), frequência absoluta acumulada (NA) e frequência relativa acumulada (%A) referente ao numero de lactação dos animais. Botucatu, SP, 2011.....	46
TABELA 2. Frequência absoluta (n), frequência relativa (%), frequência absoluta acumulada (NA) e frequência relativa acumulada (%A) referente a produção de leite dos animais. Botucatu, SP, 2011.....	46
TABELA 3. Frequência absoluta (n), frequência relativa (%), frequência absoluta acumulada (NA) e frequência relativa acumulada (%A) referente aos dias em lactação (DEL) dos animais. Botucatu, SP, 2011.	46
TABELA 4. Frequência absoluta (n), frequência relativa (%), e frequência relativa válida acumulada (%A) dos resultados da prova do California Mastitis Test (CMT) bem como número de tetos perdidos e mastites clínicas. Botucatu, SP, 2011.	57
TABELA 5. Frequência absoluta (N), frequência relativa (%), frequência absoluta acumulada (NA) e frequência relativa acumulada (%A) do resultado do exame microbiológico de amostras de leite bovino positivas ao California Mastitis Test (CMT). Botucatu, SP, 2011.	58
TABELA 6. Frequência absoluta (N) e frequência relativa em relação ao tipo (%tipo) e em relação a propriedade (%P) do tipo de patógeno isolado nas diferentes propriedades. Botucatu, SP, 2011.....	59
TABELA 7. Frequência absoluta (N), frequência relativa (%), frequência absoluta acumulada (NA) e frequência relativa acumulada (%A) dos principais patógenos responsáveis pela infecção intramamária considerando-se o animal como unidade experimental. Botucatu, SP, 2011.	60
TABELA 8. Média, mediana, desvio padrão (σ), percentil 25 (P25) e percentil 75 (P75), limites inferiores (LB 95%) e superiores (UP 95%) do intervalo de	

confiança de 95% para a contagem de células somáticas (CCS x 10³ células/mL de leite) para as diferentes propriedades (P). Botucatu, SP, 2011. 61

TABELA 9. Média, mediana, desvio padrão (σ), percentil 25 (P25) e percentil 75 (P75), limites inferiores (LB 95%) e superiores (UP 95%) do intervalo de confiança de 95% para a contagem de células somáticas (log CCS x 10³ células/mL de leite) para as diferentes propriedades. Botucatu, SP, 2011. 62

TABELA 10. Média, mediana, desvio padrão (σ), percentil 25 (P25) e percentil 75 (P75), limites inferiores (LB 95%) e superiores (UP 95%) do intervalo de confiança de 95% para a contagem de células somáticas (log CCS x 10³ células/mL de leite) de acordo com os diferentes patógenos isolados. Botucatu, SP, 2011. 63

TABELA 11. Frequência absoluta (N) e frequência relativa (%) dos 107 isolados de *Klebsiella pneumoniae* resistentes aos antimicrobianos (ATB). Botucatu, SP, 2011. 66

TABELA 12. Frequência absoluta (N) e frequência relativa (%) do número de cepas bacterianas resistentes a, no mínimo, dois princípios ativos testados (R2), três (R3), quatro (R4), cinco (R5) e a todos os seis princípios testados (R6). Botucatu, SP, 2011. 67

TABELA 13. Frequência absoluta (N) e frequência relativa (%) de cepas de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a: nenhum princípio testado (0), um (1), dois (2), três (3), quatro (4), cinco (5) e todos os princípios ativos testados (6) por propriedade (P). Botucatu, SP, 2011. 68

TABELA 14. Frequência absoluta (N) e frequência relativa (%) de cepas de *Klebsiella pneumoniae* sensíveis a todos os antimicrobianos testados (0) e resistentes a no mínimo um (1) por propriedade (P). Botucatu, SP, 2011. 69

TABELA 15. Frequência absoluta (N) e frequência relativa (%) de cepas de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a: nenhum antimicrobiano testado (0), um (1), dois (2), três (3), quatro (4), cinco (5) e todos os antimicrobianos testados (6) de acordo com procedência da amostra. Botucatu, SP, 2011. 70

TABELA 16. Frequência absoluta (N) e frequência relativa (%) de cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> sensíveis a todos os antimicrobianos testados (0) e resistentes a no mínimo um (1), de acordo com procedência do patógeno. Botucatu, SP, 2011.	71
--	----

L ISTA DE Q UADROS

NÓBREGA, D. B.

LISTA DE QUADROS

Página

- QUADRO 1.** Presença ou ausência de galpões de free stall, equipamento de ordenha, número de animais em lactação, produção leiteira média diária, realização de pré-dipping (Pre), pós-dipping (Pos), higienização prévia a ordenha (Hig_Pre) e prática de fornecimento de alimentação na pós-ordenha (Aliment) e contagem de células somáticas do tanque de expansão ($\text{CCS} \times 10^3$ células/mL) das 10 propriedades (P). Botucatu, SP, 2011..... 45
- QUADRO 2.** Isolamento da *Klebsiella pneumoniae* a partir de pelo menos uma amostra de leite (IMI), swabs de ambiente (Amb), swabs de sala de ordenha (S_Ord), tanque de expansão (TQ), swabs de sala de pré-ordenha (Pre_Ord), reto e membros posteriores dos animais (Post) de dez propriedades (P). Botucatu, SP, 2011. 64
- QUADRO 3.** Número de swabs positivos e negativos para o isolamento de *Klebsiella pneumoniae* a partir de amostras de ambiente (AMB), reto e membros posteriores dos animais (POST), sala de ordenha (SO), sala de pré-ordenha (PO), e leite do tanque de expansão (TQ) das diferentes propriedades (P). Botucatu, SP, 2011. 65
- QUADRO 4.** Procedência das oito cepas bacterianas produtoras de β -lactamases de espectro ampliado isolada de três propriedades leiteiras entre as dez visitadas. Botucatu, SP, 2011..... 72
- QUADRO 5.** Procedência das cepas bacterianas não tipáveis pela enzima *Xba* I na técnica de eletroforese em campo pulsátil (PFGE). Botucatu, SP, 2011 .. 73

*L*ISTA DE *F*IGURAS

LISTA DE FIGURAS

Página

FIGURA 1. Teste positivo para produção de β -lactamases de espectro ampliado pela metodologia da disco difusão dupla em agar Müller-Hinton (Oxoid®, Inglaterra). Nota-se a formação da ghost zone. Ao centro, o disco de amoxicilina/ácido clavulânico. À esquerda o disco de cefotaxima e a direita o disco de ceftriaxona. Botucatu, SP, 2011. 72

FIGURA 2. Padrão de digestão de 14 isolados de *Klebsiella pneumoniae* de diferentes origens da propriedade 1 pela enzima *Xba I* e submetidos a eletroforese em campo pulsátil (PFGE). As diferentes cores indicam a origem da cepa dentro da mesma propriedade. O campo “free stall” informa se a propriedade utilizava ou não este sistema de criação, e o campo ES β L informa se a cepa era ou não produtora de enzimas do tipo β -lactamases de espectro ampliado. A escala horizontal no canto esquerdo da figura indica o nível de similaridade entre as cepas. O dendograma foi construído com base no resultado da PFGE considerando-se 1% de tolerância e otimização. Botucatu, SP, 2011 74

FIGURA 3. Padrão de digestão de 15 isolados de *Klebsiella pneumoniae* de diferentes origens da propriedade 2 pela enzima *Xba I* e submetidos a eletroforese em campo pulsátil (PFGE). As diferentes cores indicam a origem da cepa dentro da mesma propriedade. O campo “free stall” informa se a propriedade utilizava ou não este sistema de criação, e o campo ES β L informa se a cepa era ou não produtora de enzimas do tipo β -lactamases de espectro ampliado. A escala horizontal no canto esquerdo da figura indica o nível de similaridade entre as cepas. O dendograma foi construído com base no resultado da PFGE considerando-se 1% de tolerância e otimização. Botucatu, SP, 2011 75

FIGURA 4. Padrão de digestão de 36 isolados de *Klebsiella pneumoniae* de diferentes origens da propriedade 3 pela enzima *Xba I* e submetidos a eletroforese em campo pulsátil (PFGE). As diferentes cores indicam a origem

da cepa dentro da mesma propriedade. O campo “free stall” informa se a propriedade utilizava ou não este sistema de criação, e o campo ES β L informa se a cepa era ou não produtora de enzimas do tipo β -lactamases de espectro ampliado. A escala horizontal no canto esquerdo da figura indica o nível de similaridade entre as cepas. O dendograma foi construído com base no resultado da PFGE considerando-se 1% de tolerância e otimização. Botucatu, SP, 2011 76

FIGURA 5. Padrão de digestão de dois isolados de *Klebsiella pneumoniae* de diferentes origens da propriedade 4 pela enzima *Xba I* e submetidos a eletroforese em campo pulsátil (PFGE). As diferentes cores indicam a origem da cepa dentro da mesma propriedade. O campo “free stall” informa se a propriedade utilizava ou não este sistema de criação, e o campo ES β L informa se a cepa era ou não produtora de enzimas do tipo β -lactamases de espectro ampliado. A escala horizontal no canto esquerdo da figura indica o nível de similaridade entre as cepas. O dendograma foi construído com base no resultado da PFGE considerando-se 1% de tolerância e otimização. Botucatu, SP, 2011 77

FIGURA 6. Padrão de digestão de três isolados de *Klebsiella pneumoniae* de diferentes origens da propriedade 5 pela enzima *Xba I* e submetidos a eletroforese em campo pulsátil (PFGE). As diferentes cores indicam a origem da cepa dentro da mesma propriedade. O campo “free stall” informa se a propriedade utilizava ou não este sistema de criação, e o campo ES β L informa se a cepa era ou não produtora de enzimas do tipo β -lactamases de espectro ampliado. A escala horizontal no canto esquerdo da figura indica o nível de similaridade entre as cepas. O dendograma foi construído com base no resultado da PFGE considerando-se 1% de tolerância e otimização. Botucatu, SP, 2011 77

FIGURA 7. Padrão de digestão de seis isolados de *Klebsiella pneumoniae* de diferentes origens da propriedade 6 pela enzima *Xba I* e submetidos a eletroforese em campo pulsátil (PFGE). As diferentes cores indicam a origem da cepa dentro da mesma propriedade. O campo “free stall” informa se a propriedade utilizava ou não este sistema de criação, e o campo ES β L informa

se a cepa era ou não produtora de enzimas do tipo β -lactamases de espectro ampliado. A escala horizontal no canto esquerdo da figura indica o nível de similaridade entre as cepas. O dendograma foi construído com base no resultado da PFGE considerando-se 1% de tolerância e otimização. Botucatu, SP, 2011 78

FIGURA 8. Padrão de digestão de seis isolados de *Klebsiella pneumoniae* de diferentes origens da propriedade 7 pela enzima *Xba I* e submetidos a eletroforese em campo pulsátil (PFGE). As diferentes cores indicam a origem da cepa dentro da mesma propriedade. O campo “free stall” informa se a propriedade utilizava ou não este sistema de criação, e o campo ES β L informa se a cepa era ou não produtora de enzimas do tipo β -lactamases de espectro ampliado. A escala horizontal no canto esquerdo da figura indica o nível de similaridade entre as cepas. O dendograma foi construído com base no resultado da PFGE..... 78

FIGURA 9. Padrão de digestão de seis isolados de *Klebsiella pneumoniae* de diferentes origens da propriedade 8 pela enzima *Xba I* e submetidos a eletroforese em campo pulsátil (PFGE). As diferentes cores indicam a origem da cepa dentro da mesma propriedade. O campo “free stall” informa se a propriedade utilizava ou não este sistema de criação, e o campo ES β L informa se a cepa era ou não produtora de enzimas do tipo β -lactamases de espectro ampliado. A escala horizontal no canto esquerdo da figura indica o nível de similaridade entre as cepas. O dendograma foi construído com base no resultado da PFGE considerando-se 1% de tolerância e otimização. Botucatu, SP, 2011 79

FIGURA 10. Padrão de digestão de três isolados de *Klebsiella pneumoniae* de diferentes origens da propriedade 9 pela enzima *Xba I* e submetidos a eletroforese em campo pulsátil (PFGE). As diferentes cores indicam a origem da cepa dentro da mesma propriedade. O campo “free stall” informa se a propriedade utilizava ou não este sistema de criação, e o campo ES β L informa se a cepa era ou não produtora de enzimas do tipo β -lactamases de espectro ampliado. A escala horizontal no canto esquerdo da figura indica o nível de similaridade entre as cepas. O dendograma foi construído com base no

resultado da PFGE considerando-se 1% de tolerância e otimização. Botucatu, SP, 2011 79

FIGURA 11. Padrão de digestão de cinco isolados de *Klebsiella pneumoniae* de diferentes origens da propriedade 10 pela enzima *Xba I* e submetidos a eletroforese em campo pulsátil (PFGE). As diferentes cores indicam a origem da cepa dentro da mesma propriedade. O campo “free stall” informa se a propriedade utilizava ou não este sistema de criação, e o campo ESβL informa se a cepa era ou não produtora de enzimas do tipo β-lactamases de espectro ampliado. A escala horizontal no canto esquerdo da figura indica o nível de similaridade entre as cepas. O dendograma foi construído com base no resultado da PFGE considerando-se 1% de tolerância e otimização. Botucatu, SP, 2011 80

FIGURA 12. Padrão de digestão de 28 isolados de *Klebsiella pneumoniae* oriundos de quadros de infecção intramamária (IMI) pela enzima *Xba I* e submetidos a eletroforese em campo pulsátil (PFGE). As diferentes cores indicam a origem da cepa (propriedade). O campo “free stall” informa se a propriedade utilizava ou não este sistema de criação, e o campo ESβL informa se a cepa era ou não produtora de enzimas do tipo β-lactamases de espectro ampliado. A escala horizontal no canto esquerdo da figura indica o nível de similaridade entre as cepas. O dendograma foi construído com base no resultado da PFGE considerando-se 1% de tolerância e otimização. Botucatu, SP, 2011 81

FIGURA 13. Padrão de digestão de quatro isolados de *Klebsiella pneumoniae* oriundos do leite do tanque de expansão pela enzima *Xba I* e submetidos a eletroforese em campo pulsátil (PFGE). As diferentes cores indicam a origem da cepa (propriedade). O campo “free stall” informa se a propriedade utilizava ou não este sistema de criação, e o campo ESβL informa se a cepa era ou não produtora de enzimas do tipo β-lactamases de espectro ampliado. A escala horizontal no canto esquerdo da figura indica o nível de similaridade entre as cepas. O dendograma foi construído com base no resultado da PFGE considerando-se 1% de tolerância e otimização. Botucatu, SP, 2011 81

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	porcentagem	M	molar
CMT	Califórnia Mastitis Test	ml	mililitros
IMI	infecção intramamária	mm	milímetros
ES β L	β -lactamases de espectro ampliado	μ l	microlitros
PFGE	eletroforese em campo pulsado	mM	milimolar
CCS	contagem de células somáticas	mg	miligramas
DNA	ácido desoxirribonucleico	l	litros
CIM	concentração mínima inibitória	g	gramas
NMC	National Mastitis Council	μ g	microgramas
PBS	solução salina tamponada	EPM	Escola Paulista de Medicina
pH	potencial hidrogeniônico	BHI	infusão de cérebro coração
U	unidades internacionais	TE	Tris EDTA
ATCC	American Type Culture Collection	TBE	Tris Borato EDTA
STS	solução tampão de suspensão	PA	puro para análise
°C	graus centígrados	CPD	cefpodoxima
®	marca registrada	ATM	aztreonam
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético	CTX	cefotaxime
SDS	sodium dodecyl sulfato	CRO	ceftriaxona
CLS-1	solução de lise 1	CAZ	ceftazidima
CLS-2	solução de lise 2	FOX	cefoxitina
Nm	nanômetros	HCl	ácido clorídrico
UPGMA	unweighted pair group method using arithmetic average		

SUMÁRIO

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	31
2 REVISÃO DA LITERATURA	33
3 OBJETIVOS	42
4 MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1 Propriedades rurais	44
4.2 Questionário Epidemiológico	45
4.3 Coleta do leite dos animais	47
4.4 Contagem de células somáticas	47
4.5 Coleta do leite dos tanques de expansão	47
4.6 Cultivo microbiológico	47
4.7 Coleta de material da sala de ordenha, ambiente e dos animais	48
4.7.1 Propriedades com sistema "free stall"	48
4.7.2 Propriedades sem sistema "free stall"	48
4.7.3 Coleta de swabs de animais	49
4.8 Exames microbiológicos dos swabs	49
4.9 Protocolo de congelamento	50
4.10 Identificação fenotípica das cepas produtoras de ESβL	50
4.11 Eletroforese em Campo Elétrico Pulsado	51
4.12 Análise Estatística	53
4.12.1 Tetos	53
4.12.2 Animais	54
4.12.3 Propriedades	54

4.12.4 Swabs	54
4.12.5 Resistência antimicrobiana e ESβL.....	54
5 RESULTADOS	57
5.1 Tetos	57
5.2 Animais	59
5.3 Propriedades	63
5.4 Swabs e Leite do Tanque de Expansão.....	64
5.5 Resistência antimicrobiana e ESβL	66
5.6 Eletroforese em Campo Pulsátil.....	73
6 DISCUSSÃO	84
7 CONCLUSÕES.....	91
8 BIBLIOGRAFIA	93
9 ANEXOS	101
10 TRABALHO CIENTÍFICO.....	105

*R*ESUMO

RESUMO

O presente trabalho objetivou o isolamento de *Klebsiella pneumoniae* do ambiente de sala de ordenha e do ambiente dos animais, incluindo a sala de pré-ordenha, piquetes e, em algumas propriedades os galpões de "free stall", do reto e membros posteriores dos animais, do leite do tanque de refrigeração e do leite dos tetos positivos ao teste do Califórnia Mastitis Test (CMT), pesquisar cepas produtoras de β -lactamases de espectro ampliado (ES β L) e, a partir da identificação clonal, verificar a semelhança entre as cepas. Em 28 (2,14%) amostras de leite coletadas dos animais foi detectada a presença de *Klebsiella pneumoniae* como patógeno responsável pela infecção intramamária (IMI). A partir de swabs ambientais, da pele dos animais e do leite oriundo do tanque de expansão das dez propriedades, foram isoladas 79 cepas de *K. pneumoniae*. Os resultados da prova de detecção fenotípica da produção de enzimas do tipo ES β L foram positivos em oito (7,47%) das cepas bacterianas isoladas. No Brasil ainda não há relatos de coliformes produtores destas enzimas oriundos de animais de produção, e no presente estudo uma das cepas foi isolada do tanque de expansão, representando um potencial perigo à saúde pública. Pelo resultado da PFGE, observou-se grande diversidade genética da bactéria dentro da propriedade e entre as propriedades. Demonstrou-se que patógenos ambientais multirresistentes estão presentes em rebanhos bovinos leiteiros, não apenas isolados de quadros de infecção intramamária como também de galpões de free stall, membros posteriores dos animais, sala de ordenha e tanque de expansão. Confirmou-se também, a alta variabilidade genética da *K. pneumoniae* em rebanhos bovinos leiteiros mesmo dentro de um mesmo rebanho, e a importância da PFGE como recurso na epidemiologia molecular.

Palavras-chave: ambiente, Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE), *Klebsiella pneumoniae*, leite, mastite, β -lactamases de espectro ampliado (ES β L)

Abstract

ABSTRACT

The present study aimed the isolation of *Klebsiella pneumoniae* from the milk parlor and the animal's environment, including the pre milking room, paddocks and, in some properties the free stall, animal's rectum and hind limbs, bulk tank milk and from all teats positive to the California Mastitis Test (CMT), search for strains producers of extended spectrum β -lactamases (ES β L) and, by the clonal identification, verify if similarities between the strains occurred. In 2.14% (28) of the milk samples collected from the animals it was detected the presence of *Klebsiella pneumoniae* as the pathogen responsible for the intramammary infection (IMI). From environmental swabs and bulk milk tank of the ten properties, it was isolated 79 strains of *K. pneumoniae*. The results of phenotypic detection of the ES β L enzymes production were positive in eight (7.47%) bacterial strains isolated. It is important to know that, in Brazil there are no reports of coliforms producers of these enzymes isolated from livestock animals, and in the present study one of the strains was isolated from the bulk tank milk, representing a potential hazard to public health. The results of PFGE showed high genetic diversity of the bacteria within and between the dairy farms. It was demonstrated that environmental multidrug resistant pathogens are present in dairy herds, isolated from intramammary infections cases, free stall parlors, animal's hindlimbs, milking parlor and bulk tank milk. This study also confirmed the high genetic diversity of *K. pneumoniae* in dairy herds within the same herd, and the importance of PFGE as a molecular epidemiology tool.

Keywords: environment, extended-spectrum β -lactamases (ES β L), *Klebsiella pneumoniae*, mastitis, milk, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A mastite é uma das enfermidades mais comuns em rebanhos bovinos leiteiros, sendo responsável por grande utilização de antimicrobianos em uma propriedade rural. Diversos patógenos já foram associados com a mastite bovina, incluindo bactérias Gram-negativas. Infecções intramamárias causadas por bactérias Gram-negativas como *Klebsiella pneumoniae* geralmente evoluem para quadros de mastites clínicas (HOGAN & SMITH, 2003). Diversos locais de uma propriedade leiteira são considerados como fontes de *Klebsiella* spp., incluindo camas orgânicas e fezes dos animais (MUNOZ et al., 2007). A eliminação desse patógeno pelas fezes dos animais contribui para a presença de uma grande variedade de genótipos desta bactéria presentes no ambiente.

Antimicrobianos β -lactâmicos são utilizados exaustivamente no tratamento de enfermidades tanto no homem como nos animais. Estudos têm sido conduzidos em diversos países para verificar a resistência das enterobactérias aos β -lactâmicos em cepas isoladas de infecções humanas e animais (WATSON et al., 2011). A produção de enzimas β -lactamases é o principal mecanismo de resistência aos antibióticos β -lactâmicos em bactérias Gram-negativas. O desenvolvimento de cefalosporinas de terceira geração auxiliou no combate a bactérias produtoras de β -lactamases. Porém, uma nova classe de enzimas foi relatada, sendo capazes de hidrolisar até mesmo estes novos antimicrobianos. Estas enzimas ficaram conhecidas como β -lactamases de espectro ampliado (ES β Ls), sendo derivadas de β -lactamases comuns.

Mastites causadas por patógenos multirresistentes são relatadas frequentemente nos últimos anos (NAM et al., 2009a). A diversidade de genótipos presentes no ambiente associada à facilidade de aquisição de genes de resistência por se tratar de um patógeno ambiental, fazem de *Klebsiella pneumoniae* um dos patógenos mais preocupantes em produção animal. O presente estudo objetivou verificar o perfil molecular da *Klebsiella pneumoniae* em propriedades de bovinos leiteiros por meio de seu isolamento em diversos pontos das propriedades, e a verificação da produção de enzimas de resistência por estes patógenos.

*R*EVISÃO DA *L*ITERATURA

NÓBREGA, D. B.

2 REVISÃO DA LITERATURA

O leite é um alimento fundamental na dieta do homem, em todas as faixas etárias. Produtos lácteos são utilizados na alimentação de crianças e idosos, o que exige atenção maior quanto a qualidade do produto. A qualidade do leite e dos produtos lácteos que chegam aos consumidores é determinada em grande parte, pela qualidade do leite que é produzido nas propriedades rurais (PHILPOT, 1998).

Apesar de proibido no Brasil desde 1952 estima-se que cerca de metade da produção nacional de leite é comercializada informalmente, sem inspeção sanitária. Ainda que o mercado ofereça várias opções, sabe-se que uma grande parcela da população ainda consome leite cru evidenciando a importância da opinião do consumidor nessa questão. O leite pode representar uma importante via de transmissão de enfermidades oriundas de alimentos, já que, sem tratamento adequado, pode veicular uma série de micro-organismos patogênicos (NERO et al., 2003).

A mastite é uma resposta inflamatória da glândula mamária, sendo a infecção mais frequente nos bovinos leiteiros. As perdas econômicas são causadas pela diminuição na produção de leite, custo com mão de obra, honorários profissionais, medicamentos, morte ou descarte precoce de animais, pela queda na qualidade do produto final e diminuição no rendimento industrial para fabricação dos seus derivados, devido às alterações na composição do leite mastítico (LANGONI, 1995).

Geralmente é detectada pelos seus sinais clínicos, na maioria das vezes anormalidades no leite. Ocorrem também alterações patológicas no tecido glandular mamário. A enfermidade é geralmente local, porém pode se tornar sistêmica principalmente logo após o parto, onde ocorrem casos graves de mastites, que muitas vezes podem ser fatais (HILLERTON & BERRY, 2005).

Nas infecções crônicas, não há sinais clínicos, e esta forma é denominada como mastite subclínica. O diagnóstico é baseado em testes indiretos como a contagem de células somáticas (CCS) do leite. Acomete de 10 a 15% das vacas, aumentando a CCS/mL de leite, reduzindo a produção de leite, e aumentando a contagem de bactérias. Esses fatores contribuem para reduzir o valor do leite, em termos monetários (HILLERTON & BERRY, 2005).

Os prejuízos econômicos são grandes, os quais incluem diminuição na capacidade de produção, descarte do leite de animais sob tratamento antimicrobiano, reposição de animais abatidos ou mortos, custos com mão de obra envolvendo tratamento e monitoramento dos animais, serviços veterinários, abortos no primeiro trimestre de gestação de animais com mastite clínica e gastos com medidas de controle. O custo anual da mastite em um rebanho leiteiro é estimado em 10% do total do valor obtido com a venda do leite, e cerca de 2/3 destas perdas são devidas a queda de produção de leite de animais acometidos (RADOSTITS et al., 2007).

GROHN et al. (2004) verificaram que a queda na produção de leite de animais com mastite depende do patógeno causador. Entre os principais responsáveis pela queda de produção, enteropatógenos como *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp. foram responsáveis pelas maiores quedas na produção de leite, juntamente ao *Staphylococcus aureus*.

A CCS do leite pode variar segundo diversos fatores, como idade do animal, estágio de lactação, estresse, época do ano e nutrição, mas o fator mais preocupante que aumenta a quantidade de células somáticas é a presença de mastite no rebanho (MAGALHÃES et al. 2006), sendo a CCS um recurso importante para monitorar a saúde da glândula mamária e consequentemente a qualidade do leite oferecida para consumo.

O California Mastitis Test (CMT) é um método confiável para detecção de animais com mastites subclínicas. Foi desenvolvido em 1957 e baseia-se em um detergente que reage com o DNA no núcleo das células e com um indicador de pH que muda de coloração quando o pH do leite chega a um valor maior do que o seu normal de 6,6. O leite de animais mastíticos normalmente possui um pH igual ou maior a 6,8 (RADOSTITS et al., 2007).

A diversidade de micro-organismos é ampla na etiologia das mastites (COSTA et al. 1998). Os mais encontrados são *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp e *Corynebacterium* spp. Outros como *Mycoplasma bovis*, *Mycobacterium bovis*, *Brucella abortus* e *Listeria monocytogenes* também podem ser encontrados, embora com menor frequência. Alguns desses

patógenos podem também causar infecções no homem, e daí a importância do controle de qualidade na produção láctea (RYSER, 1998).

São conhecidos cerca de 140 patógenos já isolados da glândula mamária de bovinos, e que podem ser causadores de mastite. Baseado na sua epidemiologia e fisiopatologia da infecção, podem ser classificados em contagiosos, oportunistas e ambientais (RADOSTITS et al., 2007). *E. coli* e outros coliformes como *Klebsiella* spp. são exemplos de patógenos ambientais. Causam as mastites ambientais pois estão presentes no ambiente onde são criados os animais, sendo a erradicação destes patógenos impossível (ZADOKS, 2002). As mastites por coliformes continuam a crescer, e vem se tornando importantes em rebanhos bovinos leiteiros (SUOJALA et al., 2008). Mastites causadas por patógenos ambientais como os coliformes são hoje a forma predominante da enfermidade em rebanhos bem manejados (NAM et al., 2009a)

Além das alterações visíveis no leite e custos com tratamentos, existe ainda a queda de produtividade e risco de morte dos animais devido aos quadros de mastites clínicas causadas por patógenos ambientais (WILSON et al., 2008).

O grande reservatório de patógenos ambientais é o local no qual o rebanho leiteiro é explorado, e a exposição de quartos mamários saudáveis aos patógenos ocorrerem em qualquer momento da vida do animal. Em contrapartida, o reservatório de patógenos causadores de mastite contagiosa é o próprio animal, e a infecção de quartos mamários sadios é restrita ao processo de ordenha (ZADOKS et al., 2001).

Os aspectos das instalações podem influenciar na ocorrência de mastites, principalmente as ambientais. A falta de manejo sanitário adequado no sistema de estabulação e confinamento do rebanho, como pisos e camas contaminadas com excesso de umidade e matéria orgânica, são os grandes responsáveis pelo aumento de casos de mastites ambientais (LANGONI, 2007).

HOGAN et al. (2007) verificaram que o galpão de “free stall” com camas de material orgânico são uma fonte comum de contaminação dos tetos dos animais aos patógenos mastíticos ambientais. As fontes de coliformes no ambiente incluem também bezerreiros e quaisquer outras áreas nas quais os

animais agregam-se entre ordenhas, incluindo as próprias salas de pré-ordenha (McCLURE et al., 1994).

A mastite ambiental está associada a três grandes grupos de patógenos: os coliformes (particularmente *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp.), *Streptococcus uberis* e *Arcanobacterium pyogenes*. A principal forma de transmissão destes patógenos para os bovinos é o manejo inadequado do meio ambiente. O controle destes patógenos se dá pela sanitização adequada do meio ambiente, boa preparação do teto pré-ordenha e técnicas de controle de moscas. Existem evidências de que, quando o rebanho apresenta a mastite contagiosa sob controle, a mastite clínica causada por patógenos ambientais tende a se tornar mais frequente (RADOSTITS et al., 2007).

Algumas práticas de controle de mastite permitiram aos produtores o controle satisfatório sobre *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*, que são microrganismos contagiosos. Contudo, patógenos ambientais como *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* tornaram-se os maiores desafios, exigindo cada vez mais novos métodos de combate à mastite (BRITTEN et al., 1998; JAYARAO et al., 1999; PETERSSON-WOLFE et al., 2008; KRISTULA et al., 2008). As perdas pelas mastites por *K. pneumoniae* são maiores quando comparadas às perdas causadas por *E. coli*, em termos de produção de leite e sobrevivência dos animais (MUNOZ et al., 2006).

K. pneumoniae é um patógeno comum de mastite clínica em rebanhos leiteiros. Objetos de madeira são considerados como as principais fontes do patógeno nas propriedades. Higiene do ambiente e a utilização de material inorgânico como a areia para cama dos animais são os procedimentos recomendados para o controle da mastite por *K. pneumoniae*. Mesmo assim, a mastite por *Klebsiella* ocorre comumente em propriedades bem manejadas que utilizam areia como cama para os animais (MUNOZ et al., 2006),

MUNOZ et al. (2006) verificaram que animais adultos saudáveis são responsáveis pela contaminação do meio ambiente por *Klebsiella* spp. a partir das fezes e que a utilização de camas de material inorgânico auxiliou na redução da incidência de mastites por este patógeno; porém, mesmo assim, o patógeno persiste no ambiente. Observaram também que o patógeno podia ser isolado de camas de materiais orgânicos e inorgânicos e destacaram a importância da higiene do ambiente para controle deste patógeno.

MUNOZ & ZADOKS (2007) destacaram que *Klebsiella* spp. pode ser isolada de diversos locais no ambiente dos animais. Afirmaram que sua eliminação pelos animais para o meio ambiente é aleatória, possivelmente relacionada ao estado imune dos animais, confirmando assim, a importância do manejo nutricional e sanitário adequado do rebanho para o controle da mastite.

As mastites por *K. pneumoniae* podem ser particularmente severas, pela fraca resposta dos animais aos antibióticos tradicionais e o quadro apresentar rápida evolução para o choque tóxico e óbito (PAULIN-CURLEE et al., 2007).

Os coliformes e outros enteropatógenos têm apresentado grande destaque nos casos de mastites, por apresentarem grande resistência aos antimicrobianos tradicionais, e serem considerados responsáveis por surtos de intoxicações alimentares em seres humanos (NAM et al., 2009b). Bactérias isoladas em quadros de mastites por coliformes refletem muitas vezes o perfil de resistência microbiológica do rebanho (NAM et al., 2009a)

A presença de genes de resistência na cepa bacteriana aumenta seu espectro de resistência e sua probabilidade de disseminação, o que justifica a importância do estudo da prevalência destas cepas para a epidemiologia do patógeno (DROPA, 2006).

A resistência bacteriana é uma preocupação mundial e não envolve apenas os coliformes e enterobactérias (WELDHAGEN et al, 2003; BAL et al, 2010). A colonização do úbere por patógenos de caráter zoonótico multirresistentes durante a lactação ou período seco, envolve não apenas a indústria leiteira, mas também a saúde pública (HAMMAD et al, 2008).

A administração de drogas durante a secagem ou o tratamento ineficaz de casos de mastites pode exercer pressão para seleção e manutenção de genes de resistência antimicrobiana. Além disto, não necessariamente o patógeno multirresistente é resultado de um tratamento intramamário mal sucedido. Coliformes são considerados patógenos ambientais e este tipo de patógeno possui maior contato com populações bacterianas dentro de um ambiente, o que facilita a troca de material genético como os plasmídeos. Tratamentos sistêmicos resultam em excreção de resíduos de antimicrobianos pelas fezes, urina e leite dos animais. Resíduos dos antimicrobianos colaboram com a seleção de patógenos no ambiente e, pela transferência de material genético, novas bactérias adquirem genes de resistência. Estes patógenos

multirresistentes podem, em condições adequadas, infectar a glândula mamária. Além disso, microrganismos produtores de enzimas de resistência, podem ser encontrados naturalmente no solo, o que propicia que os coliformes adquiram estes de genes de resistência (HAMMAD et al, 2008).

A terapia da vaca seca é adotada mundialmente, principalmente com princípios β -lactâmicos como as penicilinas (RAJALA-SCHULTZ et al, 2004). A penicilina segue como uma das drogas mais utilizadas em medicina veterinária (PITKALA et al, 2007).

A produção de enzimas β -lactamases é o principal mecanismo de resistência aos antibióticos β -lactâmicos em bactérias Gram-negativas. Estas enzimas podem estar presentes também em outros patógenos como os estafilococos (BAL et al, 2010), porém ganham destaque cada vez maior em enterobactérias, catalisando a hidrólise do anel β -lactâmico e inativando a ação de vários antimicrobianos desta classe. Os tratamentos excessivos e mal conduzidos com β -lactâmicos são apontados como responsáveis pelo aumento da incidência de bactérias produtoras de β -lactamases (BRADFORD 2001).

O desenvolvimento de cefalosporinas de terceira geração auxiliou no combate a bactérias produtoras de β -lactamases. Porém, uma nova classe de enzimas foi relatada, sendo capazes de hidrolisar até mesmo estes novos antimicrobianos. Estas enzimas são conhecidas como β -lactamases de espectro ampliado (ES β LS), sendo derivadas de β -lactamases comuns. Pertencem ao Grupo 2 de Bush (mais precisamente subgrupo 2be pois são derivadas de β -lactamases do grupo 2b) e também a grande maioria à classe A de Ambler.

As ES β LS se evidenciaram a partir da década de 80, quando cefalosporinas de amplo espectro, como ceftazidima, cefotaxima e ceftriaxona foram utilizadas com frequência nas infecções causadas por bactérias gram-negativas. Pela utilização mundial destes medicamentos, as ES β LS são relatadas em diversos países (PATERSON et al, 2003). A incidência vem crescendo mundialmente (RYOO et al, 2005). Patógenos como *Proteus* spp., *K. pneumoniae* e *E. coli* têm revelado a produção destas enzimas (PAGANI et al, 2002).

As ES β LS são alvo de estudos em patógenos isolados de pacientes humanos (RYOO et al, 2005). Nos últimos anos, a atenção dada a estas

enzimas aumentou em medicina veterinária, principalmente pelo maior número de relatos da presença destas em amostras oriundas de animais domésticos. Em cinco de 22 enterobactérias isoladas de amostras de leite mastítico foram encontrados genes ligados a produção de ESβLs (LOCATELLI et al, 2009), destacando a importância do monitoramento molecular em amostras bacterianas oriundas de propriedades rurais. Estes autores apontaram a higiene do úbere e a terapia antimicrobiana adequada, como ferramentas importantes para a prevenção da aquisição de genes de resistência por estas bactérias. Até mesmo drogas como o ceftiofur acabam sendo ineficientes nestas situações (DESHPANDE et al., 2000). NAM et al. (2009a) verificaram que a grande maioria dos antimicrobianos β-lactâmicos testados, particularmente cefalotina e ampicilina apresentaram menor atividade contra bacilos gram-negativos isolados de mastites clínicas.

A detecção da produção de β-lactamases pode ser realizada de diversas maneiras. Métodos baseados em coloração podem apresentar reduzida sensibilidade e especificidade devido a reações enzimáticas incompletas (PITKALA et al, 2007), recomendando-se sempre outros métodos complementares de acordo com o tipo de enzima em questão. Para detecção fenotípica da produção de ESβL utiliza-se geralmente o método de disco-difusão em ágar Müller Hilton ou a concentração mínima inibitória (CIM) a princípios β-lactâmicos associados ou não ao ácido clavulânico (disco-difusão sinérgica). Neste tipo de prova, verifica-se a resistência do patógeno a princípios β-lactâmicos. Se há produção de alguma ESβL, o patógeno é resistente a algum princípio avaliado e apresenta sensibilidade reduzida frente à sinergia entre o ácido clavulânico e o β-lactâmico, mostrando zonas irregulares quando há associação (*ghost zones*).

No contexto da epidemiologia molecular, as técnicas moleculares podem ser aplicadas tanto para o hospedeiro quanto para os patógenos causadores de enfermidades. Quando utilizada para fins de epidemiologia de doenças infecciosas, os objetivos das técnicas moleculares incluem a identificação dos micro-organismos e de suas fontes, as suas relações biológicas, suas vias de transmissão e o estudo de genes responsáveis pela suas características, como virulência. Em casos de mastites, as técnicas moleculares têm sido utilizadas para diferenciar infecções persistentes de casos de novas infecções, estudar

genes de virulência, identificar possíveis alvos para desenvolvimento de vacinas e para monitorar fontes de patógenos causadores de intoxicações alimentares em humanos, bem como a resistência aos antimicrobianos tradicionais (ZADOKS, 2002).

A eletroforese em campo pulsado (PFGE) tem grande poder de diferenciação genética. As grandes desvantagens deste método é que é laboroso, de alto custo, além de ser um método de difícil interpretação, principalmente quando é realizado um grande número de isolamentos (ZADOKS et al., 2002).

PAULIN-CURLEE et al. (2008) demonstraram que diferentes genótipos de *K. pneumoniae* podem causar mastite no mesmo rebanho. A origem do patógeno pode ser de diversas fontes, o que justifica a realização de estudos para caracterização genética na identificação da origem do patógeno. A técnica de PFGE permitiu a verificação do mesmo genótipo de *K. pneumoniae* no leite de animais com mastite clínica, na cama dos animais e no tanque de refrigeração. Não foi possível estabelecer a origem da infecção, sugerindo que novos pontos fossem analisados quanto à presença do patógeno.

Há falta de estudos sobre os aspectos epidemiológicos que possam auxiliar o produtor rural no controle adequado sobre um dos principais patógenos das mastites ambientais, *Klebsiella pneumoniae*. O presente estudo visou o isolamento microbiano a partir do leite e do tanque de refrigeração, bem como a partir de “swabs” de pontos da sala de ordenha, do ambiente e dos animais e realizar a identificação clonal dos isolados a fim de se determinar a distribuição de genótipos de *Klebsiella pneumoniae* isoladas das amostras de leite dos tetos e do tanque, bem como dos diferentes pontos pesquisados, além de pesquisar a prevalência de *K. pneumoniae* produtoras de ES β L em todas as propriedades avaliadas, para auxiliar no entendimento da epidemiologia deste micro-organismo.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

- 1 Avaliar a ocorrência de patógenos contagiosos e ambientais causadores de mastite subclínica e clínica em rebanhos bovinos de dez propriedades leiteiras com sistema de ordenha mecânica, localizadas em diferentes municípios do Estado de São Paulo
- 2 Isolar e identificar bioquimicamente as amostras de *Klebsiella pneumoniae*, procedentes do leite dos tetos dos animais, do tanque de resfriamento e a partir de "swabs" da sala de ordenha, sala de pré-ordenha, piquetes e em algumas propriedades, galpões de "free stall", e do reto e membros posteriores dos animais;
- 3 Verificar a produção de β -lactamases em cepas de *Klebsiella pneumoniae* isoladas nas diferentes propriedades;
- 4 Realizar a Contagem de Células Somáticas (CCS) das amostras de leite compostas;
- 5 Realizar a identificação clonal das cepas de *Klebsiella pneumoniae* isoladas dos tetos, do reto e membros posteriores dos animais, do tanque de refrigeração, bem como da sala de ordenha e dos ambientes dos animais, pela técnica de Eletroforese em Campo Elétrico Pulsado (Pulsed Field Gel Electrophoresis - PFGE), a fim de se determinar a distribuição de genótipos deste patógeno, e avaliar a sua relação nas diferentes propriedades.

MATERIAL E ***M***ÉTODOS

NÓBREGA, D. B.

4 MATERIAL E MÉTODOS

As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório do Núcleo de Pesquisas em Mastites (NUPEMAS), do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, UNESP- Campus de Botucatu (SP) e a pesquisa molecular foi realizada no Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências – IB - UNESP – Campus de Botucatu (SP).

4.1 Propriedades rurais

Foram visitadas dez (10) propriedades leiteiras localizadas em diferentes municípios do Estado de São Paulo, obtendo-se amostras de leite de todas as vacas em lactação quando possível. Em casos de numero elevado de animais, apenas alguns foram amostrados (amostra intencional selecionada com base em estudo prévio da CCS do leite dos animais). Todas as propriedades apresentavam tanque de expansão e utilizavam sistema de ordenha mecânica.

As propriedades visitadas são apresentadas no Quadro 1.

QUADRO 1. Presença ou ausência de galpões de free stall, equipamento de ordenha, número de animais em lactação, produção leiteira média diária, realização de pré-dipping (Pre), pós-dipping (Pos), higienização prévia a ordenha (Hig_Pre) e prática de fornecimento de alimentação na pós-ordenha (Aliment) e contagem de células somáticas do tanque de expansão (CCS x 10³ células/mL) das 10 propriedades (P). Botucatu, SP, 2011.

P	Freestall	Ordenha	Animais	Produção	Pre	Pos	Hig_Pre	Aliment	CCS
1	Não	Duplo 4	74	700	Não	Sim	Não	Sim	528
2	Sim	Carrocel de 18	320	5800	Sim	Sim	Não	Sim	253
3	Sim	Duplo 20	970	34000	Sim	Sim	Sim	Sim	380
4	Não	Linha de 5	113	2900	Sim	Sim	Não	Sim	634
5	Sim	Duplo 5	96	2300	Sim	Sim	Não	Sim	763
6	Sim	Duplo 17	580	19800	Sim	Sim	Sim	Sim	113
7	Não	Duplo 4	96	2300	Sim	Sim	Não	Sim	826
8	Não	Linha de 4	46	1050	Sim	Sim	Não	Sim	590
9	Não	Linha de 6	92	900	Sim	Sim	Não	Não	392
10	Sim	Linha de 4	26	530	Sim	Sim	Não	Não	150

4.2 Questionário Epidemiológico

Em cada uma das propriedades visitadas foi aplicado questionário epidemiológico de acordo com o modelo proposto no **anexo 1**. De todos os animais estudados foram obtidas planilhas contendo informações como número de lactação, produção média de leite do dia anterior e dias em lactação.

A Tabela 1 traz informações sobre o número de lactações dos animais envolvidos no experimento.

TABELA 1. Frequência absoluta (n), frequência relativa (%), frequência absoluta acumulada (NA) e frequência relativa acumulada (%A) referente ao número de lactação dos animais. Botucatu, SP, 2011.

Lactação	N	%	NA	%A
Uma lactação	452	39,51	452	39,51
Duas lactações	322	28,15	774	67,66
Três lactações	176	15,38	950	83,04
Quatro ou mais lactações	194	16,96	1144	100

A Tabela 2 traz informações sobre a produção de leite dos animais envolvidos no experimento.

TABELA 2. Frequência absoluta (n), frequência relativa (%), frequência absoluta acumulada (NA) e frequência relativa acumulada (%A) referente a produção de leite dos animais. Botucatu, SP, 2011.

Produção	N	%	NA	%A
Até 15 litros	219	19,14	219	19,14
15 a 25 litros	400	34,97	619	54,11
25 a 35 litros	342	29,9	961	84
Acima de 35 litros	183	16	1144	100

A Tabela 3 traz informações sobre os dias em lactação dos animais envolvidos no experimento.

TABELA 3. Frequência absoluta (n), frequência relativa (%), frequência absoluta acumulada (NA) e frequência relativa acumulada (%A) referente aos dias em lactação (DEL) dos animais. Botucatu, SP, 2011.

DEL	N	%	NA	%A
Até 120 dias	216	18,88	216	18,88
120 a 240 dias	399	34,88	615	53,76
240 a 360 dias	308	26,92	923	80,68
Acima de 360 dias	221	19,32	1144	100

4.3 Coleta do leite dos animais

Foram avaliados 4596 tetos de 1144 animais em lactação. Os tetos dos animais em lactação foram lavados previamente com água e secos com toalha de papel descartável. Previamente a coleta do leite, foi realizado o CMT segundo SCHALM & NOORLANDER (1957) em todos os tetos utilizando-se de kit disponível comercialmente. Daqueles que apresentaram reação a partir de uma cruz, foram coletadas as amostras de leite em tubos de vidro esterilizados para realização do exame microbiológico, após a antissepsia do óstio do teto com algodão embebido em álcool iodado. Estas foram encaminhadas ao laboratório, sob refrigeração, em caixa isotérmica contendo gelo reciclável.

4.4 Contagem de células somáticas

De todos os animais em lactação, foram colhidos cerca de 30 mL de leite para realização da contagem de células somáticas (CCS) em aparelho Somacount 300 (Bentley), previamente calibrado.

4.5 Coleta do leite dos tanques de expansão

Foram colhidas amostras de 30 mL de leite de tanques (leite total) de cada uma das propriedades visitadas, após homogeneização adequada. As mesmas foram acondicionadas em frascos esterilizados e encaminhadas ao laboratório sob temperatura de refrigeração.

4.6 Cultivo microbiológico

O cultivo microbiológico foi realizado de acordo com o National Mastitis Council (NMC 1999). Inicialmente 0,01 mL de leite foram semeados em placas de Petri contendo 20 mL de meio de Ágar Sangue ovino 5% e Ágar MacConkey. As placas foram incubadas em condições de aerobiose à temperatura de 37°C por até 72 horas, com observação do desenvolvimento microbiano às 24, 48 e 72 horas. Este exame foi realizado em amostras de leite de animais que apresentaram positividade à prova do CMT e do leite

proveniente dos tanques de expansão. Colônias isoladas foram estudadas morfológicamente e submetidas a coloração de Gram. *Staphylococcus* foram submetidos a prova da coagulase e classificados como *Staphylococcus* coagulase positivos ou *Staphylococcus* coagulase negativos. Cocos gram positivos catalase negativos foram classificados como da família Streptococcaceae e submetidos a prova de CAMP e hidrólise de esculina para classificação. Em alguns casos, não foi realizada a diferenciação entre *Streptococcus* ambientais, sendo estes agrupados em *Streptococcus* spp. Cocobacilos gram positivos dispostos em formas de clavas foram considerados como do gênero *Corynebacterium* spp., e classificados como *C. bovis*. Placas de Agar sangue contendo mais do que duas colônias foram consideradas como contaminadas. As colônias suspeitas de serem *Klebsiella* spp. foram submetidas às provas bioquímicas para confirmação de acordo com QUINN et al. (2005) e, posteriormente congeladas em glicerol 20%, conforme descrito no item 4.9, para estudo posterior.

4.7 Coleta de material da sala de ordenha, ambiente e dos animais

4.7.1 Propriedades com sistema "free stall"

Das dez propriedades visitadas, cinco apresentavam o sistema "free stall". Coletaram-se amostras em dois pontos da sala de ordenha, em oito pontos estratégicos do "free stall" e em dois pontos das salas de pré-ordenha. Os pontos estratégicos no "free stall" incluíram oito amostragens de camas dos animais (swabs de cama – areia ou maravalha). No caso de mais de um galpão na propriedade, os oito swabs eram divididos de maneira a amostrar todos os galpões por igual. Foram utilizados swabs estéreis, que foram colocados em contato com o ponto escolhido para a coleta e friccionados por cerca de um minuto. Após este procedimento, foram colocados em tubos de vidro estéreis contendo 3 mL de solução salina tamponada (PBS) pH 7,2 estéril e armazenados sob refrigeração, até a chegada ao laboratório.

4.7.2 Propriedades sem sistema "free stall"

Das cinco propriedades que não apresentaram o sistema "free stall", foram realizadas coletas de amostras de dois pontos da sala de ordenha, dois

pontos das salas de pré-ordemha e em oitos pontos estratégicos dos piquetes dos animais. Os pontos estratégicos nos piquetes foram escolhidos como pontos nos quais os animais permaneciam em repouso, geralmente pontos cobertos nos quais os animais deitavam-se expondo os orifícios dos tetos. Em cada coleta, foram utilizados swabs estéreis, que foram colocados em contato com o ponto escolhido para a coleta e friccionados por cerca de 1 minuto. Após este procedimento, foram imediatamente depositados em tubos de vidro estéreis contendo 3 mL de solução salina tamponada (PBS) pH 7,2 estéril e armazenados sob refrigeração, até a chegada ao laboratório.

4.7.3 Coleta de swabs de animais

Para a coleta de amostras de fezes, foi utilizado swab estéril introduzido via retal em seis animais escolhidos aleatoriamente, friccionando-se cuidadosamente por 30 segundos na parede retal. A seguir foram imediatamente colocados em tubo de ensaio contendo 3,0 mL de solução salina estéril. Também de outros seis animais aleatórios, foram coletadas amostras da região glútea. Foi utilizado apenas um swab estéril para ambos os membros de cada animal, friccionando-se em direção proximal-distal por aproximadamente 30 segundos. Após a coleta, procedeu-se como descrito anteriormente.

4.8 Exames microbiológicos dos swabs

Inicialmente, foi transferido 1 mL da solução obtida para um microtubo. Foram realizadas diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} utilizando-se solução salina tamponada (PBS) pH 7,2, as quais foram pré-incubadas a 37° C por 4 horas. A seguir foram cultivados 0,1 mL de cada diluição em placas de ágar MacConkey contendo 10 mg/L de ampicilina, distribuindo-se o inóculo com auxílio de alça de Drigalsky. As placas foram incubadas em condições de aerobiose à temperatura de 37°C por até 72 horas, com observação do desenvolvimento microbiano às 24, 48 e 72 horas. Caso houvesse crescimento exagerado de bactérias (cerca de 800 bactérias por placa) impossibilitando a caracterização de colônias com características de *Klebsiella* spp., foram procedidas diluições para verificação da presença do patógeno, por meio do acondicionamento do

swab em solução salina tamponada. Crescimento de colônias róseo-amareladas, de 1 a 7 mm de diâmetro, mucóides, lactose positivas no ágar MacConkey, foram consideradas suspeitas de *Klebsiella* spp (MUNOZ et al., 2007). Estas colônias foram utilizadas para as provas bioquímicas utilizando-se meios de cultura sólidos e semi-sólidos, distribuídos em tubos de ensaio. Foram utilizados os tubos de identificação EPM, MILI e Citrato de Simmons. Linhagens de *Klebsiella* são motilidade negativas e citrato positivas. Para diferenciação entre *K. pneumoniae* e *K. oxytoca*, foi realizada a prova do indol. Indol positivo foi considerado *K. oxytoca* e indol negativo *K. pneumoniae* (QUINN et al., 2005).

4.9 Protocolo de congelamento

A bactéria isolada no meio ágar MacConkey acrescido de ampicilina foi repicada para o meio de Infusão de Cérebro Coração (BHI) e incubada a 37°C durante 24 horas. Tendo-se o crescimento bacteriano, procedeu-se o congelamento da bactéria, acrescentando-se 800 µL de glicerol P.A. em 3200 µL de água Mili-Q estéril em tubos de ensaio previamente esterilizados. Foram adicionados 200 µL dessa solução de glicerol a 20% em tubos criogênicos estéreis, acrescido de 800 µL de caldo BHI contendo a bactéria a ser congelada. Os tubos foram acondicionados em freezer a -80°C (NMC, 1999).

4.10 Identificação fenotípica das cepas produtoras de ESβL

Os isolados de *K. pneumoniae* foram submetidos a identificação fenotípica para verificar se o patógeno isolado era produtor de β-lactamases de espectro ampliado (ESβL).

O método de triagem para detecção de cepas produtoras de ESβL foi baseado no perfil de sensibilidade. As amostras produtoras de ESβL foram identificadas utilizando-se o teste da disco-difusão dupla associada (SANTOS, 2007).

Para cada cepa de *K. pneumoniae*, uma suspensão bacteriana foi feita utilizando-se solução salina a 0,9% e a turbidez foi ajustada a escala 0,5 de McFarland. Após a homogeneização da suspensão, esta foi semeada em placa

de Petri contendo ágar Müller-Hinton (Oxoid®), utilizando-se swab estéril, o qual foi previamente umedecido com a suspensão bacteriana, retirando-se o excesso por compressão contra as paredes do tubo. A inoculação no ágar foi feita em toda a extensão da placa e repetida por três vezes, girando-se a placa. Após 15 minutos, os discos de difusão foram colocados sobre o ágar com o auxílio de uma pinça. Para o método de disco de aproximação foram utilizados: amoxicilina/ácido clavulânico (20µg /10µg) (Sensifar, Brasil), aztreonam (30µg), ceftriaxona (30µg), ceftazidima (30µg), cefotaxima (30µg) e cefpodoxima (30µg) (Oxoid®). Para esta metodologia o disco de amoxicilina/ácido clavulânico (20µg /10µg) foi colocado a 20 mm centro a centro de cada β-lactâmico testado.

O diâmetro dos halos de inibição foi medido após a incubação à temperatura de 35°C, por 18 a 24 horas (halos de inibição > 22 mm para cefpodoxima, >27 mm para aztreonam, > 27 mm para cefotaxima, > 25 mm para ceftriaxona e > 22 mm para ceftazidima). O teste foi considerado positivo quando houve ampliação do halo de inibição em algum β-lactâmico ou a formação de uma terceira zona irregular de inibição, a zona fantasma (“ghost zone”), entre o disco composto e o disco de β-lactâmico. O controle de qualidade foi realizado utilizando-se as amostras da American Type Culture Collection (ATCC) de *K. pneumoniae* ESβL ATCC 700603 e *Escherichia coli* 25922.

4.11 Eletroforese em Campo Elétrico Pulsado

Para a prova da eletroforese em campo pulsátil (PFGE) adotou-se o protocolo de DURMAZ et al, 2009 com pequenas modificações.

Preparação da suspensão bacteriana: Repicou-se a bactéria congelada em meio de Agar sangue ovino. Após 24 horas, as colônias foram diluídas em solução tampão de suspensão (STS; 100 mM Tris-HCl [pH 8,0], 10 mM EDTA). A concentração de células foi ajustada para 1,0 de absorbância a 590 nm utilizando-se o equipamento NanoVue Plus™ (GE, Healthcare). A suspensão foi mantida a temperatura ambiente antes de ser misturada a agarose low-melting (o tempo de espera não foi superior a 10 minutos).

Preparação dos plugs: Na STS, 2% de agarose low-melting (Gibco BRL, Paisley, UK) foi preparada. Após completa dissolução da agarose em micro-ondas, esta foi mantida em banho-maria a 45° C até sua utilização. Após esfriamento da solução de agarose, foi adicionado sodium dodecyl sulfato (SDS) com concentração final de 1%. Alíquotas (200 µL) de agarose + SDS foram preparadas em microtubos de 1,5 mL e mantidas a 45° C. Um volume equivalente de suspensão bacteriana (200 µL) foi adicionado ao microtubo e homogeneizado por pipetagem no mínimo 3 vezes. Cerca de 200 µL desta solução foi adicionada aos moldes de plugs (10 mm x 5 mm x 11,5 mm, Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif., USA). Os moldes foram mantidos a -10° C por 10 minutos.

Lise das células dos plugs: 650 µL de solução de lise 1 (CLS-1; 50 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, lisozima [2,5 mg/mL], proteinase K [1,5 mg/mL], pH 8,0) foram adicionados em tubos de polipropileno de 5 mL estéreis. Os plugs foram removidos dos moldes com o auxílio de uma lâmina de bisturi e foram dispensados nos tubos (um plug por solução). A lise celular se deu a 37° C em banho maria por uma hora. Após este período, os plugs foram transferidos para tubos novos de polipropileno contendo 650 µL de solução de lise 2 (CLS-2; 0,5 M EDTA [pH 8,0], 1% de sarcosyl e proteinase K [400 µg/mL]) e incubados a 55° C por duas horas em banho maria.

Lavagem dos plugs: A CLS-2 foi removida dos tubos e estes foram lavados três vezes com água ultra pura estéril e três vezes com tampão TE (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 7,6) utilizando-se 4 mL por etapa. As lavagens foram realizadas a 50° C em banho maria. Após a última lavagem, 5 mL de tampão TE fresco foi adicionado aos plugs e estes foram mantidos a 4° C até a etapa de digestão.

Digestão do DNA: Cerca de um quarto de cada plug foi obtido com a utilização de bisturi e colocado em tubo de microcentrífuga contendo 100 µL de tampão de restrição (1X) com albumina sérica bovina (100 µL/mL) e incubado por 10 minutos a 37° C. Após este período, o tampão foi removido e adicionado novo tampão contendo 40 U da enzima *Xba* I (New England Labs, USA). As amostras foram incubadas por 2 horas a 37° C.

Preparo do gel de corrida: 1% de pulsed-field certified agarose (Bio-Rad Laboratories) foi preparado em TBE 0,5 X (44,5 mM Tris base, 44,5 mM ácido

bórico e 1 mM EDTA pH 8,0). Após completa dissolução, a agarose foi esfriada a 45-50° C. Os plugs digeridos foram cuidadosamente adicionados nos poços evitando-se a formação de bolhas.

Eletroforese: O gel foi disposto na câmara de eletroforese coberto por 1.900 mL de tampão TBE 0,5X. A eletroforese foi conduzida em equipamento CHEF-DR III (Bio-Rad Laboratories) a 14° C, com 6 V/cm² por 20 horas. Os “switch times” iniciais e finais foram 5 s e 30 s respectivamente.

Análise do gel: O gel foi analisado utilizando-se o software BioNumerics 6.1 (Applied Maths) por meio do coeficiente de Dice. Foi adotado 1.0% de tolerância e otimização. A análise de cluster foi conduzida utilizando-se o “unweighted pair group method using arithmetic average” (UPGMA). As cepas foram classificadas como indistinguíveis, relacionadas fortemente, pouco relacionadas ou diferentes (TENOVER et al, 1997).

4.12 Análise Estatística

Foram calculadas frequências absolutas e relativas do isolamento da *K. pneumoniae* nas diferentes propriedades, tanto oriundo do leite dos animais, do tanque de expansão e dos swabs realizados. Foi definida como presença de infecção intramamária (IMI) o isolamento de um patógeno microbiano a partir de amostras de leite oriunda dos animais. A análise foi conduzida de acordo com a unidade experimental em questão:

4.12.1 Tetos

Foram avaliados os tetos e os escores de CMT mais frequentes nos casos de IMI por *K. pneumoniae*. Em casos de infecções mistas, considerou-se apenas o patógeno maior como responsável pelo quadro. Em caso de infecções por dois patógenos maiores, considerou-se o patógeno presente em maior quantidade como responsável. Calculou-se a frequência de isolamento de patógenos ambientais e da *K. pneumoniae* a partir do leite dos tetos dos animais por propriedade.

4.12.2 Animais

Os animais foram categorizados de acordo com número de lactação (1 = primeira lactação; 2 = segunda lactação; 3 = terceira lactação; e 4 = quarta lactação ou superior), produção de leite (1= 0 a <15 litros; 2= de 15 a <25; 3= de 25 a <35 litros e 4= igual ou maior que 35 litros) e dias em lactação (1= 0 a <120 dias; 2= de 120 dias a <240 dias; 3= de 240 a <360 dias; e 4= igual ou maior que 360 dias).

Foi calculada a frequência dos patógenos isolados considerando-se o animal como unidade experimental. Em casos de infecções mistas, considerou-se apenas o patógeno maior como responsável pelo quadro. Em caso de infecções por dois patógenos maiores, considerou-se o patógeno presente em maior quantidade como responsável pelo quadro de IMI.

Foi aplicado modelo linear misto generalizado considerando a presença/ausência de IMI por *Klebsiella pneumoniae* em qualquer um dos quatro tetos do animal como variável dependente e os escores de número de lactação, produção de leite e dias em lactação como variáveis independentes. Adotou-se a propriedade como fator aleatório visando eliminar a influência das diferentes propriedades na variável dependente. Adotou-se também a distribuição binária referente a variável dependente.

Foram obtidos valores médios de contagem de células somáticas para os diferentes patógenos isolados, inclusive para *K. pneumoniae*. Os valores foram apresentados de duas maneiras: valores obtidos sem transformação e valores convertidos para a escala logarítmica (base 10).

4.12.3 Propriedades

Optou-se por não realizar análises envolvendo estes dados devido ao baixo número de propriedades no presente estudo. Foram calculadas frequências absolutas e relativas das variáveis do questionário.

4.12.4 Swabs

Foram calculadas as frequências de isolamento de *K. pneumoniae* dos diferentes pontos de coleta dos swabs e por propriedade.

4.12.5 Resistência antimicrobiana e ES β L

Foram calculadas frequências absolutas e relativas da presença de cepas produtoras de ESβLs nas bactérias isoladas. Calculou-se o perfil de resistência às diferentes drogas por meio de frequências absolutas e relativas.

Optou-se por não aplicar técnicas de modelagem e outros tipos de análises nos resultados referentes aos swabs e ESβLs principalmente pelo fato do número de swabs não terem sido o mesmo para todos os pontos de coleta. Além disto, o fato de não ter sido isolado o patógeno de algum ponto não significa que este não estava presente em todo o local a ser avaliado. Para todas as análises, foi utilizado o software SAS (SAS 2008). O valor de *P* foi analisado a 5% de significância.

***R*ESULTADOS**

5 RESULTADOS

5.1 Tetos

Foram avaliados 4596 tetos. Os resultados obtidos à prova do CMT bem como o número de tetos perdidos e mastites clínicas estão apresentados na Tabela 4.

TABELA 4. Frequência absoluta (N), frequência relativa (%), e frequência relativa válida acumulada (%A) dos resultados da prova do California Mastitis Test (CMT) bem como número de tetos perdidos e mastites clínicas. Botucatu, SP, 2011.

Resultado	N	%	%A
Negativo	3033	65,99	65,99
Uma cruz	181	3,94	69,93
Duas cruzes	286	6,22	76,15
Três cruzes	882	19,19	95,34
Mastite clínica	38	0,83	96,17
Tetos perdidos	176	3,83	100,00
Total	4596	100,0	

Com relação a coleta de leite para exame microbiológico, 3033 tetos (65,99% do total) não foram coletados devido a negatividade para a prova do CMT; 79 (1,72% do total) não foram coletados por motivos diversos; e 176 (3,83%) dos tetos foram considerados perdidos, portanto não coletados.

Das amostras de leite coletadas, 16 amostras foram consideradas contaminadas (1,22%) e 557 não apresentaram crescimento (42,58%), conforme se observa na Tabela 5.

TABELA 5. Frequência absoluta (N), frequência relativa (%), frequência absoluta acumulada (NA) e frequência relativa acumulada (%A) do resultado do exame microbiológico de amostras de leite bovino positivas ao California Mastitis Test (CMT). Botucatu, SP, 2011.

Resultado	Exame microbiológico			
	N	%	NA	%A
Negativo	557	42,58	557	42,58
<i>Corynebacterium bovis</i>	213	16,28	770	58,87
<i>Staphylococcus</i> spp.	192	14,68	962	73,55
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	115	8,79	1077	82,34
<i>Streptococcus agalactiae</i>	74	5,66	1151	88,00
<i>Staphylococcus</i> coagulase positivos	44	3,36	1195	91,36
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	28	2,14	1223	93,50
<i>Escherichia coli</i>	16	1,22	1239	94,72
Amostras contaminadas	16	1,22	1255	95,95
<i>Streptococcus uberis</i>	12	0,92	1267	96,87
<i>Nocardia</i> spp.	9	0,69	1276	97,55
<i>Streptococcus</i> spp.	8	0,61	1284	98,17
Bacilos gram negativos	7	0,54	1291	98,70
<i>Actinomyces</i> spp.	6	0,46	1297	99,16
<i>Pasteurella</i> spp.	4	0,31	1301	99,46
<i>Bacillus</i> spp.	3	0,23	1304	99,69
<i>Candida</i> spp.	2	0,15	1306	99,85
<i>Enterobacter</i> spp.	1	0,08	1307	99,92
<i>Pseudomonas</i> spp.	1	0,08	1308	100

Em 28 (2,14%) amostras de leite coletadas foi detectada a presença da *Klebsiella pneumoniae* como patógeno responsável pela IMI. Excluindo-se amostras contaminadas e resultados negativos, observou-se que a *K. pneumoniae* foi responsável por 3,83% dos quadros de IMI considerando-se o teto como unidade experimental no presente estudo. Em todos os casos de isolamento deste patógeno, o resultado da prova do CMT foi 3 (três) cruzeiros. Em três animais, o patógeno foi isolado em mais de um teto (em dois tetos em todos os casos).

Os 28 casos de IMI por este patógeno foram detectados em apenas quatro propriedades (um caso na propriedade 1; três na propriedade 2; 23 na propriedade 3; e um caso na propriedade 5).

Os resultados obtidos por propriedade referentes ao tipo de patógeno isolado (contagioso ou ambiental), excluindo-se amostras contaminadas e resultados negativos podem ser visualizados na Tabela 6.

TABELA 6. Frequência absoluta (N) e frequência relativa em relação ao tipo (%tipo) e em relação a propriedade (%P) do tipo de patógeno isolado nas diferentes propriedades. Botucatu, SP, 2011.

Patógeno		Propriedade										Total
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Contagioso	N	40	120	56	36	83	35	45	29	78	1	523
	%tipo	5,44	16,3	7,62	4,9	11,3	4,76	6,12	3,95	10,6	0,14	71,2
	%P	70,2	90,2	33,7	75	96,5	58,3	80,4	85,3	97,5	6,67	
Ambiental	N	17	13	110	12	3	25	11	5	2	14	212
	%tipo	2,31	1,77	15	1,63	0,41	3,4	1,5	0,68	0,27	1,9	28,8
	%P	29,8	9,77	66,3	25	3,49	41,7	19,6	14,7	2,5	93,3	
Total		57	133	166	48	86	60	56	34	80	15	735
		7,76	18,1	22,6	6,53	11,7	8,16	7,62	4,63	10,9	2,04	100

5.2 Animais

Participaram do presente estudo 1144 animais. Foi diagnosticada IMI em pelo menos um teto em 487 (42,57%) dos animais. Os patógenos envolvidos são apresentados na Tabela 7.

TABELA 7. Frequência absoluta (N), frequência relativa (%), frequência absoluta acumulada (NA) e frequência relativa acumulada (%A) dos principais patógenos responsáveis pela infecção intramamária considerando-se o animal como unidade experimental. Botucatu, SP, 2011.

Exame microbiológico				
Resultado	N	%	NA	%A
<i>Staphylococcus</i> spp.	124	25,46	124	25,46
<i>Corynebacterium bovis</i>	121	24,85	245	50,31
<i>Streptococcus</i> spp.	53	10,88	298	61,19
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	42	8,62	340	69,82
<i>Streptococcus agalactiae</i>	41	8,42	381	78,23
<i>Staphylococcus</i> coagulase positivos	32	6,57	413	84,8
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	25	5,13	438	89,94
<i>Escherichia coli</i>	13	2,67	451	92,61
<i>Streptococcus uberis</i>	10	2,05	461	94,66
<i>Actinomyces</i> spp.	6	1,23	467	95,89
Bacilos gram negativos	6	1,23	473	97,13
<i>Nocardia</i> spp.	6	1,23	479	98,36
<i>Pasteurella</i> spp.	3	0,62	482	98,97
<i>Bacillus</i> spp.	2	0,41	484	99,38
<i>Candida</i> spp.	1	0,21	485	99,59
<i>Enterobacter</i> spp.	1	0,21	486	99,79
<i>Pseudomonas</i> spp.	1	0,21	487	100

Klebsiella pneumoniae foi responsável por 25 casos de IMI, o que representa 5,13% do total de casos de IMI considerando-se o animal como unidade experimental. Estes animais eram em sua maioria de segunda lactação (9 casos; 36,0% do total de animais diagnosticados com IMI por este patógeno), produção de leite de 15 a 25 litros (11 casos; 44,00%) e de número de lactação igual ou superior a 4 lactações (10 casos; 40,00 %). Estes casos foram detectados em quatro propriedades. A propriedade 1 apresentou um caso, a propriedade 2 apresentou três e 20 casos foram detectados na propriedade 3 e um na propriedade 5.

De acordo com o modelo matemático aplicado, quando se controlou o efeito da propriedade nenhum dos fatores avaliados apresentou relação

significativa com o isolamento da *Klebsiella* spp. a partir do leite dos animais (número de lactação; $F(1;1131) = 3,38$; $P = 0,066$; produção de leite; $F(1;1331) = 0,58$; $P = 0,444$ e dias em lactação; $F(1;1331) = 3,78$; $P = 0,052$).

Em relação a CCS dos animais pode-se observar a distribuição dos resultados por propriedade na Tabela 8. É importante ressaltar que dos animais CMT negativos o leite não foi colhido, sendo a CCS do tanque da propriedade mais indicativa de status real da propriedade do que a CCS de amostras CMT positivas.

TABELA 8. Média, mediana, desvio padrão (σ), percentil 25 (P25) e percentil 75 (P75), limites inferiores (LB 95%) e superiores (UP 95%) do intervalo de confiança de 95% para a contagem de células somáticas (CCS x 10^3 células/mL de leite) para as diferentes propriedades (P). Botucatu, SP, 2011.

P	Média	Mediana	σ	P25	P75	LB 95%	UP 95%
1	108	904,49	1795,44	56	968	436,60	1372,39
2	367	986,31	1534,11	114	1144	808,07	1164,55
3	795	1332,33	1738,93	155	1601	1144,87	1519,78
4	137	342,75	518,99	46	365	239,77	445,73
5	230,5	520,18	803,73	39	520	338,97	701,39
6	167	759,16	1691,22	71	635	278,52	1239,80
7	378	1316,08	2110,88	101	1166	860,78	1771,39
8	232,5	827,65	1407,04	103	780	409,81	1245,49
9	108	289,63	570,60	17	362	162,64	416,61
10	264	2442,85	3894,57	68	2945	869,79	4015,90

Utilizando-se os valores convertidos para a escala logarítmica observou-se os seguintes resultados (Tabela 9):

TABELA 9. Média, mediana, desvio padrão (σ), percentil 25 (P25) e percentil 75 (P75), limites inferiores (LB 95%) e superiores (UP 95%) do intervalo de confiança de 95% para a contagem de células somáticas ($\log \text{ CCS} \times 10^3$ células/mL de leite) para as diferentes propriedades. Botucatu, SP, 2011.

P	Media	Mediana	σ	P25	P75	LB 95%	UP 95%
1	2,04	2,26	0,83	1,76	2,99	2,04	2,47
2	2,57	2,41	0,97	2,06	3,06	2,30	2,52
3	2,90	2,63	0,89	2,19	3,20	2,53	2,73
4	2,14	2,14	0,62	1,67	2,56	2,02	2,26
5	2,36	2,12	0,96	1,60	2,72	1,90	2,33
6	2,23	2,31	0,67	1,86	2,80	2,11	2,50
7	2,58	2,49	0,90	2,01	3,07	2,29	2,68
8	2,37	2,38	0,81	2,02	2,89	2,14	2,62
9	2,04	1,84	0,89	1,26	2,56	1,64	2,04
10	2,42	2,43	1,26	1,84	3,47	1,92	2,94

A Tabela 10 traz informações referentes à contagem de células somáticas por patógeno (excluindo-se patógenos com menor frequência de isolamento; < 10 casos).

TABELA 10. Média, mediana, desvio padrão (σ), percentil 25 (P25) e percentil 75 (P75), limites inferiores (LB 95%) e superiores (UP 95%) do intervalo de confiança de 95% para a contagem de células somáticas (log CCS x 10³ células/mL de leite) de acordo com os diferentes patógenos isolados. Botucatu, SP, 2011.

Patógeno	log CCS (x 10 células/mL leite)						LB 95%	UP 95%
	Media	Mediana	σ	P25	P75			
<i>Escherichia coli</i>	3,06	3,00	0,67	2,84	3,35	2,59	3,41	
<i>Corynebacterium bovis</i>	2,66	2,51	0,87	2,12	3,16	2,35	2,66	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3,43	3,40	0,35	3,18	3,65	3,26	3,54	
<i>Staphylococcus coagulase positivos</i>	2,44	2,28	0,85	1,61	2,85	1,97	2,58	
<i>Staphylococcus spp.</i>	2,74	2,70	0,61	2,23	3,17	2,59	2,81	
<i>Streptococcus spp.</i>	3,13	2,97	0,66	2,59	3,42	2,78	3,15	
<i>Streptococcus agalactiae</i>	2,76	2,52	0,95	1,98	3,22	2,22	2,82	
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	2,89	2,79	0,65	2,28	3,34	2,59	2,99	
<i>Streptococcus uberis</i>	2,33	2,55	0,67	1,95	2,89	2,07	3,03	

Observa-se que a maior CCS obtida no leite foi para *Klebsiella pneumoniae*.

5.3 Propriedades

Os isolamentos de *K. pneumoniae* nos diferentes pontos estão apresentados no Quadro 2.

QUADRO 2. Isolamento da *Klebsiella pneumoniae* a partir de pelo menos uma amostra de leite (IMI), swabs de ambiente (Amb), swabs de sala de ordenha (S_Ord), tanque de expansão (TQ), swabs de sala de pré-ordenha (Pre_Ord), reto e membros posteriores dos animais (Post) das dez propriedades (P). Botucatu, SP, 2011.

P	IMI	Amb	S_Ord	TQ	Pre_Ord	Reto	Post
1	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim
2	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Sim
3	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Sim
4	Não	Não	Sim	Não	Não	Sim	Sim
5	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Não	Não
6	Não	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Sim
7	Não	Sim	Não	Não	Não	Sim	Não
8	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
9	Não	Sim	Não	Não	Não	Sim	Sim
10	Não	Não	Sim	Não	Sim	Sim	Sim

Nota-se que em três propriedades que apresentaram casos de IMI por *K. pneumoniae* o mesmo patógeno foi isolado a partir do leite do tanque de expansão (valor de Kappa = 0,59; considerado médio).

5.4 Swabs e Leite do Tanque de Expansão

O isolamento de patógenos nos 25 swabs realizados nas propriedades são apresentados no Quadro 3.

QUADRO 3. Número de swabs positivos e negativos para o isolamento de *Klebsiella pneumoniae* a partir de amostras de ambiente (AMB), reto e membros posteriores dos animais (POST), sala de ordenha (SO), sala de pré-ordenha (PO), e leite do tanque de expansão (TQ) das diferentes propriedades (P). Botucatu, SP, 2011.

P	Isolamento	Local						Total
		AMB	RETO	POST	SO	PO	TQ	
1	Não	1	6	2	0	2	0	11
	Sim	7	0	4	2	0	1	14
2	Não	2	4	3	2	0	0	11
	Sim	6	2	3	0	2	1	14
3	Não	3	2	3	2	2	0	12
	Sim	5	4	3	0	0	1	13
4	Não	8	5	5	1	2	1	22
	Sim	0	1	1	1	0	0	3
5	Não	6	6	6	2	1	1	22
	Sim	2	0	0	0	1	0	3
6	Não	5	5	3	2	1	1	17
	Sim	3	1	3	0	1	0	8
7	Não	4	4	6	2	2	1	19
	Sim	4	2	0	0	0	0	6
8	Não	5	6	5	0	1	0	17
	Sim	3	0	1	2	1	1	8
9	Não	6	5	5	2	2	1	21
	Sim	2	1	1	0	0	0	4
10	Não	8	5	5	0	0	1	19
	Sim	0	1	1	2	2	0	6
Total	Sim							79
	Não							171

As propriedades que apresentaram maior número de isolamentos do patógeno a partir dos swabs foram as propriedades 1 e 2 com 14 isolamentos cada, e a propriedade 3 com 13 isolamentos.

5.5 Resistência antimicrobiana e ESβL

Foram isoladas 79 amostras de *K. pneumoniae* a partir de swabs ambientais e de pele dos animais, bem como do leite oriundo do tanque de expansão das dez propriedades (32 – 29,91% amostras de ambiente; 17 – 15,89% amostras de posterior, 12 – 11,21% amostras de reto, sete (07) – 6,54% amostras de sala de pré ordenha, sete (07) – 6,54% amostras de sala de ordenha e quatro (04) – 3,74% amostras de leite de tanque de expansão); e 28 amostras da mesma bactéria a partir de IMI (26,17%), totalizando 107 amostras.

Foram testados os seguintes antimicrobianos para diagnóstico da produção de ESβLs: Cefpodoxima, aztreonam, cefotaxime, ceftriaxona, ceftazidima e cefoxitina. O perfil de resistência de acordo com as drogas é apresentado na Tabela 11.

TABELA 11. Frequência absoluta (N) e frequência relativa (%) dos 107 isolados de *Klebsiella pneumoniae* resistentes aos antimicrobianos (ATB). Botucatu, SP, 2011.

ATB*	Resultado	N	%
CPD	Resistente	81	75,7
	Sensível	26	24,3
ATM	Resistente	83	77,57
	Sensível	24	22,43
CTX	Resistente	68	63,55
	Sensível	39	36,45
CRO	Resistente	79	73,83
	Sensível	28	26,17
CAZ	Resistente	87	81,31
	Sensível	20	18,69
FOX	Resistente	105	98,13
	Sensível	2	1,87

* CPD = cefpodoxima; ATM = aztreonam; CTX = cefotaxime; CRO = ceftriaxona; CAZ = ceftazidima; FOX = cefoxitina

De acordo ainda com a resistência aos antimicrobianos, a Tabela 12 traz informações sobre o perfil de resistência a mais de um antimicrobiano.

TABELA 12. Frequência absoluta (N) e frequência relativa (%) do número de cepas bacterianas resistentes a, no mínimo, dois princípios ativos testados (R2), três (R3), quatro (R4), cinco (R5) e a todos os seis princípios testados (R6). Botucatu, SP, 2011.

Resistência	Perfil	N	%
R2	Não	76	71,03
	Sim	31	28,97
R3	Não	81	75,7
	Sim	26	24,3
R4	Não	88	82,24
	Sim	19	17,76
R5	Não	97	90,65
	Sim	10	9,35
R6	Não	106	99,07
	Sim	1	0,93

Visando informações sobre possíveis diferenças entre as propriedades, pode-se visualizar na Tabela 13 o número de cepas resistentes aos diversos antimicrobianos avaliados por propriedade. A Tabela 14 revela as cepas sensíveis a todos os princípios testados e resistentes a pelo menos, um princípio ativo por propriedade.

TABELA 13. Frequência absoluta (N) e frequência relativa (%) de cepas de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a: nenhum princípio testado (0), um (1), dois (2), três (3), quatro (4), cinco (5) e todos os princípios ativos testados (6) por propriedade (P). Botucatu, SP, 2011. Botucatu, SP, 2011.

P	Número de princípios ativos														Total
	0		1		2		3		4		5		6		
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	
1	1	6,67	-	-	-	-	2	13,33	4	26,67	7	46,67	1	6,67	15
2	10	58,82	2	11,76	1	5,88	1	5,88	2	11,76	1	5,88	-	-	17
3	28	77,78	6	16,67	1	2,78	-	-	-	-	1	2,78	-	-	36
4	3	100,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
5	3	75,00	-	-	-	-	-	-	1	25,00	-	-	-	-	4
6	4	50,00	3	37,50	1	12,50	-	-	-	-	-	-	-	-	8
7	1	16,67	2	33,33	-	-	1	16,67	2	33,33	-	-	-	-	6
8	-	-	4	50,00	2	25,00	2	25,00	-	-	-	-	-	-	8
9	2	50,00	2	50,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4
10	3	50,00	2	33,33	-	-	1	16,67	-	-	-	-	-	-	6

TABELA 14. Frequência absoluta (N) e frequência relativa (%) de cepas de *Klebsiella pneumoniae* sensíveis a todos os antimicrobianos testados (0) e resistentes a no mínimo um (1) por propriedade (P). Botucatu, SP, 2011.

P		Resistência		Total
		0	1	
1	N	1	14	15
	%	6,67	93,33	
2	N	10	7	17
	%	58,82	41,18	
3	N	28	8	36
	%	77,78	22,22	
4	N	3	0	3
	%	100	0	
5	N	3	1	4
	%	75	25	
6	N	4	4	8
	%	50	50	
7	N	1	5	6
	%	16,67	83,33	
8	N	0	8	8
	%	0	100	
9	N	2	2	4
	%	50	50	
10	N	3	3	6
	%	50	50	
Total	N	55	52	107
	%	51,4	48,6	

Nota-se nas Tabelas 13 e 14, as propriedades 1, 7 e 8 foram as que apresentaram maior quantidade de cepas resistentes aos antimicrobianos testados. Porém, levando-se em conta bactérias multirresistentes, as propriedades 1, 2 e 3 foram as que apresentaram maior número de cepas de *K. pneumoniae* multirresistentes.

Quanto ao perfil de resistência associado ao local de isolamento, são apresentados os resultados nas Tabelas 15 e 16.

TABELA 15. Frequência absoluta (N) e frequência relativa (%) de cepas de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a: nenhum antimicrobiano testado (0), um (1), dois (2), três (3), quatro (4), cinco (5) e todos os antimicrobianos testados (6) de acordo com procedência da amostra. Botucatu, SP, 2011.

Procedência*		Número de princípios ativos							Total
		0	1	2	3	4	5	6	
IMI	N	21	3	-	1	1	2	-	28
	%	75,00	10,71	-	3,57	3,57	7,14	-	
Tanque	N	1	2	-	-	1	-	-	4
	%	25,00	50,00	-	-	25,00	-	-	
Ambiente	N	12	7	2	2	5	4	-	32
	%	37,50	21,88	6,25	6,25	15,63	12,50	-	
Posterior	N	7	4	2	1	-	2	1	17
	%	41,18	23,53	11,76	5,88	-	11,76	5,88	
Pré-ordenha	N	3	1	-	2	1	-	-	7
	%	42,86	14,29	-	28,57	14,29	-	-	
Reto	N	8	3	-	1	-	-	-	12
	%	66,67	25,00	-	8,33	-	-	-	
Sala de ordenha	N	3	1	1	-	1	1	-	7
	%	42,86	14,29	14,29	-	14,29	14,29	-	
Total		55	21	5	7	9	9	1	107
		51,40	19,63	4,67	6,54	8,41	8,41	0,93	100

* IMI = Infecção intramamária; Posterior = membros posteriores dos animais

TABELA 16. Frequência absoluta (N) e frequência relativa (%) de cepas de *Klebsiella pneumoniae* sensíveis a todos os antimicrobianos testados (0) e resistentes a no mínimo um (1), de acordo com procedência do patógeno. Botucatu, SP, 2011.

Procedência*		Resistência		Total
		0	1	
IMI	N	21	7	28
	%	75,00	25,00	
Tanque	N	1	3	4
	%	25,00	75,00	
Ambiente	N	12	20	32
	%	37,50	62,50	
Posterior	N	7	10	17
	%	41,18	58,82	
Pré-ordenha	N	3	4	7
	%	42,86	57,14	
Reto	N	8	4	12
	%	66,67	33,33	
Sala de ordenha	N	3	4	7
	%	42,86	57,14	
Total	N	55	52	107
	%	51,40	48,60	100

* IMI = Infecção intramamária; Posterior = membros posteriores dos animais

Conforme se observa na Tabela 15, cepas multirresistentes foram isoladas de diversos pontos de coleta.

Os resultados da prova de detecção fenotípica da produção de enzimas do tipo ES β L foram positivos em 8 (7,47%) das cepas bacterianas testadas. O Quadro 4 traz informações sobre os locais de origem destas cepas. A Figura 1 mostra um teste positivo para produção de ES β LS.

QUADRO 4. Procedência das oito cepas bacterianas produtoras de β -lactamases de espectro ampliado isolada de três propriedades leiteiras entre as dez visitadas. Botucatu, SP, 2011.

Propriedade	Procedência
2	Membros posteriores
2	Ambiente dos animais
2	Infecção intramamária
2	Tanque de expansão
2	Infecção intramamária
3	Infecção intramamária
1	Ambiente dos animais
1	Sala de ordenha

A maioria das cepas positivas (5) foram isoladas de uma mesma propriedade (propriedade 2).



FIGURA 1. Teste positivo para produção de β -lactamases de espectro ampliado pela metodologia da disco difusão dupla em agar Müller-Hinton (Oxoid®, Inglaterra). Nota-se a formação da "ghost zone". Ao centro, o disco de amoxicilina/ácido clavulânico. À esquerda o disco de cefotaxima e a direita o disco de ceftriaxona. Botucatu, SP, 2011.

5.6 Eletroforese em Campo Pulsátil

Das 107 cepas de *K. pneumoniae*, 10 (9,34%) não foram tipáveis pela enzima *Xba*I. Estas são apresentadas no Quadro 5.

QUADRO 5. Procedência das cepas bacterianas não tipáveis pela enzima *Xba* I na técnica de eletroforese em campo pulsátil (PFGE). Botucatu, SP, 2011

Propriedade	Procedência
1	Membros posteriores
2	Membros posteriores
2	Reto dos animais
4	Membros posteriores
5	Ambiente dos animais
6	Membros posteriores
8	Ambiente dos animais
8	Membros posteriores
9	Ambiente dos animais
10	Sala de ordenha

Os resultados da PFGE demonstrados a seguir são apresentados por propriedade.

Propriedade 1

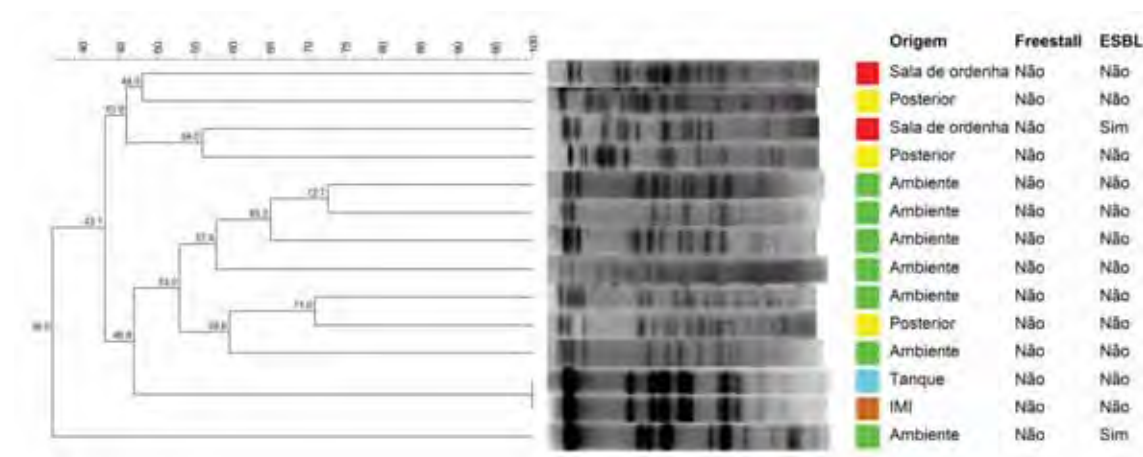


FIGURA 2. Padrão de digestão de 14 isolados de *Klebsiella pneumoniae* de diferentes origens da propriedade 1 pela enzima *Xba* I e submetidos a eletroforese em campo pulsátil (PFGE). As diferentes cores indicam a origem da cepa dentro da mesma propriedade. O campo “free stall” informa se a propriedade utilizava ou não este sistema de criação, e o campo ESBL informa se a cepa era ou não produtora de enzimas do tipo β -lactamases de espectro ampliado. A escala horizontal no canto esquerdo da figura indica o nível de similaridade entre as cepas. O dendograma foi construído com base no resultado da PFGE considerando-se 1% de tolerância e otimização. Botucatu, SP, 2011

A propriedade 1 apresentou 15 isolados, sendo um não tipável. Apresentou também uma cepa produtora de ESBL, isolada a partir de swabs de sala de ordenha. Pela PFGE, observou-se que as cepas ambientais estão localizadas em um bloco (inferior) e cepas da sala de ordenha em outro bloco (superior). Além disto nota-se que a cepa isolada do tanque é indistinguível da causadora de IMI.

Propriedade 2

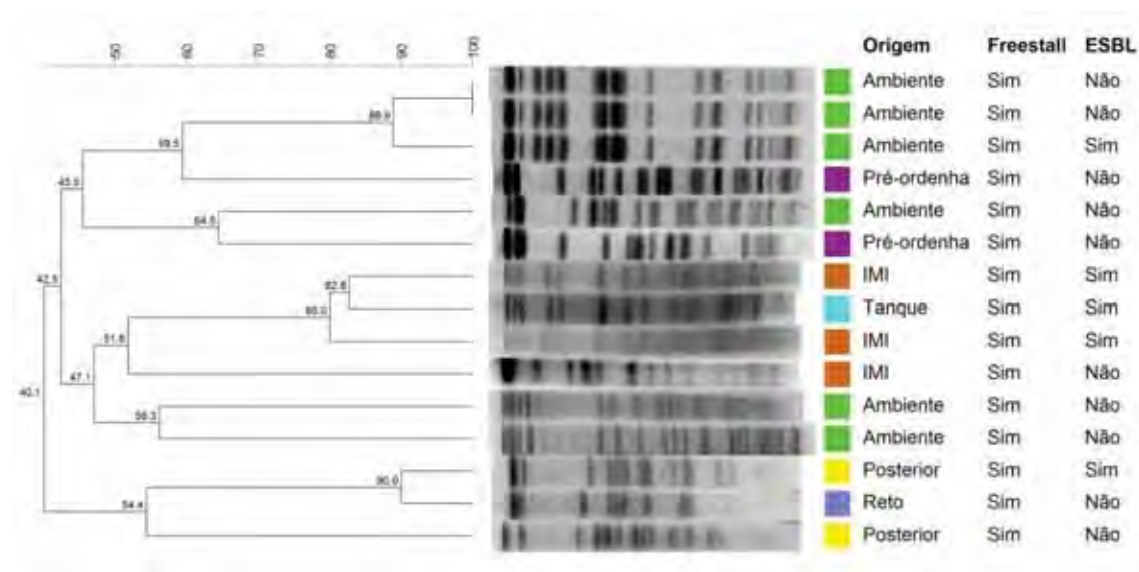


FIGURA 3. Padrão de digestão de 15 isolados de *Klebsiella pneumoniae* de diferentes origens da propriedade 2 pela enzima *Xba* I e submetidos a eletroforese em campo pulsátil (PFGE). As diferentes cores indicam a origem da cepa dentro da mesma propriedade. O campo “free stall” informa se a propriedade utilizava ou não este sistema de criação, e o campo ESBL informa se a cepa era ou não produtora de enzimas do tipo β -lactamases de espectro ampliado. A escala horizontal no canto esquerdo da figura indica o nível de similaridade entre as cepas. O dendograma foi construído com base no resultado da PFGE considerando-se 1% de tolerância e otimização. Botucatu, SP, 2011

A propriedade 2 apresentou 17 isolados de *K. pneumoniae*, sendo duas amostras não tipáveis. A cepa isolada do tanque de expansão (produtora de ESBL) assemelhou-se as cepas isoladas de IMI, sendo relacionada fortemente com uma cepa também produtora de ESBL. Além disto, uma cepa ambiental produtora também de ESBL foi considerada diferente das outras cepas produtoras de ESBLs, mostrando alta diversidade genética do patógeno.

Propriedade 3

A propriedade 3 apresentou 36 isolados de *K. pneumoniae*. Não foram encontradas cepas indistinguíveis nem fortemente relacionadas, apenas pouco relacionadas. Dividindo as cepas em dois grandes blocos, o bloco superior apresentou praticamente apenas cepas oriundas de quadros de IMI, e o bloco inferior apresentou cepas de todos os tipos. Destaca-se que na propriedade três, o isolado do tanque apresentou maior similaridade a cepas oriundas de membros posteriores e reto dos animais do que de cepas de IMI. Vale destacar que apenas uma cepa do tanque de expansão e de um ponto de coleta de

swab é selecionada, sendo que certamente existe grande variação genética do patógeno tanto no tanque de expansão como no ambiente, não devendo ser tiradas conclusões envolvendo a origem do patógeno.

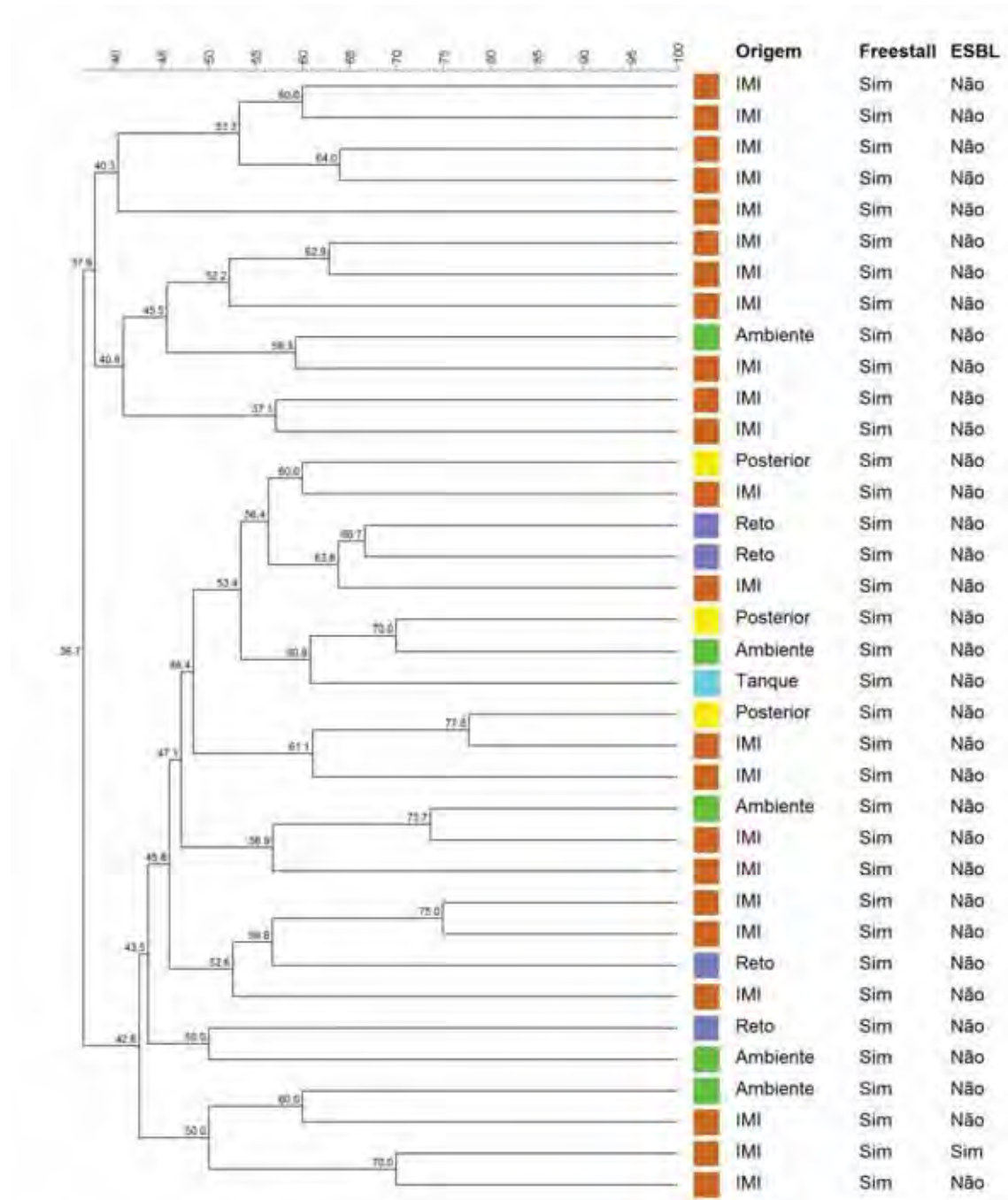


FIGURA 4. Padrão de digestão de 36 isolados de *Klebsiella pneumoniae* de diferentes origens da propriedade 3 pela enzima *Xba* I e submetidos a eletroforese em campo pulsátil (PFGE). As diferentes cores indicam a origem da cepa dentro da mesma propriedade. O campo “free stall” informa se a propriedade utilizava ou não este sistema de criação, e o campo ESBL informa se a cepa era ou não produtora de enzimas do tipo β -lactamases de espectro ampliado. A escala horizontal no canto esquerdo da figura indica o nível de similaridade entre as cepas. O dendrograma foi construído com base no resultado da PFGE considerando-se 1% de tolerância e otimização. Botucatu, SP, 2011

Propriedade 4



FIGURA 5. Padrão de digestão de dois isolados de *Klebsiella pneumoniae* de diferentes origens da propriedade 4 pela enzima *Xba I* e submetidos a eletroforese em campo pulsátil (PFGE). As diferentes cores indicam a origem da cepa dentro da mesma propriedade. O campo “free stall” informa se a propriedade utilizava ou não este sistema de criação, e o campo ESBL informa se a cepa era ou não produtora de enzimas do tipo β -lactamases de espectro ampliado. A escala horizontal no canto esquerdo da figura indica o nível de similaridade entre as cepas. O dendograma foi construído com base no resultado da PFGE considerando-se 1% de tolerância e otimização. Botucatu, SP, 2011

A propriedade 4 apresentou apenas três isolados, sendo um não tipável. As duas cepas tipáveis se mostraram pouco relacionadas.

Propriedade 5



FIGURA 6. Padrão de digestão de três isolados de *Klebsiella pneumoniae* de diferentes origens da propriedade 5 pela enzima *Xba I* e submetidos a eletroforese em campo pulsátil (PFGE). As diferentes cores indicam a origem da cepa dentro da mesma propriedade. O campo “free stall” informa se a propriedade utilizava ou não este sistema de criação, e o campo ESBL informa se a cepa era ou não produtora de enzimas do tipo β -lactamases de espectro ampliado. A escala horizontal no canto esquerdo da figura indica o nível de similaridade entre as cepas. O dendograma foi construído com base no resultado da PFGE considerando-se 1% de tolerância e otimização. Botucatu, SP, 2011

A propriedade 5 apresentou apenas quatro isolados, sendo um não tipável. As três cepas tipáveis se mostraram diferentes.

Propriedade 6

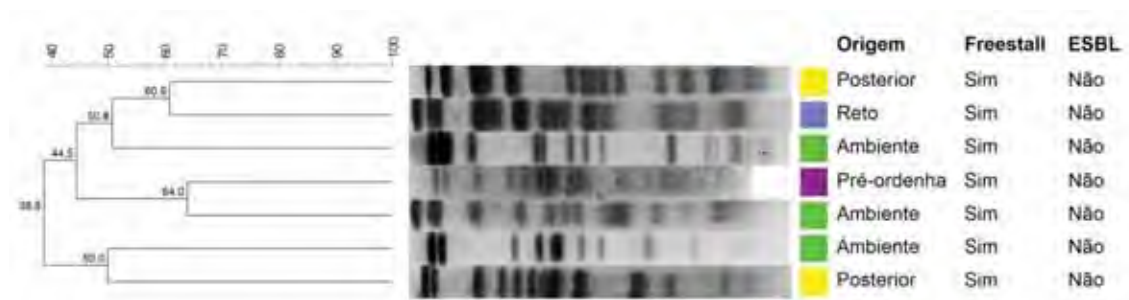


FIGURA 7. Padrão de digestão de seis isolados de *Klebsiella pneumoniae* de diferentes origens da propriedade 6 pela enzima *Xba I* e submetidos a eletroforese em campo pulsátil (PFGE). As diferentes cores indicam a origem da cepa dentro da mesma propriedade. O campo “free stall” informa se a propriedade utilizava ou não este sistema de criação, e o campo ESBL informa se a cepa era ou não produtora de enzimas do tipo β -lactamases de espectro ampliado. A escala horizontal no canto esquerdo da figura indica o nível de similaridade entre as cepas. O dendograma foi construído com base no resultado da PFGE considerando-se 1% de tolerância e otimização. Botucatu, SP, 2011

A propriedade 6 apresentou oito isolados, sendo um não tipável. Existiram relações fracas entre cepas isoladas do reto e membros posteriores dos animais, e também do ambiente e da sala de pré-ordenha dos animais. A propriedade 6 apresentou cepas mais relacionadas entre si em comparação a propriedade 5.

Propriedade 7

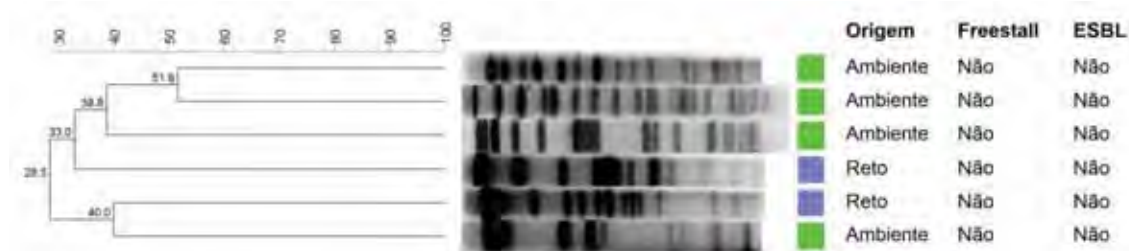


FIGURA 8. Padrão de digestão de seis isolados de *Klebsiella pneumoniae* de diferentes origens da propriedade 7 pela enzima *Xba I* e submetidos a eletroforese em campo pulsátil (PFGE). As diferentes cores indicam a origem da cepa dentro da mesma propriedade. O campo “free stall” informa se a propriedade utilizava ou não este sistema de criação, e o campo ESBL informa se a cepa era ou não produtora de enzimas do tipo β -lactamases de espectro ampliado. A escala horizontal no canto esquerdo da figura indica o nível de similaridade entre as cepas. O dendograma foi construído com base no resultado da PFGE.

A propriedade 7 apresentou seis isolados. Duas cepas ambientais apresentaram-se pouco relacionadas, as demais foram consideradas como diferentes.

Propriedade 8

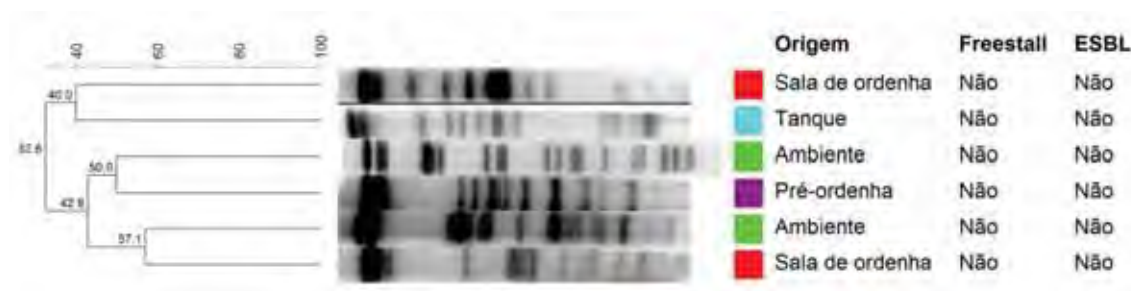


FIGURA 9. Padrão de digestão de seis isolados de *Klebsiella pneumoniae* de diferentes origens da propriedade 8 pela enzima *Xba I* e submetidos a eletroforese em campo pulsátil (PFGE). As diferentes cores indicam a origem da cepa dentro da mesma propriedade. O campo “free stall” informa se a propriedade utilizava ou não este sistema de criação, e o campo ESBL informa se a cepa era ou não produtora de enzimas do tipo β -lactamases de espectro ampliado. A escala horizontal no canto esquerdo da figura indica o nível de similaridade entre as cepas. O dendograma foi construído com base no resultado da PFGE considerando-se 1% de tolerância e otimização. Botucatu, SP, 2011

A propriedade 8 apresentou oito isolados, sendo duas cepas não tipáveis. O isolado do tanque de expansão foi diferente dos demais.

Propriedade 9



FIGURA 10. Padrão de digestão de três isolados de *Klebsiella pneumoniae* de diferentes origens da propriedade 9 pela enzima *Xba I* e submetidos a eletroforese em campo pulsátil (PFGE). As diferentes cores indicam a origem da cepa dentro da mesma propriedade. O campo “free stall” informa se a propriedade utilizava ou não este sistema de criação, e o campo ESBL informa se a cepa era ou não produtora de enzimas do tipo β -lactamases de espectro ampliado. A escala horizontal no canto esquerdo da figura indica o nível de similaridade entre as cepas. O dendograma foi construído com base no resultado da PFGE considerando-se 1% de tolerância e otimização. Botucatu, SP, 2011

A propriedade 9 apresentou apenas quatro isolados, sendo um não tipável. As três cepas tipáveis se mostraram diferentes.

Propriedade 10



FIGURA 11. Padrão de digestão de cinco isolados de *Klebsiella pneumoniae* de diferentes origens da propriedade 10 pela enzima *Xba I* e submetidos a eletroforese em campo pulsátil (PFGE). As diferentes cores indicam a origem da cepa dentro da mesma propriedade. O campo “free stall” informa se a propriedade utilizava ou não este sistema de criação, e o campo ESβL informa se a cepa era ou não produtora de enzimas do tipo β-lactamases de espectro ampliado. A escala horizontal no canto esquerdo da figura indica o nível de similaridade entre as cepas. O dendograma foi construído com base no resultado da PFGE considerando-se 1% de tolerância e otimização. Botucatu, SP, 2011

A propriedade 10 apresentou seis isolados, sendo um não tipável. Observou-se fraca relação entre cepas isoladas de membros posteriores dos animais, sala de ordenha e sala de pré-ordenha.

Optou-se por agrupar cepas apenas em duas ocasiões, isoladas de quadros de IMI e de tanques de expansão. Os resultados são apresentados a seguir.

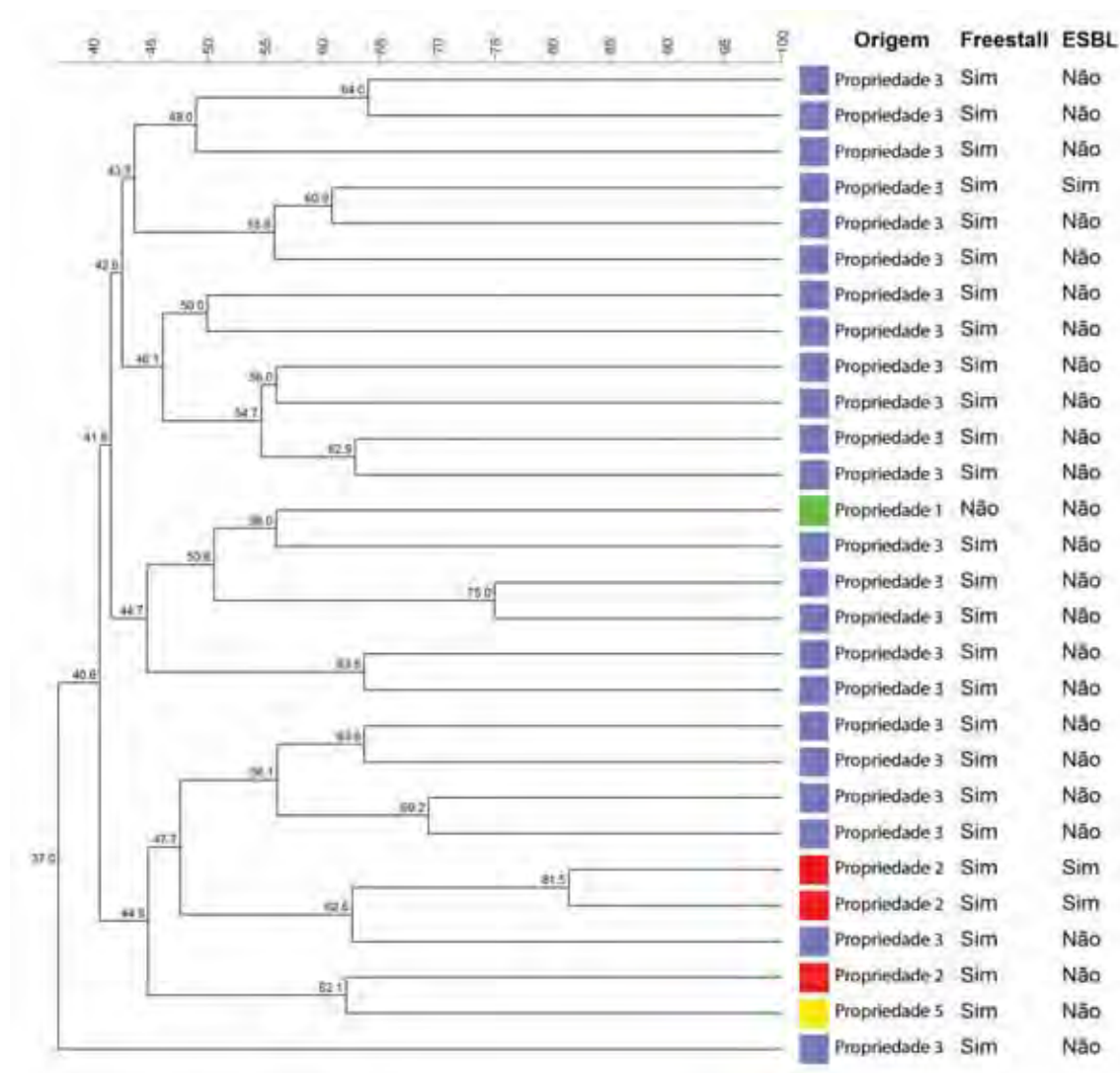


FIGURA 12. Padrão de digestão de 28 isolados de *Klebsiella pneumoniae* oriundos de quadros de infecção intramamária (IMI) pela enzima *Xba I* e submetidos a eletroforese em campo pulsátil (PFGE). As diferentes cores indicam a origem da cepa (propriedade). O campo “free stall” informa se a propriedade utilizava ou não este sistema de criação, e o campo ESBL informa se a cepa era ou não produtora de enzimas do tipo β -lactamases de espectro ampliado. A escala horizontal no canto esquerdo da figura indica o nível de similaridade entre as cepas. O dendograma foi construído com base no resultado da PFGE considerando-se 1% de tolerância e otimização. Botucatu, SP, 2011



FIGURA 13. Padrão de digestão de quatro isolados de *Klebsiella pneumoniae* oriundos do leite do tanque de expansão pela enzima *Xba I* e submetidos a eletroforese em campo pulsátil (PFGE). As diferentes cores indicam a origem da cepa (propriedade). O campo “free stall” informa se a propriedade utilizava ou não este sistema de criação, e o campo ESBL informa se a cepa era ou não produtora de enzimas do tipo β -lactamases de espectro ampliado. A escala horizontal no canto esquerdo da figura indica o nível de similaridade entre as cepas. O dendograma foi construído com base no resultado da PFGE considerando-se 1% de tolerância e otimização. Botucatu, SP, 2011

Observando-se a Figura 12, é possível notar que existe maior semelhança entre os isolados dentro da mesma propriedade, porém existem relações fracas entre cepas de propriedades distintas. De qualquer maneira, não foram encontradas cepas indistinguíveis, e apenas duas fortemente relacionadas foram encontradas. A Figura 13 mostra fracas relações entre os isolados de diferentes tanques de expansão.

A relação entre todas as cepas típicas do estudo (97 amostras) das diferentes propriedades nos mostra cepas indistinguíveis e outras fortemente relacionadas apenas em se tratando da mesma propriedade. Relações fracas são observadas entre diversos isolados de propriedades distintas (dados não apresentados).

*D*ISSCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Mastites ambientais ainda são, no Brasil, consideradas como problemas pontuais de algumas propriedades. A prevalência destas depende de diversos fatores, como sistema de criação do rebanho (NAM et al, 2010), estação do ano, densidade animal, dentre outros fatores. No presente estudo, observou-se uma prevalência maior de patógenos classificados como contagiosos em relação aos patógenos ambientais na grande maioria das propriedades (exceção para as propriedades 3 e 10). É importante lembrar que comparações entre as propriedades não devem ser realizadas em relação ao isolamento dos diferentes patógenos devido ao tipo de amostragem realizada. Algumas amostras não foram consideradas como representativas do rebanho, não pela quantidade de animais utilizados e sim pelo critério de seleção dos mesmos. Portanto conclusões envolvendo frequência de IMIs por propriedade, detecção de fatores de risco para infecção, dentre outras, não seriam adequadas. O presente estudo teve como importância o monitoramento do perfil de resistência do patógeno, a avaliação da diversidade genotípica de *K. pneumoniae* dentro e entre as propriedades, e principalmente no que se refere a epidemiologia do mesmo, buscar semelhanças entre os patógenos isolados de quadros de IMI, tanque de expansão e outros locais dentro de uma propriedade leiteira.

No Brasil, surtos de mastites por *K. pneumoniae* em propriedades leiteiras do Estado de São Paulo são descritos desde 1984, acometendo cerca de 48,84% dos animais do rebanho (LANGONI et al, 1985). No presente estudo, *K. pneumoniae* foi isolada em 28 oportunidades a partir da glândula mamária, sendo 23 casos em uma mesma propriedade. A propriedade 3 é a mais tecnificada, com maior produção de leite e maior número de animais em lactação. Propriedades com alto grau de tecnificação no cenário atual brasileiro ainda são raras, porém diante da pressão exercida pela legislação estas propriedades serão cada vez mais frequentes. O estudo prévio envolvendo a epidemiologia de um dos principais patógenos isolados de propriedades tecnificadas, *K. pneumoniae*, pode colaborar com a adoção de medidas preventivas em termos de infraestrutura e logística de produção.

Além disto, a redução nos limites legais de celularidade do leite pode colaborar com a alteração no perfil de isolamento microbiano nas propriedades leiteiras. Sabe-se que mastites por coliformes (principalmente *K. pneumoniae*) são frequentes em rebanhos leiteiros em outros países, principalmente em propriedades com baixa celularidade no leite (HOGAN & LARRY SMITH 2003). Esta relação reflete principalmente a diminuição nas células de defesa na glândula mamária do animal, tornando-o mais susceptível a novas infecções. Diante da demanda atual por produtos de melhor qualidade, como o leite com baixa celularidade, a mastite por coliformes apresenta grande importância para a indústria leiteira mundial, fato que pode ser observado em países onde a indústria leiteira é desenvolvida.

De acordo com o modelo estatístico proposto, produção de leite, número de lactação e dias em lactação não influenciaram na chance do isolamento da *K. pneumoniae* o que já era esperado. Sabe-se que fatores como maior produção leiteira pode colaborar com o isolamento do patógeno, isto porque a alta produção de leite contribui para o extravasamento de leite dos tetos, o que pode levar à abertura do seu óstio aumentando o risco de infecção por agentes ambientais (ERICSSON UNNERSTAD et al, 2009), porém o modelo aplicado considerava apenas o isolamento de *K. pneumoniae* como variável dependente, e não o isolamento de patógenos do tipo ambiental. Possivelmente o mesmo modelo considerando-se a presença/ausência de mastite ambiental (fosse ela causada por qualquer patógeno) como variável dependente aplicado em propriedades que apresentassem um número satisfatório de casos de mastite ambientais, poderia detectar o efeito, o que não foi o objetivo do presente estudo.

Em comparação com quadros de IMI por agentes contagiosos, as mastites causadas pelos coliformes não influenciam drasticamente a celularidade do leite da propriedade, evoluem rapidamente, e a produção leiteira pode decrescer apenas por curto período (FERGUSON et al, 2007). Porém, coliformes são patógenos ambientais, e quando atingem a glândula mamária, o animal tende a apresentar quadro de mastite clínica (LOCATELLI et al, 2010). No presente estudo observou-se a maior contagem de células somáticas para os patógenos ambientais (*K. pneumoniae*, *E. coli* e *Streptococcus* ambientais). Os quadros de IMI causadas por coliformes no

presente estudo poderiam possivelmente estar evoluindo para mastites clínicas.

No que se refere a produção de ESβLs, o resultado do presente estudo é alarmante. Oito cepas produtoras de ESβLs (7,47% do total) foram detectadas em bovinos leiteiros, sendo que uma delas no tanque de expansão. Em comparação com outros estudos, a prevalência destas cepas é extremamente elevada (HAMMAD et al, 2008; LOCATELLI et al, 2009; LOCATELLI et al, 2010). Além disto, o fato de terem sido isoladas cepas bacterianas produtoras de ESβLs em amostras ambientais (sala de ordenha, ambiente dos animais e membros posteriores) também é de extrema importância, pois patógenos ambientais multirresistentes podem causar quadros de IMI em condições ideais.

Tratamentos intramamários mal sucedidos não são os únicos responsáveis pelo aumento na resistência dos patógenos ambientais, mesmo tratando-se de patógenos tipicamente causadores de mastites. BENGTSSON et al. (2009) destacaram que amostras de *E. coli* do trato gastrointestinal de bezerros apresentaram resistência a princípios antimicrobianos que não são rotineiramente utilizados no tratamento de mastites na Suécia (como ampicilina e tetraciclina). Estes mesmos patógenos foram isolados de quadros de IMI (apresentando mesmo perfil de resistência) e, provavelmente, adquiriram este perfil de resistência fora do úbere da vaca. Desta maneira, suspeita-se que tratamentos em outras categorias animais, excetuando-se vacas leiteiras, podem levar a seleção de patógenos ambientais multirresistentes, os quais posteriormente desencadeiam quadros de IMI.

A prevalência e a importância de cepas bacterianas produtoras de ESβLs vem crescendo em medicina veterinária. Estes genes já foram detectados em cães (O'KEEFE et al, 2010), aves (BORTOLAIA et al, 2010a; BORTOLAIA et al, 2010b; PINTO et al, 2010; RADHOUANI et al, 2010), suínos (TIAN et al, 2009; ZOU et al, 2011), bovinos (WITTUM et al, 2010) dentre outros animais. Para nosso conhecimento, no Brasil ainda não existem relatos de cepas de *K. pneumoniae* produtoras destas enzimas oriundos de animais de produção, e no presente estudo uma das cepas foi isolada do tanque de expansão, representando um potencial risco à saúde pública.

A eletroforese em campo pulsado (PFGE) é um método confiável que permite um grande poder de diferenciação genética. Sabe-se que diferentes genótipos de *K. pneumoniae* podem causar mastite em um mesmo rebanho. Em geral, o estudo da epidemiologia da mastite deve ser conduzido de acordo com a propriedade em questão, fato este que justifica a apresentação dos resultados por propriedade. Deve-se tomar bastante cuidado na sua interpretação. A cepa bacteriana escolhida representativa do ponto de colheita do swab não pode ser considerada como o único genótipo presente naquele ambiente (seja ele tanque, free stall, sala de ordenha etc). O objetivo do presente trabalho era encontrar cepas indistinguíveis ou fortemente relacionadas, porém, o fato de não ter se encontrado esses tipos de relação entre duas cepas, não exclui um local como possível reservatório para o outro e vice-versa.

Na propriedade 1, a cepa produtora de ES β L foi considerada fracamente relacionada à cepa de membros posteriores dos animais. Pode ser observado que a cepa isolada do tanque de expansão e a cepa oriunda do quadro de IMI são indistinguíveis, o que nos permite concluir que aquela estirpe presente no tanque foi originada de um quadro de mastite subclínica e não de outros locais da propriedade. Fato semelhante já foi observado por outros autores (PAULIN-CURLEE et al, 2008). Porém, não é possível concluir qual a origem desta cepa causadora de IMI. Esta propriedade não apresentava galpões de free stall.

Na propriedade 2, cinco casos de produção de ES β LS foram detectados. Uma das cepas era de origem ambiental, bastante semelhante à outras duas cepas ambientais, porém pouco relacionada com a cepa isolada de quadros de IMI e do tanque de expansão. Este achado reforça o conceito de que bactérias super-resistentes podem ser encontradas naturalmente no solo (HAMMAD et al, 2008). Além disto, a presença de bactérias altamente resistentes até mesmo para padrões humanos no leite pode contribuir negativamente para a comercialização do produto, e também ser responsável por surtos de enfermidades severas. A cepa isolada a partir do leite do tanque de expansão foi considerada fortemente relacionada com a cepa isolada de quadro de IMI, ambas produtoras de ES β LS. Provavelmente, da mesma maneira do que na propriedade 1, a cepa do tanque teve origem em um quadro de IMI, e não de outro ponto da propriedade. Uma cepa isolada do posterior dos animais era

produtora também de ES β L, e relacionada fortemente com uma cepa isolada a partir do reto dos animais. A colheita de swabs de reto e membros posteriores não foi necessariamente dos mesmos animais. Nota-se pela figura 3, que amostras de ambiente foram distintas de amostras de IMI e tanque de expansão, que por sua vez foram distintas de amostras de reto e posterior, formando três grandes grupos com exceção de duas amostras ambientais localizadas no grupo das amostras de IMI e tanque de expansão. A propriedade 2 apresentava galpões de free stall.

A propriedade 3 apresentou diversos casos de IMI por *K. pneumoniae* (23 casos). É importante ressaltar que dois animais tiveram o patógeno isolado de mais de um teto. Pelo resultado da PFGE, fica nítida a grande diversidade genética da bactéria dentro da propriedade; mesmo genótipos isolados de tetos adjacentes não foram fortemente relacionados. Sabe-se que bactérias ambientais possuem contato com diversas populações bacterianas, o que facilita a troca de material genético e consequente alteração no perfil genotípico. Nesta propriedade não pode concluir-se qual a origem dos casos de IMI, a origem da cepa isolada a partir do tanque de expansão e a origem da cepa produtora de ES β L. Novos pontos de coleta de swabs, e a amostragem de um maior número de animais ajudaria a traçar o perfil da propriedade. Especificamente nesta propriedade, nem todos os animais foram amostrados. Uma amostragem de animais foi selecionada por conveniência, e devido ao fato da propriedade apresentar grande numero de galpões de free stall, foi colhido apenas de um a dois swabs por galpão. Todos estes fatos podem ter colaborado para não ser possível traçar um mapa epidemiológico desta propriedade, porém, mesmo assim esperava-se encontrar cepas fortemente relacionadas, principalmente tratando-se de casos de origem semelhante (por exemplo, cepas isoladas de quadros de IMI). É possível concluir que este patógeno específico possui grande variedade genética mesmo dentro de uma mesma propriedade, conforme relatado em outros estudos (PAULIN-CURLEE et al, 2007).

Nas demais propriedades do estudo, observou-se grande variação genotípica entre as cepas bacterianas, sem a observação de cepas indistinguíveis ou fortemente relacionadas.

Na figura 12, observamos que as únicas cepas fortemente relacionadas isoladas de quadro de IMI são as mesmas isoladas da propriedade 2. Fica nítida a grande variação genética do patógeno, não sendo possível detectar clones, diferentemente do que observa-se para patógenos contagiosos (JORGENSEN et al, 2005; MORK et al, 2005; CAPURRO et al, 2010). Da mesma maneira, a figura 14 apenas confirma o observado durante o estudo, comprovando a variação genética da *K. pneumoniae* isolada a partir do tanque de expansão.

Três pontos merecem destaque:

1- A diversidade de perfis genotípicos do patógeno comprova a grande facilidade que este possui na troca de material genético. Este fato associado à presença deste no meio ambiente portando enzimas de resistência aos antimicrobianos cria um cenário de bastante preocupação.

2- Com a demanda por produtos de maior qualidade, tanto do mercado interno como de importadores de produtos brasileiros, o grau de tecnificação das propriedades tende a aumentar. Com o aumento na produtividade dos animais e diminuição na celularidade do leite, os animais tornar-se-ão cada vez mais susceptíveis às mastites por coliformes (HOGAN & LARRY SMITH 2003).

3- No caso de bovinos leiteiros os princípios medicamentosos utilizados atualmente são à base de β -lactâmicos. A terapia da vaca seca, por exemplo, é comumente adotada no mundo todo, principalmente com princípios β -lactâmicos como as penicilinas (RAJALA-SCHULTZ et al, 2004).

Diante destes três pontos, nota-se o cenário para qual o Brasil caminha. É imprescindível que exista tanto uma maior diversidade de princípios medicamentosos como uma maior cautela na utilização destes em propriedades leiteiras. Informações envolvendo resistência de coliformes isolados em propriedades leiteiras podem alertar produtores, médicos veterinários, pesquisadores e empresas farmacêuticas sobre a situação atual e futura, permitindo a aplicação de medidas preventivas visando à possibilidade da utilização por maior período de princípios β -lactâmicos.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

1. Coliformes como a *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes estão presentes em rebanhos bovinos leiteiros, não apenas isolados de quadros de infecção intramamária como também de galpões de free stall, membros posteriores dos animais, sala de ordenha e tanque de expansão.
2. *K. pneumoniae* apresentou a alta variabilidade genética em rebanhos bovinos leiteiros, mesmo dentro de um mesmo rebanho, confirmado pela técnica da PFGE.
3. A base terapêutica veterinária utilizada atualmente em propriedades leiteiras poderá se mostrar ineficaz no Brasil caso a alteração no perfil de mastites das propriedades (contagiosas para ambientais) se confirme a médio-longo prazo, como ocorrido em países de alta tecnificação da produção leiteira.

***B*IBLIOGRAFIA**

NÓBREGA, D. B.

8 BIBLIOGRAFIA

BAL, E. B.; BAYAR, S.; BAL, M. A. Antimicrobial susceptibilities of coagulase-negative staphylococci (CNS) and streptococci from bovine subclinical mastitis cases. **J Microbiol**, v.48, p.267-274, 2010.

BENGTTSSON, B.; UNNERSTAD, H. E.; EKMAN, T.; ARTURSSON, K.; NILSSON-OST, M.; WALLER, K. P. Antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of acute clinical mastitis in dairy cows. **Vet Microbiol**, v.136, n.1-2, p.142-9, 2009.

BORTOLAIA, V.; GUARDABASSI, L.; BISGAARD, M.; LARSEN, J.; BOJESEN, A. M. *Escherichia coli* producing CTX-M-1, -2, and -9 group β -lactamases in organic chicken egg production. **Antimicrob Agents Chemother**, v.54, p.3527-3528, 2010a.

BORTOLAIA, V.; GUARDABASSI, L.; TREVISANI, M.; BISGAARD, M.; VENTURI, L.; BOJESEN, A. M. High diversity of extended-spectrum β -lactamases in *Escherichia coli* isolates from Italian broiler flocks. **Antimicrob Agents Chemother**, v.54, p.1623-1626, 2010b.

BRADFORD, P. A. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. **Clin Microbiol Rev**, v.14, p.933-951, table of contents, 2001.

BRITTEN, A.; FOWLER, R.; HANSON, N.; MORRIS, N.; OOSTRA, K. Characterization of environmental streptococcal mastitis and its implication on milk quality. In MEMÓRIAS DEL CONGRESO PANAMERICANO DE CONTROL DE MASTITIS Y CALIDAD DE LA LECHE, 1., 1998, Mérida. **Anais...** Mérida, 1998. p.134-137.

CAPURRO, A.; ASPAN, A.; ARTURSSON, K.; WALLER, K. P. Genotypic variation among *Staphylococcus aureus* isolates from cases of clinical mastitis in Swedish dairy cows. **Vet J**, v.185, p.188-192, 2010.

COSTA, E. O. Importância da mastite na produção leiteira do país. **Revista da Educação Continuada**, doc do CRMV-SP, fase.1,v.1, p. 3-9, 1998.

DESHPANDE, L.; PFALLER, M. A.; JONES, R. N. In vitro activity of ceftiofur tested against clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* including extended spectrum β -lactamase producing strains. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.15, p.271-275, 2000.

DROPA, M. **Caracterização genotípica de cepas da família Enterobacteriaceae produtoras de β -lactamase de espectro estendido, isoladas de pacientes de um hospital da rede pública da cidade de São Paulo**. 2006. 116p. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

DURMAZ, R.; OTLU, B.; KOKSAL, F.; HOSOGLU, S.; OZTURK, R.; ERSOY, Y.; AKTAS, E.; GURSOY, N. C.; CALISKAN, A. The optimization of a rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for the typing of *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. **Jpn J Infect Dis**, v.62, p.372-377, 2009.

ERICSSON UNNERSTAD, H.; LINDBERG, A.; PERSSON WALLER, K.; EKMAN, T.; ARTURSSON, K.; NILSSON-OST, M.; BENGTSSON, B. Microbial aetiology of acute clinical mastitis and agent-specific risk factors. **Vet Microbiol**, v.137, p.90-97, 2009.

FERGUSON, J. D.; AZZARO, G.; GAMBINA, M.; LICITRA, G. Prevalence of mastitis pathogens in Ragusa, Sicily, from 2000 to 2006. **J Dairy Sci**, v.90, p.5798-5813, 2007.

GROHN, Y. T.; WILSON, D. J.; GONZALEZ, R. N.; HERTL, J. A.; SCHULTE, H.; BENNETT, G.; SCHUKKEN, Y. H. Effect of Pathogen-Specific Clinical Mastitis on Milk Yield in Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v.87, p.3358-3374, 2004.

HAMMAD, A. M.; AHMED, A. M.; ISHIDA, Y.; SHIMAMOTO, T. First characterization and emergence of SHV-60 in raw milk of a healthy cow in Japan. **J Vet Med Sci**, v.70, p.1269-1272, 2008.

HILLERTON, J. E.; BERRY, E. A. Treating mastitis in the cow – A tradition or an archaism. **Journal of Applied Microbiology**, v.98, n.2, p.1250-1255, 2005.

HOGAN, J.; LARRY SMITH, K. Coliform mastitis. **Vet Res**, v.34, p.507-519, 2003.

HOGAN, J. S.; WOLF, S. L.; PETTERSSON-WOLFE, C. S. Bacterial Counts in Organic Materials Used as Free-Stall Bedding Following Treatment with a Commercial Conditioner. **Journal of Dairy Science**, v.90, p.1058-1062, 2007.

JAYARAO, B.M.; GILLESPIE, B.E.; LEWIS, M.J.; DOWLEN, H.H.; OLIVER, S.P. Epidemiology of *Streptococcus uberis* intramammary infections in a dairy herd. **Journal of Veterinary Medicine**, v.46, p.433-442, 1999.

JORGENSEN, H. J.; MORK, T.; CAUGANT, D. A.; KEARNS, A.; RORVIK, L. M. Genetic variation among *Staphylococcus aureus* strains from Norwegian bulk milk. **Appl Environ Microbiol**, v.71, p.8352-8361, 2005.

KRISTULA, M. A.; DOU, Z.; TOTH, J. D.; SMITH, B. I.; HARVEY, N.; SABO, M. Evaluation of free-stall mattress bedding treatments to reduce mastitis bacterial growth. **J Dairy Sci**, v.91, p.1885-1892, 2008.

LANGONI, H.; CORRÊA, C. N. M.; CORRÊA, W. M.; BARROS, J. A.; CORRÊA, G. N. [Bovine mastitis caused by *Candida* and *Klebsiella*]. **Rev Bras Med Vet**, v.7, p.203-204, 1985.

LANGONI, H. **Etiologia da mastite bovina subclínica e clínica: Perfil da sensibilidade microbiana, controle e repercussão na produção leiteira e na saúde pública**. 1995. 200p. Tese (Livre docência em zoonoses)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

LANGONI, H.; Mastite bovina. Conceitos e fundamentos. In: ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITES, 4., 2007, Botucatu. **Anais...** Botucatu: UNESP, 2007. p.8-17.

LANGONI, H.; NOBREGA, D. B.; MENOZZI, B. . Analysis of the influence of milk production and number of lactation in bovine mastitis caused by environmental pathogens in a selected dairy farm. In: NATIONAL MASTITIS COUNCIL MEETING, 49., 2010, Albuquerque. **Anais...** Albuquerque, 2010. p. 256-257.

LOCATELLI, C.; CARONTE, I.; SCACCABAROZZI, L.; MIGLIAVACCA, R.; PAGANI, L.; MORONI, P. Extended-spectrum β -lactamase production in *E. coli* strains isolated from clinical bovine mastitis. **Vet Res Commun**, v.33 Suppl 1, p.141-144, 2009.

LOCATELLI, C.; SCACCABAROZZI, L.; PISONI, G.; MORONI, P. CTX-M1 ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* isolated from cases of bovine mastitis. **J Clin Microbiol**, v.48, p.3822-3823, 2010.

MAGALHÃES, H. R.; EL FARO, L.; CARDOSO, V. L.; DE PAZ, C. C. P.; CASSOLI, L. D.; MACHADO, P. F. Influência de fatores de ambiente sobre a contagem de células somáticas e sua relação com perdas na produção de leite de vacas da raça Holandesa. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.2, p.415-421, 2006.

McCLURE, A. M.; CHRISTOPHER, E. E.; WOLFF, W. A.; FALES, W. H.; KRAUSE, G. F.; MIRAMONTI, J. Effect of Re-15 Mutant *Salmonella typhimurium* Bacterin Toxoid on Clinical Coliform Mastitis. **Journal of Dairy Science**, v.77, p.2272-2280, 1994.

MORK, T.; TOLLERSRUD, T.; KVITLE, B.; JORGENSEN, H. J.; WAAGE, S. Comparison of *Staphylococcus aureus* genotypes recovered from cases of bovine, ovine, and caprine mastitis. **J Clin Microbiol**, v.43, p.3979-3984, 2005.

MUNOZ, M. A.; AHLSTROM, C.; RAUCH, B. J.; ZADOKS, R. N. Fecal Shedding of *Klebsiella pneumoniae* by Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v.89, p.3425-3430, 2006.

MUNOZ, M. A.; WELCOME, F. L.; SCHUKKEN, Y. H.; ZADOKS, R. N. Molecular Epidemiology of Two *Klebsiella pneumoniae* Mastitis Outbreaks on a Dairy Farm in New York State. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, n.12, p.3964-3971, 2007.

MUNOZ, M. A.; ZADOKS, R. N. *Short Communication: Patterns of Fecal Shedding of Klebsiella by Dairy Cows.* **Journal of Dairy Science**, v.90, p.1220-1224, 2007.

NAM, H. M.; LIM, S. K.; KANG, H. M.; KIM, J. M.; MOON, J. S.; JANG, K. C.; JOO, Y. S.; JUNG, S. C. Prevalence and antimicrobial susceptibility of gram-negative bacteria isolated from bovine mastitis between 2003 and 2008 in Korea. **J Dairy Sci**, v.92, p.2020-2026, 2009a.

NAM, H. M.; LIM, S. K.; KANG, H. M.; KIM, J. M.; MOON, J. S.; JANG, K. C.; JOO, Y. S.; KANG, M. I.; JUNG, S. C. Antimicrobial resistance of streptococci isolated from mastitic bovine milk samples in Korea. **J Vet Diagn Invest**, v.21, p.698-701, 2009b.

NAM, H. M.; KIM, J. M.; LIM, S. K.; JANG, K. C.; JUNG, S. C. Infectious aetiologies of mastitis on Korean dairy farms during 2008. **Res Vet Sci**, v.88, p.372-374, 2010.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL. 1999. Laboratory handbook on bovine mastitis. **National Mastitis Council**, Madison, WI.

NERO, L. A.; MAZIERO, D.; BEZERRA, M. M. S. Hábitos alimentares do consumidor de leite cru de Campo Mourão – PR. **Ciências Agrárias**, v.24, n.1, p.21-26, 2003.

O'KEEFE, A.; HUTTON, T. A.; SCHIFFERLI, D. M.; RANKIN, S. C. First detection of CTX-M and SHV extended-spectrum β -lactamases in *Escherichia coli* urinary tract isolates from dogs and cats in the United States. **Antimicrob Agents Chemother**, v.54, p.3489-3492, 2010.

PAGANI, L.; MIGLIAVACCA, R.; PALLECCHI, L.; MATTI, C.; GIACOBONE, E.; AMICOSANTE, G.; ROMERO, E.; ROSSOLINI, G. M. Emerging extended-spectrum β -lactamases in *Proteus mirabilis*. **J Clin Microbiol**, v.40, p.1549-1552, 2002.

PATERSON, D. L.; HUJER, K. M.; HUJER, A. M.; YEISER, B.; BONOMO, M. D.; RICE, L. B.; BONOMO, R. A. Extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence of SHV- and CTX-M-type β -lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**, v.47, p.3554-3560, 2003.

PAULIN-CURLEE, G. G.; SINGER, R. S.; SREEVATSAN, S.; ISAACSON, R.; RENEAU, J.; FOSTER, D.; BEY, R. Genetic diversity of mastitis-associated *Klebsiella pneumoniae* in dairy cows. **J Dairy Sci**, v.90, p.3681-3689, 2007.

PAULIN-CURLEE, G. G.; SREEVATSAN, S.; SINGER, R. S.; ISAACSON, R.; RENEAU, J.; BEY, R.; FOSTER, D. Molecular subtyping of mastitis-associated *Klebsiella pneumoniae* isolates shows high levels of diversity within and between dairy herds. **J Dairy Sci**, v.91, p.554-563, 2008.

PETTERSON-WOLFE, C. S.; ADAMS, S.; WOLF, S. L.; HOGAN, J. S. Genomic Typing of Enterococci Isolated from Bovine Mammary Glands and Environmental Sources. **Journal of Dairy Science**, v.91, p.615-619, 2008.

PHILPOT, W.N. Today's challenge to meet tomorrow's needs. In MEMÓRIAS DEL CONGRESO PANAMERICANO DE CONTROL DE MASTITIS Y CALIDAD DE LA LECHE, 1., 1998, Mérida. **Anais...** Mérida, 1998. p.12-21.

PINTO, L.; RADHOUANI, H.; COELHO, C.; MARTINS DA COSTA, P.; SIMOES, R.; BRANDAO, R. M.; TORRES, C.; IGREJAS, G.; POETA, P. Genetic detection of extended-spectrum β -lactamase-containing *Escherichia coli* isolates from birds of prey from Serra da Estrela Natural Reserve in Portugal. **Appl Environ Microbiol**, v.76, p.4118-4120, 2010.

PITKALA, A.; SALMIKIVI, L.; BREDBACKA, P.; MYLLYNIEMI, A. L.; KOSKINEN, M. T. Comparison of tests for detection of β -lactamase-producing staphylococci. **J Clin Microbiol**, v.45, p.2031-2033, 2007.

QUINN, P. J.; MARKEY, B.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Ed. Artmed. Porto Alegre, 2005. 512p.

RADHOUANI, H.; PINTO, L.; COELHO, C.; GONCALVES, A.; SARGO, R.; TORRES, C.; IGREJAS, G.; POETA, P. Detection of *Escherichia coli* harbouring extended-spectrum β -lactamases of the CTX-M classes in faecal samples of common buzzards (*Buteo buteo*). **J Antimicrob Chemother**, v.65, p.171-173, 2010.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; HINCHCLIFF, K. W.; CONSTABLE, P. D. **Veterinary Medicine**, 10 ed. Saunders Elsevier, 2007. 2156 p.

RAJALA-SCHULTZ, P. J.; SMITH, K. L.; HOGAN, J. S.; LOVE, B. C. Antimicrobial susceptibility of mastitis pathogens from first lactation and older cows. **Vet Microbiol**, v.102, p.33-42, 2004.

RYOO, N. H.; KIM, E. C.; HONG, S. G.; PARK, Y. J.; LEE, K.; BAE, I. K.; SONG, E. H.; JEONG, S. H. Dissemination of SHV-12 and CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases among clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* and emergence of GES-3 in Korea. **J Antimicrob Chemother**, v.56, p.698-702, 2005.

RYSER, E. T. Microorganisms of importance in raw milk. In MEMÓRIAS DEL CONGRESO PANAMERICANO DE CONTROL DE MASTITIS Y CALIDAD DE LA LECHE, 1., 1998, Mérida. **Anais...** Mérida, 1998. p.236-239.

SANTOS, D. F. **Características microbiológicas de *Klebsiella pneumoniae* isoladas no meio ambiente hospitalar de pacientes com infecção nosocomial**. 2007. 98p. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde) – Universidade Católica de Goiás, Goiânia.

SAS Institute, 2008. SAS/STAT User's Guide. Version 9.2, SAS Inst. Inc. Cary, NC.

SCHALM, O. W.; NOORLANDER, D. D. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.130, p.199-204, 1957.

SCHUKKEN, Y. H.; SPATZ, J. Milk production change following clinical mastitis and reproductive performance compared among J5 vaccinated and control dairy cattle. **J Dairy Sci**, v.91, p.3869-3879, 2008.

SUOJALA, L.; ORRO, T.; JARVINEN, H.; SAATSI, J.; PYORALA, S. Acute phase response in two consecutive experimentally induced *E. coli* intramammary infections in dairy cows. **Acta Vet Scand**, v.50, p.18, 2008.

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R. D.; GOERING, R. V.; MICKELSEN, P. A.; MURRAY, B. E.; PERSING, D. H.; SWAMINATHAN, B. Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoreses: Criteria for Bacterial Strain Typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, p.2233-2239, 1995.

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R. D.; GOERING, R. V. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v.18, p.426-439, 1997.

TIAN, G. B.; WANG, H. N.; ZOU, L. K.; TANG, J. N.; ZHAO, Y. W.; YE, M. Y.; TANG, J. Y.; ZHANG, Y.; ZHANG, A. Y.; YANG, X.; XU, C. W.; FU, Y. J. Detection of CTX-M-15, CTX-M-22, and SHV-2 extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in *Escherichia coli* fecal-sample isolates from pig farms in China. **Foodborne Pathog Dis**, v.6, p.297-304, 2009.

WELDHAGEN, G. F.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Ambler class A extended-spectrum β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. **Antimicrob Agents Chemother**, v.47, p.2385-2392, 2003.

WILSON, D. J.; GROHN, Y. T.; BENNETT, G. J.; GONZALEZ, R. N.; SCHUKKEN, Y. H.; SPATZ, J. Milk production change following clinical mastitis and reproductive performance compared among J5 vaccinated and control dairy cattle. **J Dairy Sci**, v.91, p.3869-3879, 2008.

WITTUM, T. E.; MOLLENKOPF, D. F.; DANIELS, J. B.; PARKINSON, A. E.; MATHEWS, J. L.; FRY, P. R.; ABLEY, M. J.; GEBREYES, W. A. CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases present in *Escherichia coli* from the feces of cattle in Ohio, United States. **Foodborne Pathog Dis**, v.7, p.1575-1579, 2010.

ZADOKS, R. N.; ALLORE, H. G.; BARKEMA, H. W.; SAMPIMON, O. C.; GROHN, Y. T.; SCHUKKEN, Y. H. Analysis of an Outbreak of *Streptococcus uberis* Mastitis. **Journal of Dairy Science**, v.84, p.590-599, 2001.

ZADOKS, R. N. General Introduction. In: ZADOKS, R. N. **Molecular and Mathematical Epidemiology of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus uberis* Mastitis in Dairy Herds**. Utrecht: Addix, 2002. p.1-26.

ZADOKS, R. N.; VAN LEEUWEN, W. B.; BARKEMA, H. W.; SAMPIMOM, O. C.; VERBRUGH, H.; SCHUKKEN, Y. H.; VAN BELKUM, A. Application of pulsed-field gel electrophoresis and binary typing as tools in veterinary clinical microbiology and molecular epidemiology of bovine and human *Staphylococcus aureus*. In: ZADOKS, R. N. **Molecular and Mathematical Epidemiology of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus uberis* Mastitis in Dairy Herds**. Utrecht: Addix, 2002. p.27-48.

ZOU, L. K.; WANG, H. N.; ZENG, B.; ZHANG, A. Y.; LI, J. N.; LI, X. T.; TIAN, G. B.; WEI, K.; ZHOU, Y. S.; XU, C. W.; YANG, Z. R. Phenotypic and genotypic characterization of β -lactam resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolated from swine. **Vet Microbiol**, v.149, p.139-146, 2011.

ANEXOS

9 ANEXOS**ANEXO 1****QUESTIONÁRIO – FATORES DE RISCO PARA CONTAMINAÇÃO DO LEITE**

Data: ____/____/____

Propriedade: _____

Entrevistado: _____

INFORMAÇÕES BÁSICAS**a)** A propriedade apresenta galpões de “free stall”?☐ SIM ☐ NÃO**b)** O leite de vaca é a principal atividade desenvolvida na propriedade?☐ SIM ☐ NÃO**c)** Número de animais em lactação: _____**d)** Litros de leite produzidos diariamente na propriedade (estimativa): _____**1- PRÉ-DIPPING****a)** A propriedade em questão realiza o pré-dipping?☐ SIM ☐ NÃO**b)** Se sim, descrever o método (desinfetante utilizado, equipamentos, secagem com papel**c)** O método está sendo realizado corretamente? A secagem do teto se mostra eficiente?☐ SIM ☐ NÃO

2- PÓS-DIPPING

a) A propriedade em questão realiza o pós-dipping?

☐ SIM ☐ NÃO

b) Se sim, descrever o método (princípio utilizado, equipamentos)

c) O método está sendo realizado corretamente?

☐ SIM ☐ NÃO

3- HIGIENE PRÉ-ORDENHA

a) A propriedade realiza algum tipo de banho ou higienização dos animais na pré-ordenha?

☐ SIM ☐ NÃO

4- ALIMENTAÇÃO

a) Existe na propriedade a prática de fornecimento de alimento aos animais após a ordenha?

☐ SIM ☐ NÃO

5- INSTALAÇÕES

a) A sala de ordenha se encontra em condições mínimas de higiene antes do início da ordenha?

☐ SIM ☐ NÃO

b) O ambiente da sala de ordenha é higienizado durante a ordenha?

☐ SIM ☐ NÃO

c) Qual o tipo de cama dos animais nos galpões de "free stall"? _____

☐ Não se aplica

6- EQUIPAMENTOS

a) Qual o tipo de ordenha realizado na propriedade? (espinha de peixe, carrossel, manual etc.)

b) As ordenhadeiras se encontram em bom estado de manutenção?

☐ SIM ☐ NÃO

c) Existe a limpeza das teteiras na pós-ordenha?

☐ SIM ☐ NÃO

d) Existe acompanhamento técnico para manutenção do equipamento (ordenhadeira)?

☐ SIM ☐ NÃO

e) Qual a frequência deste acompanhamento? _____

f) O tanque de refrigeração está em condições adequadas de manutenção (tirar fotos)

☐ SIM ☐ NÃO

g) Qual a frequência de higienização completa do tanque? _____

Trabalho Científico

10 TRABALHO CIENTÍFICO

Trabalho a ser enviado à revista “Journal of Dairy Science”

Normas:

General

Papers must be written in English. The text and all supporting materials must use American spelling and usage as given in *Merriam-Webster's Collegiate Dictionary, 11th ed.*, *Webster's Third International Dictionary*, or the *Oxford American English Dictionary*. Authors should follow the style and form recommended in *Scientific Style and Format. The CSE Manual for Authors, Editors, and Publishers*, 7th ed., published by the Council of Science Editors in cooperation with The Rockefeller University Press.

Authors should prepare their manuscripts in Microsoft Word (.doc or .docx format) and upload them using the fewest files possible to facilitate the review and editing processes.

Preparing the Manuscript File

Manuscripts should be typed double-spaced (in Microsoft Word) with lines and pages numbered consecutively, using Times New Roman font at 12 points. Special characters (e.g., Greek, math, symbols) should be inserted using the symbols palette available in this font. Complex math should be entered using MathType from Design Science (www.dessci.com). Note that equations created using the Equation Builder in Microsoft Word 2007 (and later versions) may not be compatible with earlier versions of Word or other software used in our composition system. Tables and figures should be placed in separate sections at the end of the manuscript (not placed within the text). Failure to follow these instructions may result in immediate rejection of the manuscript.

Interpretive Summary

All authors of JDS papers should provide an interpretive summary (IS) of 100 words or less that has been written for non-specialist readers. That summary

should consist of a title, the first author's last name, and a summary, which must include a sentence or two to summarize the project's expected importance, or its economic, environmental, and/or social impact (similar to the CRIS Progress Report Statement for those who must complete that form). Common abbreviations are permitted (those from the JDS Unrestricted list). The summary should appear on top of the first page of the manuscript, before the running head and title. Interpretive summaries will be peer reviewed. At publication, interpretive summaries will appear in a section at the beginning of the journal. The summaries are intended for an audience who may not be familiar with work in the author's area of expertise and for government or media researchers, and they will provide JDS readers with a brief overview of the research presented in each issue. Authors must make the summary readable by the general public. The goal is to make JDS research more visible to a wider audience and to emphasize its impact.

Headings

Major Headings. Major headings are centered (except ABSTRACT), all capitals, boldface, and consist of ABSTRACT, INTRODUCTION, MATERIALS AND METHODS, RESULTS, DISCUSSION (or RESULTS AND DISCUSSION), CONCLUSIONS (optional), APPENDIX (optional), and REFERENCES.

First Subheadings. First subheadings are placed on a separate line, begin at the left margin, the first letter of all important words is capitalized, and the headings are boldface and italic. The heading is not followed by punctuation. Text that follows a first subheading should be in a new paragraph.

Second Subheadings. Second subheadings begin the first line of a paragraph. They are indented, boldface, italic, and followed by a period. The first letter of each important word should be capitalized. The text follows immediately after the final period of the subheading.

Title Page

Across the top of the title page (first page), indicate a running head (abbreviated title) of 45 characters or less. The running head is centered and all uppercase. Our Industry Today and Hot Topic serve as the running heads for those respective article types. Short

Communications, Technical Notes, Invited Reviews, and Letters to the Editor use a running head beginning with the appropriate designation (i.e., SHORT COMMUNICATION:) followed by a short title. The title should be in boldface; the first letter of the article title and proper names are capitalized and the remainder of the title is lowercase. The title should contain words or phrases used for indexing the article. Under the title, names of authors should be typed upper and lowercase (e.g., T. E. Smith) and in boldface. Institutional addresses are displayed below the author names; footnotes referring from author names to displayed addresses should be symbols in the following order: *, †, ‡, §, #, ||, and ¶. The full name, mailing address, phone number, fax number, and e-mail address of the corresponding author should appear directly below the affiliation lines on the title page. The corresponding author will be identified by a numbered footnote and e-mail address below the accepted line on the first page of the published article (e.g., ¹Corresponding author: my.name@university.edu). Note that no period follows the corresponding author's e-mail address. Supplementary address information may be given in footnotes to the first page; use numerals for these footnotes. Acronyms (except USDA) for affiliations are discouraged unless the acronym is the official name. State or provincial postal code abbreviation is not included between city and zip code if the state or province is previously mentioned in the address (see example). Acceptable format is shown below:

J. E. Smith,* R. A. Jones,† and A. T. Peters‡

*Department of Animal Science, and

†Department of Dairy Science, University of Wisconsin, Madison 53706

‡Department of Animal Science, Utah State University, Logan 84321

Abstract

Abstracts should be limited to 2,500 keystrokes (i.e., characters plus spaces). The abstract should review important objectives, materials, results, conclusions, and applications as concisely as possible. The abstract disseminates scientific information through abstracting journals and is a convenience for readers. Open the abstract with objectives and make the abstract intelligible without reference to the manuscript. Use complete sentences and standard terms. Limit the use of abbreviations in the Abstract. Refer to the list on the inside front cover of JDS or

Appendices 1 and 2 of this document for those terms that should be defined in the abstract. If a term is used less than 3 times in the abstract, it should be spelled out at each use. Minimize the amount of data in the abstract and exclude statements of statistical probability (e.g., $P < 0.05$). Exclude references to other work because the abstracts will appear online and in indexing services without the reference list.

Key Words

After the abstract, list 2 to 4 key words or phrases; they should be typed in lowercase letters and separated by commas. Key words should be singular (e.g., “dairy cow” not “dairy cows”).

Body of the Paper

The body of the paper should contain an introduction to the problem (questions, objectives, reasons for research, and related literature); materials, methods, experimental design, and procedures; and results, discussion, conclusions, and applications. Results and discussion may be combined into a single section. If not, the results section should not contain discussion of previously published work. Results and references to tables and figures already described in the results section should not be repeated in the discussion section. The conclusions section (optional) should consist of one brief paragraph summarizing the main findings of the study

References

List only pertinent references. No more than 3 references should be needed to support a specific concept. Research papers and reviews should cite a reasonable number of references. Abstracts and articles from non-peer-reviewed magazines and proceedings should be cited sparingly. Citation of abstracts published more than 3 yr ago is strongly discouraged.

Citations in Text

In the body of the manuscript, refer to authors as follows: Smith and Jones (1992) or Smith and Jones (1990, 1992). If the sentence structure requires that

the authors' names be included in parentheses, the proper format is (Smith and Jones, 1982;

Jones, 1988a,b; Jones et al., 1993) with citations listed chronologically and then alphabetically within a year. Where there are more than 2 authors of one article, the first author's name is followed by the abbreviation et al. Work that has not been accepted for publication shall be listed in the text as: "J. E. Jones (institution, city, and state, personal communication)." The author's own unpublished work should be listed in the text as "(J. Smith, unpublished data)." Personal communications and unpublished data (including papers under review) must not be included in the references section.

References Section

To be listed in the references section, papers must be published or accepted for publication. Manuscripts submitted for publication can be cited as "unpublished data" in the text. In the references section, references shall first be listed alphabetically by author(s)' last name(s), and then chronologically. The year of publication follows the authors' names. As with text citations, two or more publications by the same author or set of authors in the same year shall be differentiated by adding lowercase letters after the date. The dates for papers with the same first author that would be abbreviated in the text as et al., even though the second and subsequent authors differ, shall also be differentiated by letters. All authors' names must appear in the reference section. Journals shall be abbreviated according to the conventional ISO abbreviations used by PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=journals>). A short list of journal title abbreviations is provided in Appendix 3 of this document. One word titles are spelled out. Inclusive page numbers must be provided and digital object identifiers (doi) should be provided whenever possible

Trabalho Científico

Genetic diversity and extended-spectrum β -lactamases production of *Klebsiella pneumoniae* isolated from dairy herds. Nóbrega. *K. pneumoniae* shows a high genetic diversity, with different strains been isolated from several sources in dairy herds. The production of β -lactamase enzymes is the main resistance mechanism to β -lactam antibiotics. The aim of this study was to access genotypic similarities and to verify the production of extended-spectrum β -lactamases of *K. pneumoniae* strains isolated from three dairy herds. The main impact of this project is that it confirmed that enzymes commonly present in bacteria isolated from nosocomial infections are also present in strains from the bulk tank, and probably these strains were responsible for intramammary infections in dairy cows.

K. PNEUMONIAE GENETIC DIVERSITY AND ESBL PRODUCTION

Genetic diversity and extended-spectrum β -lactamases production of *Klebsiella pneumoniae* isolated from dairy herds

¹D. B. Nóbrega,* M. V. S. Guiduce,* F. F. Guimarães,* D. F. Riboli,† M. L. Cunha, † H. Langoni,* and S. B. Lucheis‡

*Department of Veterinary Hygiene and Public Health, and

†Department of Microbiology and Immunology, São Paulo State University, Botucatu 18618-900, Brazil.

‡Paulista Agency of Agribusiness Technology, Bauru 17030-000, Brazil

Trabalho Científico

Diego Borin Nóbrega. Department of Veterinary Hygiene and Public Health, São Paulo State University (UNESP), Rubião Júnior District, w/n, Botucatu, C.E.P. 18618-900, SP, Brazil. (+55 14) 38116270. diegoborin@yahoo.com

Trabalho Científico

1 **ABSTRACT**

2 The objectives of this study were to isolate *K. pneumoniae* from different sources in
3 three dairy herds, use the pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) to access genotypic
4 similarities between the isolated strains within a dairy herd, and to verify the production
5 of extended-spectrum β -lactamases (ES β Ls) by both phenotypic and genotypic
6 techniques. Three dairy farms were selected, based on previous mastitis outbreaks
7 caused by *K. pneumoniae*. Milk samples were collected from lactating cows and from
8 the bulk tank, and swabs were performed in different locations, including milking
9 parlors, waiting room, freestall beds, soil, animal's hind limbs and rectum, aiming the
10 isolation of *K. pneumoniae*. All isolated *K. pneumoniae* were screened for ES β Ls
11 production by the PCR and double-disk synergy test (DDST), and submitted to the
12 pulsed-field gel electrophoresis. *K. pneumoniae* has been isolated in 27 cases of
13 intramammary infections (IMI) and in 41 swabs in different locations. *K. pneumoniae*
14 had a high diversity within the studied herds, with few strains showing high genotypic
15 similarities. From farm A and farm B, the strains isolated from IMI cases and from the
16 bulk tank were considered of the same PFGE subtype. In farm B, one cluster consisted
17 of three bed samples. In farm C, even strains isolated from the same animal showed
18 distinct genotypes. Eight strains produced ES β Ls detected by the DDST; one isolated
19 from a bulk tank, three from IMI cases and four from environmental samples. All
20 DDST positive strains were found harboring the bla_{shv} gene, one harboring the bla_{tem}
21 gene, and three harboring the bla_{ctx-m} gene, including one strain isolated from a bulk
22 tank. Our study confirms that multidrug resistant bacteria is present in different
23 locations within a dairy farm, and may reach the mammary gland and be responsible for
24 IMI onsets. The detection of ES β Ls on dairy herds could be a major concern for both
25 public and animal health.

Trabalho Científico

26

27 **Key Words:** extended-spectrum β -lactamases (ES β Ls), *Klebsiella pneumoniae*, pulsed-

28 field gel electrophoresis (PFGE).

29

30

31

INTRODUCTION

32

33 Agents such as *K. pneumoniae* and *E. coli* are commonly found in environments
34 where dairy cattle is bred, hence, they are considered to be environmental mastitis
35 agents (Hogan and Larry Smith, 2003).

36 *K. pneumoniae* is present in soil, faces, water, among other locations within a
37 dairy herd (Zadoks et al., 2011). The pathogen shows a high genetic diversity, with
38 different strains been isolated from several sources in dairy herds (Paulin-Curlee et al.,
39 2008, Verbist et al., 2011).

40 Chronic mastitis cases by coliforms that are unresponsive to treatment (Hogan et
41 al., 1989) are increasingly more frequent, and in these cases, treatment is often
42 ineffective mainly due to high coliform resistance. Rajala-Schultz et al., 2004 observed
43 that all Gram-negative bacteria isolated from IMI onsets (predominantly *E. coli*)
44 showed resistance to penicillin, oxacilin, erythromycin, pirlimycin and the combination
45 of penicillin and novobiocin. They also showed high rates of resistance to tetracycline
46 (50.0%), sulfadimethoxine (72.2%) and cephalothin (50.0%), thus showing high
47 resistance to various current antimicrobial principles, many of which are exhaustively
48 used in mastitis treatment and control. It's noteworthy that β -lactam principles, such as
49 penicillin continues to be the most frequently used drugs in veterinary medicine (Pitkala
50 et al., 2007).

51 The production of β -lactamase enzymes is the main resistance mechanism to β -
52 lactam antibiotics in Gram-negative bacteria. The development of third-generation
53 cephalosporins helped against β -lactamase-producing bacterial infections. However, a
54 new class of enzymes that were capable of hydrolyzing even these new antimicrobials

Trabalho Científico

was reported. Such enzymes became known as extended-spectrum β -lactamases (ES β Ls) and were derived from common β -lactamases.

ES β Ls producing bacteria has been isolated from bovine mastitis (Locatelli et al., 2009, Locatelli et al., 2010), meat products (Sunde et al., 2009), broilers feces or liver (Yuan et al., 2009, Bortolaia et al., 2010a, Bortolaia et al., 2010b, Hiroi et al., 2011), horses (Rankin et al., 2005, Damborg et al., 2012), pigs (Tian et al., 2009, Zou et al., 2011), dairy calves, cows and environment of dairy farms (Liebana et al., 2006, Wittum et al., 2010, Watson et al., 2012) among others.

The genes that codify ES β Ls are usually found in plasmids, and those codifying ES β Ls of types CTX-M (gene bla_{ctx-m}), TEM (bla_{tem}), PER (bla_{per}), VEB (bla_{ver}) and SHV (bla_{shv}) are noteworthy (Paterson et al., 2003, Jemima and Verghese, 2008).

The objectives of this study were to isolate *K. pneumoniae* from different sources in three dairy herds, use the pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) to access genotypic similarities between the isolated strains within a dairy herd, and to verify the production of ES β Ls by both phenotypic and genotypic techniques.

70

MATERIAL AND METHODS

72

2.1 Farms and Animals

Three dairy farms were selected, based on previous mastitis outbreaks caused by *K. pneumoniae*. Each farm was visited once, in a three month period.

All farms performed the pos-dipping routine with iodine solutions and adopted the feeding after milking strategy (up to 40 minutes of waiting time). All the animals were of Holstein Friesian breed. Information regarding each farm specifically is listed next.

Trabalho Científico

80

81 **2.1.1 Farm A.** Farm A had 59 lactating cows, raised in a grass pasture system. The
82 average milk production was 16.06 liters per animal, with bulk tank milk SCC of 528.00
83 cells/mL. The majority of animals consisted of first lactating cows (60.61%) and in the
84 late lactation days (45.45% of the cows with 240-360 DiM). The pre-milking routine
85 consisted of washing the teats with water, followed by drying with towel papers.

86

87 **2.1.2 Farm B.** Farm B had 290 lactating cows with an average milk production of 25.99
88 liters per animal and 253.00 cells/mL of bulk tank milk SCC. The majority of animals
89 was first lactating cows (42.11%) located in the range of 120-240 lactation days
90 (47.89%). The farm used a freestall system (sand bedding) with four stalls, and the pre-
91 milking routine consisted of washing the teats with water and a commercial disinfectant
92 solution based on chlorhexidine.

93

94 **2.1.3 Farm C.** Farm C had 970 lactating cows, raised in a freestall system (eight stalls)
95 with sand bedding. The average milk production was 35.05 liters per animal and had
96 380.00 somatic cells/mL in the bulk tank milk. The majority of animals was second
97 lactating cows (42.11%) located in the range of 120-240 lactation days (38.76%). The
98 pre-milking routine consisted of washing the teats with water and a commercial
99 disinfectant solution based on chlorhexidine.

100

101 **2.2 Milk Sampling**

102 All lactating cows were sampled once (except in Farm C, where an intentional
103 sampling method was applied according to previous results of the animals SSC, in order
104 to sample only animals with high counts). The California Mastitis Test – CMT (Schalm

Trabalho Científico

and Noorlander, 1957) was used at the teal level as a screening method in order to select high cellularity samples, which are indicative of infection status. From CMT score three or higher (five point scale), samples were collected following standardized procedures. In brief, after the farm's premilking routine, positive CMT teats were scrubbed with a 70% alcohol-soaked cotton pad and milk samples were aseptically collected in sterile glass vials. The samples were kept under refrigeration until arrival at the laboratory for the microbiological procedures. From the three farms, bulk tank milk samples (200 mL) were collected after homogenization. All clinical mastitis cases were sampled as well.

2.3 Swabs

Different locations were sampled, including milking parlors, waiting room, freestall beds (farms B and C), environment (farm A – soil samples), animal's hind limbs and rectum. All samples were collected using cotton pad swabs. Each swab was scrubbed in five points of square meter for at least 30 seconds and immediately stored in 3 mL of saline solution under refrigeration.

From the milking parlor and waiting room, two samples (swabs) were collected, totalizing four samples. The chosen locations were the entrance and leaving of both. From farms B and C, sampling included eight sand beds, randomly chosen and according to the number of stalls (for farm B, 2 samples from each stall; for farm C, 1 sample for each stall). In farm A, eight soil samples were collected in order to account for the sand ones in the freestall herds. The sampling spots selection in farm A included places where the animals were more likely to lay after milking.

From twelve randomly chosen animals, six swabs were collected from hind limbs and six from rectums. In both cases, the swabs were scrubbed at the regions for at least 15 seconds.

Trabalho Científico

130

131 **2.4 Microbiological Procedures**

132

133 **2.4.1 Milk.** Microbiological procedures were performed following standardized
134 procedures (National Mastitis Council, 1999) with slightly modifications. In brief, 10
135 μ L of each milk sample was streaked onto an ovine blood (8%) and MacConkey agar.
136 Readings were performed after 24, 48 and 72 hours of incubation at 37° C. Biochemical
137 tests were performed only on colonies suspected to be *Enterobacteriaceae*. The tests
138 included motility, indole production, growth on triple sugar iron, citrate and lysine
139 utilization, and urease activity. Samples recording three or more types of colonies were
140 considered contaminated and excluded for further analysis. IMI caused by *K.*
141 *pneumoniae* was defined as the positive isolation of this agent in a count of, at least, 3
142 UFC/mL.

143

144 **2.4.2 Swabs.** Each swab was stored in 3 mL of saline solution. After homogenization,
145 1mL was used to prepare dilutions (10^{-1} , 10^{-2} and 10^{-3}) on saline. Around 100 μ L of
146 each dilution, including the 10^0 , were streaked onto normal MacConkey, Levine and
147 MacConkey agar containing ampicillin (10 mg/L). This concentration is known for
148 allow the growth of all *Klebsiella* isolates while inhibiting all *E. coli* isolates (Munoz et
149 al., 2006). The plates were incubated overnight at 37° C. Colonies suspected to be
150 *Klebsiella* spp., were subjected to the biochemical tests as described before. In cases of
151 positive isolation of *K. pneumoniae* in more than one dilution in the same swab, only 1
152 colony was chosen and stored. Colonies confirmed as *K. pneumoniae* (from both milk
153 and swabs) were suspended in the BHI broth for 24 hours and frozen at -80° C in a 20%
154 glycerol solution till further analysis.

Trabalho Científico

2.4.3 ES β L detection. All isolated *K. pneumoniae* were screened for ES β Ls production by the double-disk synergy test (DDST) as described elsewhere (CLSI, 2008). Briefly, for each strain a bacterial suspension on saline was prepared (0.5 McFarland) and stroked onto a Mueller-Hinton agar (Oxoid[®]) using a sterile cotton swab. The following drugs were tested: aztreonam, ceftriaxone, cefpodoxime, ceftazidime, cefoxitime and ceftaxime (Oxoid[®]).

PCR reactions were conducted in order to identify the main ES β Ls subgroups in all isolated *K. pneumoniae*. A bacterial colony was suspended in a sterile tube containing 200 μ L of nuclease free water. This suspension was boiled for 10 minutes and centrifuged at 10.000 rpm for 10 minutes. Around 150 μ L was transferred to another sterile microtube and stored at freezer temperature. Primers and reaction conditions are presented in table 1.

(Table 1)

The references strains used were a positive ES β L producing *K. pneumoniae* (ATCC 700603), a bla_{ctx-m} positive strain stored in our laboratory, and a *E. coli* 25922.

2.4.4 PFGE. The PFGE protocol was performed according to Durmaz et al., 2009 with slightly modifications. Briefly, after overnight growth, the bacteria were diluted in a cell suspension buffer (CSB, 100 mM Tris-HCl [pH 8.0], 10 mM EDTA) to a final concentration of 1.0 absorbance at 590 nm using a NanoVue Plus[™] equipment (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). This suspension was kept at room temperature no longer than 5 minutes. A 2% low-melting point agarose (Gibco BRL, Paisley, UK) was

Trabalho Científico

prepared with 1% sodium dodecyl sulfate (SDS) added after cooling. Aliquots (200 μ L) were prepared and an equal volume of cell suspension was added and gently mixed by pipetting. About 100 μ L of this mixture was dispensed into plugs molds (10 mm x 5 mm x 1.5, Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA). The molds were kept at 4° C for 10 minutes.

Two cell lysis solutions were prepared. Cell lysis solution 1 (CLS-1; 50 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, lysozyme [2.5 mg/mL], proteinase K [1.5 mg/mL], pH 8.0) and cell lysis solution 2 (CLS-2; 0.5 M EDTA [pH 8.0], 1% sarcosyl and proteinase K [400 μ g/mL]). The plugs were removed from the plugs molds and transferred to 650 μ L of CLS-1, incubated at 37° C in a shaking water bath for 1 hour. Then, the plugs were transferred into another tube containing 650 μ L of CLS-2, and incubated at 55° C in a shaking water bath for 2 hours.

The plugs had been rinsed 3 times with sterile ultra-pure water (Reagent Grade Type 1) and the 3 times with TE buffer (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 7.6) using 4 mL for each step. These risings have been performed at 50° C in a water bath for 15 minutes. The plugs were kept at 4° C until use with 5 mL of fresh TE buffer. The restrictive digestion of DNA was performed with 30 units of the XbaI enzyme (New England BioLabs, UK) at 37° C in a water bath for 2 hours. PFGE was performed using a CHEF-DR III system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA) at 14° C, with 6 V/cm² for 20 hours, with initial and final switch times being 5 and 30 seconds respectively.

The DNA profiles were analyzed by the BioNumerics software 6.0 (Applied Maths NV, Sint-Martens-Latem, Belgium) choosing the Dice coefficient. Tolerance and optimization were both set at 1%. The strains were categorized as following: indistinguishable, closely related, possibly related of different (Tenover et al., 1997).

Trabalho Científico

Clusters were defined as strains with at least, 80% of similarities. PFGE subtypes were defined as strains having at least 95% of similarity.

2.5 Statistical Analysis

Absolute and relative frequencies were calculated for the variables in the study (CMT, swab and ES β L results). Since the study was not designed to made inferences on epidemiological factors other than the genetic profile of the isolated strains, more advanced statistical procedures were judged not necessary. The PROC FREQ procedure of the SAS software (SAS, 2008) was used for the analysis.

RESULTS

3.1 Farm A

From farm A, 236 teats were evaluated. Six teats (2.54%) were classified as missing teats and four teats (1.69%) presented themselves as clinical mastitis cases. As for the CMT results, 147 teats (62.29%) were scored as 1 or 2, 23 (9.75%) scored as 3, 24 (10.17%) scored as 4 and 32 (13.56%) scored as 5. From farm A, 81 milk samples were collected. Two milk samples were considered lost. Seven milk samples (8.64%) were considered contaminated and excluded from analysis.

Farm A had one case of IMI caused by *K. pneumoniae*. This strain was isolated from an animal in first lactation, producing an average of 16.46 liters. Also, the pathogen was isolated in seven soil samples, four samples from animal's hindlimbs, two milking parlor samples and from the bulk tank milk, totalizing 15 strains of *K. pneumoniae*. One strain from the animal's hindlimbs was non-typeable by the current protocol. Only one cluster was found in this herd. The strains isolated from the IMI case

Trabalho Científico

230 and from the bulk tank were considered of the same PGFE subtype, probably reflecting
231 a common origin.

232 Two strains from this herd produced ES β Ls detected by the DDST. One strain
233 was isolated from the milking parlor, and one from a soil sample. In both strains, it was
234 detected the bla_{shv} gene.

235

236 3.2 Farm B

237 From farm B, 1160 teats were evaluated. Forty-eight teats (4.14%) were
238 classified as missing teats and ten teats (0.86%) presented themselves as clinical
239 mastitis cases. As for the CMT results, 865 teats (73.79%) were scored as 1 or 2, 10
240 (0.86%) scored as 3, 41 (3.53%) scored as 4 and 195 (16.81%) scored as 5. From farm
241 B, 231 milk samples were collected. Twenty-five milk samples were lost or not
242 collected. One milk sample (0.43%) was considered contaminated and excluded from
243 analysis.

244 Farm B had three cases of IMI caused by *K. pneumoniae*. The animals were
245 from the sixth, fifth and third lactation, producing 28, 24 and 18 liters of milk
246 respectively. Also, the pathogen was isolated in six bed samples, three samples from
247 animal's hindlimbs, two samples from animal's rectum, two waiting room samples and
248 from the bulk tank milk, totalizing 17 strains of *K. pneumoniae*. Two strains (one from a
249 hindlimb and one from a rectum) were non-typeable by the current protocol.

250 Three clusters were detected in this herd (clusters B1, B2 and B3). One cluster
251 (B1) consisted of three bed samples (two strains of the same PFGE subtype – strains
252 B1a – and one from a different subtype – B1b). Cluster B2 consisted of three samples
253 (two strains from IMI cases and one from a bulk tank); all from different PFGE
254 subtypes (B2a, B2b and B2c respectively). The last cluster (B3) had two strains from

Trabalho Científico

different PFGE subtypes, isolated from a hindlimb and from a rectum (B3a and B3b respectively).

Five strains from this herd produced ES β Ls detected by the DDST. These strains were from different locations within the farm. Strains B1b (bed), B2a and B2b (IMI), B2c (bulk tank) and B3a (hindlimb) were positive in the DDST. In the three strains from cluster B2, both bla_{ctx-m} and bla_{shv} genes were detected. In the two other bacteria, only the bla_{shv} gene was present.

3.3 Farm C

From farm C, 1340 teats were evaluated (335 animals). Fifty-eight teats (4.33%) were classified as missing teats and nine teats (0.67) presented themselves as clinical mastitis cases. As for the CMT results, 845 teats (63.06%) were scored as 1 or 2, 37 (2.76%) scored as 3, 84 (6.27%) scored as 4 and 307 (22.91%) scored as 5. From farm B, 396 milk samples were collected. Fourty-one milk samples were lost or not collected.

Farm C had 23 cases of IMI caused by *K. pneumoniae* isolated from 20 different animals. Also, the pathogen was isolated in five bed samples, four samples from animal's hindlimbs, three samples from animal's rectum and from the bulk tank milk, totalizing 36 strains of *K. pneumoniae*. One strain from an IMI case was non-typeable by the current protocol.

No cluster was detected in this herd. Even strains isolated from the same animal showed distinct genotypes. One strain from an IMI case produced ES β Ls detected by the DDST. The bla_{tem} and bla_{shv} genes were detected by the PCR in this sample.

DISCUSSION

Trabalho Científico

280 This study was not designed to make inference about the relationship between
281 the locations sampled. The different number of swabs according to the location, the
282 sampling methodology and other factors aimed only the isolation of the bacteria on
283 different locations, in order use the PFGE to verify the genetic diversity of this pathogen
284 within the same herd. Hence, any conclusion involving risk factors and other
285 epidemiological aspects such as prevalence/incidence would be unreliable. Also,
286 comparison between the farms should also not be performed, as the milk sampling
287 method methodology was not the same in all three dairy herds.

288 Coliform mastitis is a major concern in well-managed herds. Countries
289 legislation demanding a high quality product could exert pressure to the milking
290 industry in different continents, in order to create a scenario, even in underdeveloped
291 countries, of fewer producers and higher productivity. Several countries, including
292 Brazil, are walking toward this situation. One of the consequences could be a higher
293 prevalence of environmental mastitis.

294 In our study, *K. pneumoniae* has been isolated in 27 cases of IMI and in 41
295 swabs in different locations. The presence of this pathogen in the cows' environment,
296 such as soil, bedding and feces has already been studied by other authors (Paulin-Curlee
297 et al., 2008, Zadoks et al., 2011). One hypothesis is that the animals themselves are
298 responsible for the high prevalence of these bacteria in the environment, mainly because
299 adult animals are fecal shedders of *K. pneumoniae* (Munoz et al., 2006). However, even
300 with the presence of a large number of bacteria in the environment, low prevalence of
301 IMI caused this pathogen is usually observed.

302 Farm B had clusters in environmental samples. Three beds shared the same
303 genotype as one hindlimb and a rectum sample. None had been found causing IMI, as it
304 was observed in other studies (Verbist et al., 2011). Epidemiological studies involving

Trabalho Científico

these variables would be necessary in order to study the true nature of the relationship between the different strains. Curiously, different beds shared the same genotype, and this has not been found in rectum or hindlimbs samples. We could not confirm the fecal contamination of bedding in our study. Even with the fact that we did not sampled all animals (swabs) and only one isolate per sample was typed, we could not discard a common origin of the strains that were present in the bedding. Wood-based bedding is considered to be an important way of entrance of *Klebsiella* spp. in dairy herds (Sampimon et al., 2006). However in the present study, the two free stall herds used sand as bedding. Hence, we recommend further studies with more animals sampled in order to understand the relationship between bedding and animals feces.

The absence of clusters in farm C could be attributed to the sampling methodology. Farm C had eight stalls, and only eight beds were chosen to be sampled. In this case, the maximum of one strain per stall was stored, and is more likely to have different genotypes in different stalls than different genotypes in the same environment. Also, not all the animals were sampled. In order to access the relationship between the strains in this herd, more beds and more animals should be sampled.

Outbreaks of mastitis caused by different strains of *K. pneumoniae* had already been related (Munoz et al., 2007, Paulin-Curlee et al., 2007). In our study, in farm C every strain isolated was from a different genotype, even strains isolated from adjacent teats. Being an environmental mastitis agent, these results are not uncommon for a pathogen such as *K. pneumoniae*.

In farm A and farm B, clusters involving bacteria from bulk milk tank and from IMI cases were observed. Environmental agents such as *K. pneumoniae* are commonly present in bulk milk, probably reflecting their presence in the cows' environment. In a single bulk tank, coliforms strains from different sources could be present. The fact that

Trabalho Científico

330 we observed strains of the bulk milk and IMI sharing the same genotype in a dairy herd
331 does not necessarily exclude the presence of distinct strains of the same agent in the
332 same tank. Otherwise, only the animals were to blame for high coliform count in the
333 bulk milk. However, a single cluster containing strains from IMI cases and raw milk
334 proves that mastitis agents, even environmental ones, are able to reach the final product.
335 Although this is already known, this study highlights the fact that with poorly conducted
336 mastitis therapy, we are actually leaving the milk with two types of “residues”: the
337 antimicrobial residues and the resistant bacteria, which may represent a public health
338 risk especially if both reach the bulk tank.

339 Recently, the use of antimicrobials in food-producing animals and its relation
340 with the emergence of resistant bacteria in the food chain has become of great concern.
341 It is important to improve the knowledge of factors that contribute to the dissemination
342 of genetic elements. In the present study, eight strains produced ESβLs detected by the
343 DDST and the PCR, including one from the bulk milk tank. Among the ESβL-
344 producing microorganisms, *Klebsiella* is the genus that produces the largest variety of
345 such enzymes (Paterson et al., 2003), which could be explained by the fact that these
346 microorganisms are good vectors for the transfer of plasmids that codify resistance
347 agents (Poirel et al., 2011). This fact, among others, could help to explain the high
348 diversity of the pathogen observed within a dairy herd. Strains of *K. pneumoniae* can
349 acquire resistance and other genes that contribute to the survival of the pathogen in
350 different environments. The administration of drugs during drying or the ineffective
351 treatment of mastitis cases can exert pressure for the selection and maintenance of
352 antimicrobial resistance genes. Additionally, multi-drug resistant (MDR) pathogens do
353 not necessarily result from unsuccessful intra-mammary treatment. Coliforms are
354 considered to be environmental agents, and this pathogen type has greater contact with

Trabalho Científico

bacterial populations within an environment, which facilitates the exchange of genetic material such as plasmids. Systemic treatments result in the excretion of antimicrobial residue through animals' feces, urine and milk. Antimicrobial residue contributes to pathogen selection in the environment and, through genetic material transfer, new bacteria acquire resistance genes. Such multi-drug resistant pathogens can, in adequate conditions, infect the mammary gland. Additionally, microorganisms producing resistance enzymes can be found naturally in soil, which contributes for coliforms to acquire such resistance genes (Hammad et al., 2008).

Bengtsson et al., 2009 showed that *E. coli* strains from the gastrointestinal tract of young cattle were resistant to antimicrobials not used routinely for treatment of mastitis in Sweden (like ampicillin and tetracycline). Pathogens with the same resistant profile were isolated from IMI cases, showing that the treatment on other diseases than mastitis in another animal category could also be responsible for IMI cases caused by MDR bacteria.

MDR bacteria had been isolated from the environment in dairy herds before (Watson et al., 2012). Our study confirms that this type of bacteria is present in different locations within a dairy farm, although it's not possible to infer about its true prevalence. Under favorable conditions, MDR pathogens may reach the mammary gland and be responsible for IMI onsets. And as we observed, these pathogens may reach the bulk tank and represent a potential public health risk. Treatments with β -lactams in cows with IMI caused by ES β L-producing bacteria represent an ineffective strategy, leading to economic losses.

In one strain it was observed the bla_{tem} gene. The bla_{shv} gene was observed in eight strains. More than 50% of enterobacteria isolated from human patients produce, at least, some type of TEM enzyme (particularly those from the TEM-1 group), and not all

Trabalho Científico

380 variants are considered to be ES β Ls (not showing activity in face of cephalosporins).
381 However, TEM-type ES β Ls (mainly derived from TEM-1) are capable of hydrolyzing
382 cephalosporins, but incapable of hydrolyzing carbapenems. Similarly, SHV-type
383 enzymes also have approximately 100 variants, many of which are not considered to be
384 ES β Ls. The subclasses of these enzymes must be differenced, which was not performed
385 in the present study. However, as the DDST showed the production of ES β Ls, we
386 suspect that these classes of enzymes are responsible for the phenotypic profile
387 observed, or other classes of enzymes are being produced by the bacteria. TEM and
388 SHV enzymes have already been responsible for MDR bacteria in dairy herds (Hammad
389 et al., 2008, Locatelli et al., 2009).

390 The importance of TEM and SHV enzymes has been considerably reduced due
391 to the rapid growth of the third group of ES β Ls, the CTX-M enzymes (Woodford, 2010)
392 and they are noteworthy for their increasing importance in veterinary medicine. For our
393 knowledge, our study detected for the first time a strain of *K. pneumoniae* isolated from
394 the bulk milk tank harboring the bla_{ctx-m} gene. Also, showed that these strains could be
395 responsible for IMI onsets on dairy herds, as two strains from the same herd harboring
396 the gene shared the same pulso-type. Besides that, the spread of these genes may result
397 in serious consequences to the veterinary therapeutics.

398 Three points in our study are noteworthy: First, the demand for high quality milk
399 could exert pressure for an increase in well-managed dairy herds. Second, *K.*
400 *pneumoniae* showed high diversity within the same herd, probably reflecting an ability
401 to exchange genetic material and the ability to survive in the environment, as it is
402 considered an environmental mastitis pathogen. Third, β -lactams continue to be the base
403 of veterinary therapeutics, and the ES β Ls are present in dairy herds in different
404 locations. Hence, we observe that the scenario could be worrisome in long-term. Studies

Trabalho Científico

regarding the prevalence of these enzymes and the epidemiology of *K. pneumoniae* in dairy herds could help to prevent it, in order to maintain the β -lactams as the most important class of drugs in veterinary medicine.

CONCLUSION

K. pneumoniae had a high diversity within the studied herds, probably reflecting its ability to exchange genetic elements. Even strains isolated from IMI onsets in adjacent teats showed no relationship. There seems to be a common source of environmental bacteria, however none of them were found causing IMIs. ES β Ls are present in dairy herds in bacteria isolated from different sources. The detection of ES β Ls on dairy herds could be a major concern for both public and animal health, given that these enzymes confer its owner high resistance to β -lactams, which are currently the most used antimicrobials in veterinary medicine.

REFERENCES

- Bengtsson, B., H. E. Unnerstad, T. Ekman, K. Artursson, M. Nilsson-Ost, and K. P. Waller. 2009. Antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of acute clinical mastitis in dairy cows. *Vet Microbiol* 136(1-2):142-149.
- Bortolaia, V., L. Guardabassi, M. Bisgaard, J. Larsen, and A. M. Bojesen. 2010a. *Escherichia coli* producing CTX-M-1, -2, and -9 group beta-lactamases in organic chicken egg production. *Antimicrob Agents Chemother* 54(8):3527-3528.
- Bortolaia, V., L. Guardabassi, M. Trevisani, M. Bisgaard, L. Venturi, and A. M. Bojesen. 2010b. High diversity of extended-spectrum beta-lactamases in

Trabalho Científico

- 430 *Escherichia coli* isolates from Italian broiler flocks. *Antimicrob Agents Chemother*
 431 54(4):1623-1626.
- 432 Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. Performance Standards for
 433 Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From
 434 Animals; Approved Standard - Third Edition. 3 ed., Wayne, PA.
- 435 Dallenne, C., A. Da Costa, D. Decre, C. Favier, and G. Arlet. 2010. Development of a
 436 set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-
 437 lactamases in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* 65(3):490-495.
- 438 Damborg, P., P. Marskar, K. E. Baptiste, and L. Guardabassi. 2012. Faecal shedding of
 439 CTX-M-producing *Escherichia coli* in horses receiving broad-spectrum
 440 antimicrobial prophylaxis after hospital admission. *Vet Microbiol* 154(3-4):298-
 441 304
- 442 Durmaz, R., B. Otlu, F. Koksall, S. Hosoglu, R. Ozturk, Y. Ersoy, E. Aktas, N. C.
 443 Gursay, and A. Caliskan. 2009. The optimization of a rapid pulsed-field gel
 444 electrophoresis protocol for the typing of *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia*
 445 *coli* and *Klebsiella* spp. *Jpn J Infect Dis* 62(5):372-377.
- 446 Hammad, A. M., A. M. Ahmed, Y. Ishida, and T. Shimamoto. 2008. First
 447 characterization and emergence of SHV-60 in raw milk of a healthy cow in Japan. *J*
 448 *Vet Med Sci* 70(11):1269-1272.
- 449 Hiroi, M., T. Harada, F. Kawamori, N. Takahashi, T. Kanda, K. Sugiyama, T. Masuda,
 450 Y. Yoshikawa, and N. Ohashi. 2011. A survey of beta-lactamase-producing
 451 *Escherichia coli* in farm animals and raw retail meat in Shizuoka Prefecture, Japan.
 452 *Jpn J Infect Dis* 64(2):153-155.
- 453 Hogan, J., and K. Larry Smith. 2003. Coliform mastitis. *Vet Res* 34(5):507-519.

Trabalho Científico

- 454 Hogan, J. S., K. L. Smith, K. H. Hoblet, P. S. Schoenberger, D. A. Todhunter, W. D.
 455 Hueston, D. E. Pritchard, G. L. Bowman, L. E. Heider, B. L. Brockett, and et al.
 456 1989. Field survey of clinical mastitis in low somatic cell count herds. *J Dairy Sci*
 457 72(6):1547-1556.
- 458 Jemima, S. A., and S. Verghese. 2008. Multiplex PCR for bla(CTX-M) & bla(SHV) in
 459 the extended spectrum beta lactamase (ESBL) producing gram-negative isolates.
 460 *Indian J Med Res* 128(3):313-317.
- 461 Liebana, E., M. Batchelor, K. L. Hopkins, F. A. Clifton-Hadley, C. J. Teale, A. Foster,
 462 L. Barker, E. J. Threlfall, and R. H. Davies. 2006. Longitudinal farm study of
 463 extended-spectrum beta-lactamase-mediated resistance. *J Clin Microbiol*
 464 44(5):1630-1634.
- 465 Locatelli, C., I. Caronte, L. Scaccabarozzi, R. Migliavacca, L. Pagani, and P. Moroni.
 466 2009. Extended-spectrum beta-lactamase production in *E. coli* strains isolated from
 467 clinical bovine mastitis. *Vet Res Commun* 33 Suppl 1:141-144.
- 468 Locatelli, C., L. Scaccabarozzi, G. Pisoni, and P. Moroni. 2010. CTX-M1 ESBL-
 469 producing *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* isolated from cases of bovine
 470 mastitis. *J Clin Microbiol* 48(10):3822-3823.
- 471 Munoz, M. A., C. Ahlstrom, B. J. Rauch, and R. N. Zadoks. 2006. Fecal shedding of
 472 *Klebsiella pneumoniae* by dairy cows. *J Dairy Sci* 89(9):3425-3430.
- 473 Munoz, M. A., F. L. Welcome, Y. H. Schukken, and R. N. Zadoks. 2007. Molecular
 474 epidemiology of two *Klebsiella pneumoniae* mastitis outbreaks on a dairy farm in
 475 New York State. *J Clin Microbiol* 45(12):3964-3971.
- 476 National Mastitis Council. 1999. Laboratory Handbook on Bovine Mastitis. Natl.
 477 Mastitis Counc., Madison, WI.

Trabalho Científico

- 478 Pagani, L., R. Migliavacca, L. Pallecchi, C. Matti, E. Giacobone, G. Amicosante, E.
 479 Romero, and G. M. Rossolini. 2002. Emerging extended-spectrum beta-lactamases
 480 in *Proteus mirabilis*. *J Clin Microbiol* 40(4):1549-1552.
- 481 Paterson, D. L., K. M. Hujer, A. M. Hujer, B. Yeiser, M. D. Bonomo, L. B. Rice, and R.
 482 A. Bonomo. 2003. Extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae*
 483 bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence
 484 of SHV- and CTX-M-type beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*
 485 47(11):3554-3560.
- 486 Paulin-Curlee, G. G., R. S. Singer, S. Sreevatsan, R. Isaacson, J. Reneau, D. Foster, and
 487 R. Bey. 2007. Genetic diversity of mastitis-associated *Klebsiella pneumoniae* in
 488 dairy cows. *J Dairy Sci* 90(8):3681-3689.
- 489 Paulin-Curlee, G. G., S. Sreevatsan, R. S. Singer, R. Isaacson, J. Reneau, R. Bey, and D.
 490 Foster. 2008. Molecular subtyping of mastitis-associated *Klebsiella pneumoniae*
 491 isolates shows high levels of diversity within and between dairy herds. *J Dairy Sci*
 492 91(2):554-563.
- 493 Pitkala, A., L. Salmikivi, P. Bredbacka, A. L. Myllyniemi, and M. T. Koskinen. 2007.
 494 Comparison of tests for detection of beta-lactamase-producing staphylococci. *J Clin*
 495 *Microbiol* 45(6):2031-2033.
- 496 Poirel, L., G. Revathi, S. Bernabeu, and P. Nordmann. 2011. Detection of NDM-1-
 497 producing *Klebsiella pneumoniae* in Kenya. *Antimicrob Agents Chemother*
 498 55(2):934-936.
- 499 Rajala-Schultz, P. J., K. L. Smith, J. S. Hogan, and B. C. Love. 2004. Antimicrobial
 500 susceptibility of mastitis pathogens from first lactation and older cows. *Vet*
 501 *Microbiol* 102(1-2):33-42.

Trabalho Científico

- Rankin, S. C., J. M. Whichard, K. Joyce, L. Stephens, K. O'Shea, H. Aceto, D. S. Munro, and C. E. Benson. 2005. Detection of a bla(SHV) extended-spectrum {beta}-lactamase in *Salmonella enterica* serovar Newport MDR-AmpC. *J Clin Microbiol* 43(11):5792-5793.
- Sampimon, O. C., J. Sol, and P. A. Kock. 2006. [An outbreak of *Klebsiella pneumoniae* mastitis]. *Tijdschr Diergeneeskd* 131(1):2-4.
- SAS Institute. 2008. SAS/STAT User's Guide. Version 9.2. SAS Inst. Inc., Cary, NC.
- Schalm, O. W., and D. O. Noorlander. 1957. Experiments and observations leading to development of the California mastitis test. *J Am Vet Med Assoc* 130(5):199-204.
- Sunde, M., H. Tharaldsen, J. S. Slettemeas, M. Norstrom, A. Carattoli, and J. Bjorland. 2009. *Escherichia coli* of animal origin in Norway contains a blaTEM-20-carrying plasmid closely related to blaTEM-20 and blaTEM-52 plasmids from other European countries. *J Antimicrob Chemother* 63(1):215-216.
- Tenover, F. C., R. D. Arbeit, and R. V. Goering. 1997. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. *Infect Control Hosp Epidemiol* 18(6):426-439.
- Tian, G. B., H. N. Wang, L. K. Zou, J. N. Tang, Y. W. Zhao, M. Y. Ye, J. Y. Tang, Y. Zhang, A. Y. Zhang, X. Yang, C. W. Xu, and Y. J. Fu. 2009. Detection of CTX-M-15, CTX-M-22, and SHV-2 extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in *Escherichia coli* fecal-sample isolates from pig farms in China. *Foodborne Pathog Dis* 6(3):297-304.

Trabalho Científico

- 525 Verbist, B., V. Piessens, A. Van Nuffel, L. De Vuyst, M. Heyndrickx, L. Herman, E.
526 Van Coillie, and S. De Vliegher. 2011. Sources other than unused sawdust can
527 introduce *Klebsiella pneumoniae* into dairy herds. *J Dairy Sci* 94(6):2832-2839.
- 528 Watson, E., S. Jeckel, L. Snow, R. Stubbs, C. Teale, H. Wearing, R. Horton, M.
529 Toszeghy, O. Tearne, J. Ellis-Iversen, and N. Coldham. 2012. Epidemiology of
530 extended spectrum beta-lactamase *E. coli* (CTX-M-15) on a commercial dairy farm.
531 *Vet Microbiol* 154(3-4):339-346.
- 532 Wittum, T. E., D. F. Mollenkopf, J. B. Daniels, A. E. Parkinson, J. L. Mathews, P. R.
533 Fry, M. J. Abley, and W. A. Gebreyes. 2010. CTX-M-type extended-spectrum beta-
534 lactamases present in *Escherichia coli* from the feces of cattle in Ohio, United
535 States. *Foodborne Pathog Dis* 7(12):1575-1579.
- 536 Woodford, N. 2010. Rapid characterization of beta-lactamases by multiplex PCR.
537 *Methods Mol Biol* 642:181-192.
- 538 Yuan, L., J. H. Liu, G. Z. Hu, Y. S. Pan, Z. M. Liu, J. Mo, and Y. J. Wei. 2009.
539 Molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing
540 *Escherichia coli* isolates from chickens in Henan Province, China. *J Med Microbiol*
541 58(Pt 11):1449-1453.
- 542 Zadoks, R. N., H. M. Griffiths, M. A. Munoz, C. Ahlstrom, G. J. Bennett, E. Thomas,
543 and Y. H. Schukken. 2011. Sources of *Klebsiella* and *Raoultella* species on dairy
544 farms: be careful where you walk. *J Dairy Sci* 94(2):1045-1051.
- 545 Zou, L. K., H. N. Wang, B. Zeng, A. Y. Zhang, J. N. Li, X. T. Li, G. B. Tian, K. Wei,
546 Y. S. Zhou, C. W. Xu, and Z. R. Yang. 2011. Phenotypic and genotypic
547 characterization of beta-lactam resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolated from
548 swine. *Vet Microbiol* 149(1-2):139-146.
- 549

Trabalho Científico

550

Table 1.

Oligonucleotide sequences, annealing temperature (T °C), direction and reference of the primers used to detect the extended-spectrum β -lactamases genes.

Gene	Direction	Primer sequence (5' - 3')	T	Reference
bla _{tem}	forward	CATTTTCGTGTCGCCCTTATTC	60	Dallenne et al. (2010)
bla _{tem}	reverse	CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC	60	Dallenne et al. (2010)
bla _{ctx-m}	forward	ATGTGCAGYACCAGTAARGT	50	Pagani et al. (2002)
bla _{ctx-m}	reverse	TGGGTRAARTARGTSACCAGA	50	Pagani et al. (2002)
bla _{shv}	forward	ATGCGTTATATTGCCTGTGTA	50	This study
bla _{shv}	reverse	TTAGCGTTGCCAGTGCTCGATCAG	50	This study

551

552

553