

**LEONARDO EMANUEL DE OLIVEIRA COSTA**

**RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS EM BACTÉRIAS  
COMENSAIS DE BOVINO DE LEITE**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Microbiologia Agrícola, para  
obtenção do título de *Magister  
Scientiae*

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2006

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

C837r  
2006

Costa, Leonardo Emanuel de Oliveira, 1979-  
Resistência a antibióticos em bactérias comensais de  
bovino de leite / Leonardo Emanuel de Oliveira Costa.  
– Viçosa : UFV, 2006.  
x, 54f. : il. ; 29cm.

Orientador: Elza Fernandes de Araújo.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f. 49-54.

1. Drogas - Resistência em microorganismos.  
2. Microorganismos - Genética. 3. Microorganismos -  
Ecologia. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 630.279

**LEONARDO EMANUEL DE OLIVEIRA COSTA**

**RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS EM BACTÉRIAS  
COMENSAIS DE BOVINO DE LEITE**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Microbiologia Agrícola, para  
obtenção do título de *Magister  
Scientiae*

APROVADA: 11 de setembro de 2006

---

**Prof. Hilário Cuquetto Mantovani**  
(Co-orientador)

---

**Prof<sup>ª</sup>. Marisa Vieira de Queiroz**  
(Co-orientadora)

---

**Prof. Marcos Rogério Tótola**

---

**Prof<sup>ª</sup> Maria Aparecida S. Moreira**

---

**Prof<sup>ª</sup>. Elza Fernandes de Araújo**  
(Orientadora)

Dedico a Deus.

À minha mãe.

À Tia Luci.

À avó Desnia.

## **AGRADECIMENTO**

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola do Departamento de Microbiologia, pela oportunidade de realização do curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

À professora Elza Fernandes de Araújo, pela dedicação e orientação nos trabalhos de pesquisa.

Ao professor Hilário Cuquetto Mantovani, pelo aconselhamento, sugestões e por disponibilizar o laboratório de Microbiologia de Anaeróbios.

À professora Marisa Vieira de Queiroz, pelas dicas e aconselhamentos.

Ao professor Marcos Rogério Tótola, pela acolhida no Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio Ambiente.

Ao professor Antônio Galvão, pela amizade, sugestões e ensinamentos sobre a utilização da câmara de anaerobiose.

À professora Maria Cristina, pela aquisição dos cilindros com gases para a câmara de anaerobiose.

Ao professor da UFMG, Jacques R. Nicolli, por ter cedido uma cópia do manual NCCLS M 11-A6 para testes de resistência a antibióticos em anaeróbios.

Aos demais professores do Departamento que, de alguma forma, contribuíram para minha formação.

À minha namorada Kécya, pelo companheirismo e paciência, principalmente na reta final do mestrado.

Ao amigo João Julio, pela amizade, pela convivência solidária na república e pela ajuda nos momentos difíceis.

Ao amigo Rafael do Laboratório de Genética pela colaboração durante os experimentos de RAPD.

Ao Cláudio, ao Chico e demais funcionários da unidade de ensino, pesquisa e extensão em gado de leite do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, pela ajuda na coleta de material.

Ao Luiz Carlos, funcionário do Departamento de Veterinária, por ceder sangue de carneiro para ser incorporado ao meio de cultura, utilizado em parte dos experimentos.

Ao Danilo, Evandro, Paulo e Toninho, pelo auxílio constante.

À Nilcea, Laura e Aparecida pelo apoio e pelo carinho.

Aos amigos dos laboratórios de Genética de Microrganismos, Microbiologia de Anaeróbios e Biodiversidade e Biotecnologia para o Meio Ambiente, pela acolhida e auxílio durante os experimentos.

Aos amigos dos demais laboratórios do Departamento de Microbiologia, pelo apoio constante.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, colaboraram para realização deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

Leonardo Emanuel de Oliveira Costa, filho de Lucymar de Oliveira Costa, nasceu no dia primeiro de novembro de 1979, em Juiz de Fora.

Em março de 1998, ingressou na Universidade Federal de Juiz de Fora, no Curso de Farmácia e Bioquímica.

Em março de março de 2002 conclui o curso de Farmácia.

Em março de 2003 e fevereiro de 2004, concluiu as habilitações em Análises Clínicas, e Indústria, respectivamente.

No período de setembro de 2000 a julho de 2001, foi bolsista de iniciação científica do BIC/UFJF, sob orientação da professora Rosângela Abreu M. de Barros.

No período de setembro de 2003 a fevereiro de 2004 foi bolsista de extensão da UFJF, sob orientação do professor Márcio Tavares Rodrigues.

Em agosto de 2004, ingressou no Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, na Universidade Federal de Viçosa.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>ix</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>3</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>14</b>
<b>3.1. Animais e coleta de material .....</b>	<b>14</b>
<b>3.2. Isolamento de bactérias do rúmen e das fezes .....</b>	<b>15</b>
<b>3.2.1. Isolamento de bactérias .....</b>	<b>15</b>
<b>3.2.2. Verificação da pureza dos isolados .....</b>	<b>16</b>
<b>3.2.3. Cultivo dos isolados em aerobiose e microaerofilia .....</b>	<b>16</b>
<b>3.2.4. Armazenamento e cultura-estoque dos isolados .....</b>	<b>17</b>
<b>3.3. Avaliação da resistência dos isolados aos antibióticos .....</b>	<b>17</b>
<b>3.3.1. Reativação das culturas .....</b>	<b>17</b>
<b>3.3.2. Padronização da densidade do inóculo .....</b>	<b>18</b>
<b>3.3.3. Inoculação dos isolados em meio sólido .....</b>	<b>18</b>
<b>3.4. Extração de DNA total dos isolados resistentes a antibióticos .....</b>	<b>19</b>
<b>3.5. Diversidade genética dos isolados resistentes a antibióticos por meio de polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD) .....</b>	<b>20</b>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>22</b>
<b>4.1. Isolamento de bactérias do rúmen e das fezes de bovino .....</b>	<b>22</b>
<b>4.2. Resistência dos isolados aos antibióticos.....</b>	<b>26</b>
<b>4.3. Diversidade genética dos isolados resistentes aos antibióticos.....</b>	<b>41</b>
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>48</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>49</b>

## RESUMO

COSTA, Leonardo Emanuel de Oliveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2006. **Resistência a antibióticos em bactérias comensais de bovino de leite.** Orientadora: Elza Fernandes de Araújo. Co-orientadores: Hilário Cuquetto Mantovani e Marisa Vieira de Queiroz

Neste trabalho, foram isoladas 97 bactérias do rúmen e 87 bactérias das fezes de três bovinos, alimentados com ração (24% proteína) e silagem de milho. A resistência dos isolados bacterianos aos antibióticos foi avaliada, por meio do método de diluição em agar, utilizando-se os seguintes antimicrobianos: ácido nalidíxico (NAL), ampicilina (AMP), cloranfenicol (CHL), eritromicina (ERY), estreptomicina (STR), penicilina (PEN) e tetraciclina (TET). A diversidade genética de 29 isolados do rúmen e 28 isolados das fezes foi avaliada, por meio da técnica de polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD). Dentre as bactérias isoladas do rúmen, aproximadamente cinquenta e sete por cento foram obtidas do animal 1, treze por cento obtidas do animal 2 e vinte e nove por cento foram obtidas do animal 3. Os percentuais de isolados, obtidos das fezes, foram 62,1, 10,3 e 27,6 para os animais 1, 2 e 3, respectivamente. Considerando todos os isolados do rúmen, os percentuais de isolados resistentes aos antibióticos foram: NAL 100 %, AMP 59,8 %, CHL 3,1 %, ERY 21,6 %, STR 10,3 %, PEN 97,9 % e TET 78,3 %. Para todos os isolados das fezes, os percentuais de isolados resistentes foram: NAL 100 %, AMP 54,0 %, ERY 20,7 %, STR 2,3 %, PEN 96,5 % e TET 32,2 %. Nenhum isolado do rúmen ou das fezes foi, simultaneamente, resistente

aos sete antibióticos. Os isolados do rúmen, que apresentaram maior número de marcas de resistência, foram simultaneamente resistentes a seis antibióticos, enquanto os obtidos das fezes foram simultaneamente resistentes a cinco antibióticos. Entre os isolados do rúmen, que apresentaram resistência a cinco ou seis antibióticos, nenhum foi resistente ao cloranfenicol. A maioria dos isolados, que apresentaram quatro marcas, foram simultaneamente resistentes ao ácido nalidíxico, à ampicilina, à penicilina e à tetraciclina, enquanto a maioria dos isolados que apresentaram três marcas de resistência foram resistentes ao ácido nalidíxico, à ampicilina e à penicilina. Os dados obtidos indicam uma provável relação entre o perfil de resistência das bactérias do rúmen e perfil de resistência das bactérias das fezes, quanto aos antibióticos: ácido nalidíxico, ampicilina, eritromicina, penicilina e tetraciclina. Os valores de distância genética para os isolados do rúmen variaram de 58 % a 100 %, indicando grande diversidade genética entre esses isolados. Os valores de distância genética entre os isolados das fezes variaram de 16 % a 96 %, indicando grande diversidade genética entre os isolados, sendo estes valores menores em comparação com os isolados do rúmen.

## **ABSTRACT**

COSTA, Leonardo Emanuel de Oliveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2006. **Antibiotic resistance in bacteria of dairy cattle**. Adviser: Elza Fernandes de Araújo. Co-Advisers: Hilário Cuquetto Mantovani and Marisa Vieira de Queiroz

Ninety seven bacteria from the rumen and eighty seven ones from the feces were isolated from three dairy cows, feeding ration (24% protein) and corn ensilage. The resistance of the isolates to antibiotics were evaluated by using the agar dilution procedure for the following antimicrobials: nalidixic acid (NAL), ampicillin (AMP), chloramphenicol (CHL), erythromycin (ERY), streptomycin (STR), penicillin (PEN) and tetracycline (TET). The genetic diversity of 29 isolates from the rumen and 28 isolates from the feces were evaluated by Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD). Approximately fifty seven percent isolates were obtained from animal one, thirteen percent from animal two, and twenty nine percent from animal three. The percent isolates obtained from feces were 62.1; 10.3; 27.6 for animal one, two and three, respectively. Considering all rumen isolates, the percent isolates resistant to the antimicrobial under test were: NAL 100 %; AMP 59.8 %; CHL 3.1 %; ERY 21.6 %; SRT 10.3 %; PEN 97.9 %; and TET 78.3 %. The overall resistance of the isolates from the feces were: NAL 100 %; AMP 54.0 %; ERY 20.7 %; STR 2.3 %; PEN 96.5 %; and TET 32.2 %. No isolates from the rumen or feces were simultaneously resistant to all antibiotics. The rumen isolates presenting the highest number of resistance marks were simultaneously resistant to six antibiotics, whereas the feces isolates were

simultaneously resistant to five antibiotics. Among the rumen isolates showing six or five marks, neither one was resistant to chloramphenicol. Most isolates showing four marks were simultaneously resistant to the nalidixic acid, ampicillin, penicillin and tetracycline, whereas most isolates showing three marks were resistant to the nalidixic acid, ampicillin and penicillin. Those data suggest the profile resistant of the isolates from the rumen to be related to the resistance pattern of the isolates from the feces, relative to nalidixic acid, ampicillin, erythromycin, penicillin and tetracycline. The values of the genetic distance for rumen isolates ranged from 58% to 100%, therefore indicating high genetic diversity among those isolates. The values of the genetic distance among the feces isolates ranged from 16% to 96%, so indicating a high genetic diversity among isolates, as being those values lower, compared to rumen isolates.

## 1. INTRODUÇÃO

Os antibióticos têm sido empregados na agricultura há mais de 50 anos, mas sua utilização como promotores de crescimento em animais domésticos tem sido criticada devido aos possíveis riscos à saúde pública.

Muitos receios estão baseados no fato que o uso corriqueiro de antibióticos, tanto na medicina humana quanto na medicina veterinária, pode acarretar uma pressão seletiva sobre bactérias resistentes a antibióticos, que ocorrem naturalmente em uma população. A seleção dessas linhagens bacterianas resistentes pode representar um risco para a sanidade animal e humana, por possibilitar o surgimento de bactérias comensais e patogênicas multirresistentes. Vários antibióticos, utilizados como promotores de crescimento, possuem estrutura química semelhante ou idêntica aos antibióticos utilizados na terapêutica humana e veterinária.

Os resultados dos primeiros estudos de transferência de bactérias resistentes e, ou de genes, que conferem resistência aos antimicrobianos entre animais e o homem, levaram ao banimento dessas drogas usadas na medicina humana como promotores de crescimento. Desta forma, os produtores passaram a administrar, à dieta dos animais, antibióticos que não eram utilizados na terapêutica humana. Algumas décadas depois, verificou-se o surgimento de resistência cruzada entre os promotores de crescimento e os antibióticos, de estrutura semelhante, usados na medicina humana.

Foi demonstrado *in vitro*, que bactérias comensais de animais podem transferir os genes, que conferem resistência a bactérias comensais humanas e algumas bactérias patogênicas. Em animais ruminantes, o rúmen pode servir como reservatório de genes

que conferem resistência, além de apresentar características que contribuem para aumentar a frequência de transferência horizontal de genes *in vivo*. Essas características incluem a alta concentração bacteriana, a alta diversidade populacional existente e a possibilidade de contato direto entre os vários microrganismos presentes.

Alguns microrganismos alóctones têm a capacidade de sobreviver à passagem no trato gastrointestinal dos ruminantes, sendo lançados ao ambiente. Esses microrganismos podem adquirir e disseminar genes, que conferem resistência ao ambiente ou, ainda, contaminar o alimento que chega até a mesa dos consumidores.

Apesar da ampla discussão sobre o tema, pouco se sabe sobre o nível de resistência a antibióticos em bactérias comensais de animais, que não fazem uso corriqueiro de antibióticos, tanto na forma de promotores de crescimento como em uso terapêutico ou profilático. Objetivou-se com este trabalho isolar bactérias comensais do rúmen e das fezes de bovinos de leite, avaliar a resistência dos isolados a sete antibióticos e analisar a diversidade genética dos isolados resistentes aos antibióticos.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

No Brasil, o rebanho bovino ultrapassou a marca de 204 milhões de cabeças em 2004 (IBGE, 2005). As regiões Centro-Oeste e Sudeste agregam os maiores rebanhos, sendo a primeira responsável por, aproximadamente, 71 milhões de cabeças e a segunda por aproximadamente 39 milhões de bovinos. O Mato Grosso possui o maior rebanho do país (aproximadamente 26 milhões de cabeças), seguindo-se Mato Grosso do Sul (aproximadamente 25 milhões de cabeças) e Minas Gerais (aproximadamente 22 milhões de cabeças) (IBGE, 2005). O abate de bovinos no ano 2005 foi de 28 milhões de cabeças, o que representou um aumento de 8,0 % em relação ao ano 2004 (IBGE, 2005).

Além da produção de carne, outra importância da bovinocultura é a produção de leite. Segundo a Food and Agriculture Organization (FAO) das Nações Unidas (ONU), o suprimento de leite em países em desenvolvimento expandiu mais de 122% entre 1980 e 2002. Dos países em desenvolvimento, a Índia, o Brasil e a China representam 50% do suprimento total de leite (FAO, 2005). A produção de leite no Brasil, no ano 2004, ficou em torno de 24 bilhões de litros, representando uma receita da ordem de R\$ 11 bilhões. O Estado de Minas Gerais é o principal produtor de leite, com mais de 6 bilhões de litros, o que representa uma receita na ordem de R\$ 3 bilhões (IBGE, 2005).

Entre os animais de produção, os bovinos são os que mais recebem medicamentos no Brasil. Estes medicamentos geram um faturamento acima de R\$ 1

bilhão, representando mais da metade do faturamento do mercado de medicamentos para uso veterinário. Os antibióticos são a segunda maior classe de medicamentos para uso em animais, com um faturamento aproximado de R\$ 471 milhões (SINDAN, 2005).

Os animais ruminantes correspondem a uma importante fonte de alimento para consumo humano. Os ruminantes alimentam-se principalmente de fibra vegetal, em áreas que não são normalmente utilizadas para agricultura e complementam a produção agrícola, alimentando-se de subprodutos da agricultura, como palha e sabugo (Flint, 1997).

O estômago dos animais ruminantes é dividido em vários compartimentos: o rúmen, o abomaso, o omaso e o retículo, sendo o maior deles o rúmen (70 a 80 litros). No animal recém-nascido, o rúmen é pouco desenvolvido, permanecendo desta forma enquanto a alimentação do animal constitui-se apenas de leite. A ingestão de alimentos sólidos estimula o desenvolvimento gradual do rúmen, distinguindo-o do estômago verdadeiro (Hastings, 1944). O ambiente ruminal é anaeróbico e sua temperatura média é de 39°C.

A intensa fermentação, que ocorre no rúmen, pode resultar em valores de pH muito baixos, porém, o processo de regurgitação realizado pelo animal leva para o rúmen grande volume de saliva. Como o pH salivar é de aproximadamente 8,2, e a saliva é rica em tampão bicarbonato ( $pK_a$  6,7), o pH ruminal é mantido constante (Hastings, 1944). Outro fenômeno que favorece a manutenção do pH no rúmen são as contrações normais do órgão, que permitem não só a mistura da digesta ruminal como, também, possibilita a absorção de ácidos orgânicos pelo animal. Os ácidos orgânicos, absorvidos pelo epitélio ruminal, são utilizados como fonte de energia (Russell & Rychlik, 2001).

O rúmen contém uma elevada população de microrganismos, que fornecem as enzimas necessárias à quebra da celulose e de outros compostos presentes na parede celular das plantas, permitindo que o ruminante retire o substrato para sua alimentação a partir de fibras vegetais.

A microbiota ruminal confere, ao ruminante, uma vantagem competitiva em relação a outros animais herbívoros, como a possibilidade de o animal sobreviver, ao ingerir plantas que produzem compostos secundários que, geralmente, são tóxicos para os outros animais (Arcuri & Mantovani, 2006). Por outro lado, o animal fornece aos microrganismos ambiente favorável ao seu crescimento e os microrganismos são fontes de proteínas, vitaminas e ácidos orgânicos para o animal (Russell & Rychlik, 2001).

Além destas características, que favorecem a manutenção das comunidades microbianas do rúmen, a ingestão periódica de alimentos pelo animal fornece nutrientes necessários ao crescimento de microrganismos.

As populações bacterianas do rúmen incluem microrganismos digestores de celulose, de amido, de hemicelulose, fermentadores de açúcar, utilizadores de ácidos orgânicos, metanogênicos, bactérias proteolíticas e lipolíticas. O rúmen apresenta grande diversidade de espécies bacterianas, sendo que os gêneros predominantes são *Bacteroides*, *Prevotella*, *Fibrobacter*, *Ruminococcus*, *Succinomonas*, *Methanobacterium*, *Butyrivibrio*, *Selenomonas*, *Succinivibrio*, *Streptococcus*, *Eubacterium*, *Lactobacillus*, entre outras (Atlas & Bartha, 1998). A comunidade bacteriana desempenha papel fundamental na fermentação, podendo atingir densidades acima de  $10^{10}$  células por mL ou por grama de digesta (Russell & Rychlik, 2001).

Considerando a complexidade de populações bacterianas, diversas interações biológicas acontecem no rúmen, envolvendo diferentes grupos de microrganismos. As interações entre bactérias incluem transferência interespecífica de hidrogênio, “crossfeeding” de produtos da fermentação, de oligômeros e de monômeros derivados da degradação dos polímeros e a produção de bacteriocinas por espécies bacterianas, predominantes no rúmen (Flint, 1997). Estudos das vias metabólicas de algumas bactérias do rúmen, isoladas em laboratório, demonstraram que várias espécies produzem produtos finais, que não podem ser detectados no líquido ruminal, como o etanol e ácido succínico. Estes intermediários são alvos de fermentações secundárias por outras espécies bacterianas (Atlas & Bartha, 1998; Russell & Rychlik, 2001).

A estrutura da comunidade bacteriana do rúmen varia de acordo com as mudanças na dieta do animal (Tajima et al., 2000). Plantas ingeridas podem conter grande quantidade de celulose, de hemicelulose ou de amido. De acordo com a composição da dieta ingerida pelo animal, a eficiência da fermentação é alterada. Os produtores têm buscado manipular a estrutura da comunidade bacteriana do rúmen, por meio da composição da dieta e pela administração de promotores de crescimento (antibióticos), visando maior rendimento na produção.

Os antibióticos podem ser utilizados, basicamente, de três formas em animais: uso terapêutico, profilático e como promotor de crescimento. Uma prática muito comum na pecuária comercial é o tratamento de todo o rebanho com antibióticos, quando sintomas clínicos aparecem em alguns animais do grupo (Wegener<sup>a</sup>, 2003). Além disso, em muitos sistemas de produção, o tratamento dos animais é realizado antes do

aparecimento dos sintomas clínicos como, por exemplo, durante o desaleitamento, movimentação de animais, mistura de animais de diferentes ninhadas ou outros fatores, que predisõem ao aparecimento de doenças (Wegener<sup>a</sup>, 2003). Como promotores de crescimento, os antibióticos podem ser administrados continuamente na alimentação animal, para promover o crescimento, aumentar a eficiência da alimentação e diminuir o desperdício na produção (van den Boggaard & Stobberingh, 2000). Estes aditivos alimentares constituem uma forma de o produtor alterar as populações microbianas do rúmen e têm sido utilizados em larga escala em todo o mundo, sendo administrados em concentrações subterapêuticas.

Após a introdução de antibióticos na terapêutica veterinária, assim como na humana, ocorreu um aumento na frequência de bactérias patogênicas resistentes aos antibióticos e de bactérias da microbiota fecal (van den Boggaard & Stobberingh, 2000). A maioria das enterobactérias, dos estafilococos e *Pasteurella* spp. possuem maior incidência de resistência aos antibióticos do que outras bactérias como *Clostridium* spp. e *Streptococcus*, que ainda, em sua maioria, são susceptíveis à penicilina G (van den Boggaard & Stobberingh, 2000). As informações disponíveis na literatura sobre a resistência de bactérias a promotores de crescimento são muito limitadas. A principal justificativa para não se realizar testes de susceptibilidade aos promotores de crescimento é o fato de estas substâncias não serem utilizadas na medicina humana (van den Boggaard & Stobberingh, 2000).

Bactérias de origem intestinal podem contaminar produtos de origem animal, durante o abate e processamento (Russell & Rychlik, 2001). Além disso, bactérias resistentes a antibióticos também podem ser disseminadas dos animais para o ambiente (Wegener<sup>a</sup>, 2003). Foram demonstradas a transmissão direta de enterococos entre animais e trabalhadores rurais, assim como a transmissão de bactérias resistentes de alimentos para o homem, resultando em pessoas saudáveis colonizadas por microrganismos carregando genes que conferem resistência a antibióticos (van den Boggaard & Stobberingh, 2000; Wegener<sup>a</sup> 2003).

Jensen et al. (1998) demonstraram que *Enterococcus faecium* resistentes a estreptograminas, isolados de um fazendeiro e de animais da mesma fazenda, apresentavam perfil idêntico, quanto avaliado por eletroforese de campo pulsado, sugerindo que a transferência desta resistência possa ter ocorrido entre os animais e o homem.

A incidência de genes, que conferem resistência a antibióticos, está aumentando em bactérias isoladas do homem, de animais e de vários reservatórios no ambiente (Morris Jr. et al., 1999). Em vista da utilização dos antibióticos e seleção de linhagens resistentes, o uso racional de antibiótico na medicina e na agricultura é uma medida urgente (van den Bogaard & Stobberingh, 2000). Van den Bogaard et al. (1996) sugeriram a suspensão dos promotores de crescimento e afirmaram que o uso de antibióticos, em veterinária, pode ser diminuído por meio do melhoramento dos métodos de manejo animal, introdução de programas de vacinação e a elaboração de uma legislação, que regule o uso dos antibióticos na veterinária. Burch (1996) ainda coloca, como uma alternativa o desenvolvimento de antibióticos para uso exclusivo na medicina veterinária, que não pertençam às classes dos utilizados na medicina humana. Os antibióticos classificados como ionóforos representam promotores de crescimento, que nunca foram utilizados em terapêutica humana. No entanto, os ionóforos estão incluídos entre os promotores de crescimento a serem banidos pela Comunidade Européia. (Wegener<sup>b</sup> 2003).

O perfil de resistência de bactérias Gram-negativas aos antibióticos varia na população humana dos centros urbanos e rurais (Houweling & Gainer, 1978). Entretanto, o percentual de isolados resistentes foi maior em pessoas no ambiente rural que estavam em contato direto com animais cuja alimentação continha antibióticos. A pesquisa com bactérias resistentes a tetraciclina, conduzida por Houweling e Gainer (1978), mostrou que a frequência de resistência de coliformes pode variar de 37 % a 100 %, dependendo da origem dos isolados.

Investigações realizadas com isolados de enterococos de fezes de animais e de alimentos de origem animal, realizadas em vários países, confirmaram a associação entre antibióticos usados como promotores de crescimento e altos níveis de resistência em enterococos a antibióticos de uso humano (Wegener<sup>a</sup>, 2003).

O Reino Unido foi o primeiro país a responder à ameaça de resistência aos antibióticos, ao incluir os antibióticos, utilizados em alimentação animal, como possíveis riscos à saúde pública (van den Bogaard & Stobberingh, 1996). No final da década de 60, na Inglaterra, o “Comitê Swann” recomendou que antibióticos para uso humano deveriam ser proibidos de serem utilizados como promotores de crescimento (Solomons, 1978). O banimento do uso dos antibióticos de uso humano como promotores de crescimento deveria ser suficiente para impedir o surgimento de bactérias patogênicas, de origem animal, resistentes aos antibióticos (van den Bogaard &

Stobberingh, 1996). Devido esta proibição, produtores de animais passaram a utilizar, como promotores de crescimento, outras moléculas com atividade microbiana que não eram adequadas ou promissoras para serem utilizadas na terapêutica humana (van van den Bogaard & Stobberingh, 1996).

Desde a década de 90, a indústria farmacêutica tem tido dificuldade em desenvolver novas drogas para combater a multirresistência. Desta forma, moléculas que haviam sido rejeitadas, *a priori*, começaram a ser reavaliadas e modificadas para serem utilizadas em terapêutica humana. Algumas dessas moléculas, reavaliadas e liberadas para uso em humanos, eram similares a alguns dos promotores de crescimento utilizados. Um exemplo clássico desta situação foi o lançamento da combinação dalfopristina (estreptogramina A) e quinupristina (estreptogramina B) para tratamento de infecções causadas por cocos Gram-positivos multirresistentes (van den Bogaard & Stobberingh, 1996). Estas moléculas são pristinamicinas relacionadas com virginamicina A e virginamicina B, as quais foram usadas em grande escala na Europa por vários anos como promotores de crescimento (Jensen et al., 1998).

A avoparcina é um promotor de crescimento com estrutura muito próxima ao antibiótico de uso humano, vancomicina. A avoparcina foi utilizada por muitos anos, na Europa. *Enterococcus* resistentes à vancomicina foram isolados de pessoas saudáveis e animais de fazendas, em diversos países da Comunidade Européia. Na maioria das vezes, essa resistência era mediada pelo gene *vanA* (Bruinsma et al., 2002). Nos Estados Unidos, *Enterococcus* resistentes à vancomicina não foram encontrados em animais, pois, ao contrário da Europa, a avoparcina nunca foi utilizada como promotor de crescimento em animais naquele país. Bruinsma et al. (2002) estudaram a homogeneidade genética de isolados de enterococcus resistentes e sensíveis à vancomicina. Os resultados, obtidos por meio da técnica de polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (AFLP), mostraram que enterococcus resistentes isolados de suínos agruparam com os *Enterococcus* resistentes isolados de humanos, enquanto os isolados sensíveis de ambas as origens agruparam-se de forma mais heterogênea. Os isolados resistentes de galinhas agruparam de forma diferente dos de origem humana, indicando que os *Enterococcus* resistentes à vancomicina de suínos constituem uma fonte mais importante de disseminação de resistência para o homem (Bruinsma et al., 2002).

Casewell et al. (2003) alegaram que o banimento de promotores de crescimento na Europa, apesar de ter promovido a diminuição de *Enterococcus* resistentes à

vancomicina, isolados de animais, não afetou a prevalência dos isolados resistentes em infecções humanas. Além disso, a prevalência de *Enterococcus* resistentes em infecções humanas, nos Estados Unidos, também tem aumentado, apesar de a avoparcina nunca ter sido usada como promotor de crescimento naquele país. Casewell et al. (2003) também defendem que a proibição dos promotores de crescimento tem, como custo, a deterioração do bem-estar animal, levando a perdas na produção e ao aumento do uso de antibióticos para fins terapêuticos, a fim de combater as infecções emergentes, advindas do banimento dos promotores de crescimento. Apesar dessas argumentações a favor do uso de promotores de crescimento, a União Européia aprovou o banimento de todos os promotores de crescimento, utilizados na produção animal pelos países membros, a partir do ano de 2006 (Wegener<sup>b</sup>, 2003).

Atualmente, a legislação brasileira autoriza o uso dos seguintes promotores de crescimento em bovinos: espiramicina, flavomicina, lasalocida, monensina e sulfato de colistina. O uso dos promotores virginamicina, avoparcina, cloranfenicol, penicilinas, sulfonamidas sistêmicas e tetraciclina foi banido em todo o território nacional (Brasil, 2002). Recentemente, o uso do Olaquinox também foi proibido (Brasil, 2004).

A avaliação dos mecanismos de transferência de genes, que conferem resistência aos antibióticos, tem demonstrado que tais genes podem ser encontrados em plasmídeos, transposons e integrons (Flint & Stewart, 1987; Flint et al., 1987; Flint, 1997; Nógrády et al., 2005). Ainda se conhece muito pouco as funções dos plasmídeos isolados de bactérias do rúmen. Foi demonstrada a transferência de resistência à tetraciclina da linhagem *Bacteroides rumenicola* 223/M2/7, isolada de rúmen de ovelha, para a linhagem F101 de *Bacteroides rumenicola* resistente à rifampicina, isolada de rúmen de bovino (Flint et al., 1987; Flint et al., 1988). A aquisição de resistência à tetraciclina, pela célula bacteriana receptora, ocorreu devido à transferência do plasmídeo pRRI4 de aproximadamente 19,5 kb. Além deste plasmídeo, a espécie *Prevotella (Bacteroides) rumenicola* 223/M2/7 também possui dois outros plasmídeos menores, cujas funções não são conhecidas. Estes dois plasmídeos de 7,0 kb e 3,4 kb foram sequenciados por Mercer et al. (2001).

Outros plasmídeos cujas funções são desconhecidas foram isolados de bactérias do rúmen. Em *Selenomonas ruminantium*, foram isolados os plasmídeos pSR1 (Martin & Dean, 1989) e pSRD191, bem como outros cinco plasmídeos da linhagem 19 (Sprincova e et al., 2004). De *Butyrivibrio fibrisolvens*, foram isolados os plasmídeos pRJF1 (Hefford et al., 1993), pRJF2 (Kobayashi et al., 1995) e pOM1 (Hefford et al.,

1997). Os plasmídeos pRAM4 (Ogata et al., 1996), pBAW301 (May et al., 1996) e pAR67 (Ohara et al., 1998) foram isolados de *Prevotella ruminicola*, de *Ruminococcus flavefaciens* e de *Ruminococcus albus* AR67, respectivamente.

Linhagens de *Escherichia coli* resistentes à tetraciclina foram isoladas do rúmen de ovelhas por meio da técnica dos tubos rolados de Hungate, usando-se o meio M2 adicionado de 50 µg/mL de tetraciclina (Flint et al., 1987). Entre as bactérias isoladas, foram identificados dois grupos de bactérias resistentes. As linhagens do grupo A apresentaram resistência à ampicilina, à tetraciclina e à estreptomicina, sendo também capazes de transferir, por conjugação, os fatores de resistência para bactérias sensíveis. O grupo B apresentou resistência à tetraciclina e à estreptomicina, sendo que os fatores de resistência não foram transmitidos às bactérias sensíveis. Os dois grupos foram submetidos à extração de DNA plasmidial e os tamanhos aproximados dos plasmídeos foram determinados. Nas bactérias, que foram capazes de transferir os genes de resistência, foram encontrados dois plasmídeos, sendo um de aproximadamente 80 Kb e outro de aproximadamente 45 Kb. Os autores constataram que as bactérias sensíveis, que se tornaram resistentes, adquiriram esses plasmídeos após o evento de conjugação.

Vários genes de resistência à tetraciclina são transmissíveis, estando presentes em plasmídeos ou em outros elementos cromossômicos móveis (Melville et al. 2004). A transferência de um plasmídeo que carrega resistência à tetraciclina (Tc<sup>R</sup>) entre *Prevotella* sp. isolada do rúmen e *Bacteroides* sp., que coloniza o intestino humano, foi demonstrada *in vitro*, sendo que determinantes de resistência, relacionados, foram encontrados em isolados naturais de ambos os grupos (Nikolich et al., 1994). Foi demonstrado que a resistência de enterobactérias à ampicilina, as quais foram isoladas do rúmen de ovelhas, era devido à presença do plasmídeo mobilizável pRAO7. Este plasmídeo contém o gene, que confere resistência à ampicilina *tem1* (Malík et al., 2004).

Foi relatada a aquisição de resistência à tetraciclina em *Butyrivibrio fibrisolvens*, em decorrência da transferência do transposon TnB1230 (Scott et al., 1997). O seqüenciamento deste transposon revelou que o gene *tetW* é o responsável pela resistência ao antibiótico (Melville et al., 2004). A identidade de seqüência entre as regiões internas do gene de *tetQ* de isolados de *Bacteroides* spp. de humanos e de isolados de *Prevotella ruminicola* de animais é uma evidência direta de que eventos de transferência horizontal de genes podem ocorrer entre microrganismos da microbiota

residente humana e de animais usados para a produção de alimentos (Nikolich et al., 1994).

Hespell e Whitehead (1991) demonstraram *in vitro* que o transposon Tn916 de *Enterococcus faecalis* e seu derivado Tn916ΔE podem ser transferidos para linhagens de *Butyrivibrio fibrisolvens*. Entretanto, não foi possível demonstrar a re-transferência deste transposon, a partir de *B. fibrisolvens* que receberam o Tn916 ou o Tn916ΔE para outras bactérias, que não os continham. O rúmen e o intestino de animais monogástricos contêm uma densa população microbiana, geralmente imobilizadas em biofilmes. Scott (2002) analisou o papel de transposons conjugativos na propagação de resistência a antibióticos e constatou que as condições no trato gastrointestinal favorecem a transferência genética intra e interespecífica. Resultados de experimentos *in vitro* demonstraram a transferência de diversos transposons conjugativos entre diferentes espécies de *Bacteroides* do rúmen e do homem, ilustrando o alto potencial para transferência genética entre espécies bacterianas. Mesmo que a transferência direta não ocorra entre duas espécies bacterianas, é possível que um hospedeiro intermediário esteja envolvido (Scott, 2002).

Dados genéticos e moleculares são essenciais à compreensão do modo como a resistência está sendo transmitida entre os microrganismos (Sebald, 1994). Entretanto, as informações genéticas disponíveis limitam-se a poucos gêneros bacterianos e pequeno número de antibióticos. Além disso, os dados disponíveis não cobrem todos os mecanismos de resistência aos antibióticos conhecidos (Sebald, 1994).

As inerentes limitações associadas aos métodos de cultivo de microrganismos em laboratório, para caracterização das comunidades microbianas, são amplamente reconhecidas. A avaliação de alguns conceitos fundamentais de ecologia, como a diversidade da comunidade, sucessão, redundância ou estabilidade, não é possível por meio de técnicas dependentes de cultivo em laboratório (Franklin et al., 1999). Métodos moleculares, que não dependem do cultivo de microrganismos, são ferramentas essenciais à compreensão da diversidade microbiana em estudos de ecologia (Yu & Morrison, 2004). A aplicação de técnicas moleculares tem mostrado que a diversidade microbiana do rúmen é bem maior do que se pensava (Russell & Rychlik, 2001).

Várias técnicas têm sido utilizadas para estudo de diversidade em bactérias. Entre estas, a técnica de RAPD (polimorfismo de DNA amplificado ao acaso) tem se destacado devido sua rapidez e simplicidade, bem como ao fato que os oligonucleotídeos iniciadores utilizados não são específicos para organismos, grupos de

organismos ou genes (Franklin et al., 1999). Na técnica de RAPD, são empregados oligonucleotídeos curtos de seqüências arbitrárias para amplificar porções aleatórias da amostra de DNA pela reação da polimerase em cadeia (PCR). Estes oligonucleotídeos curtos são capazes de se anelar em vários locais, ao longo do DNA-alvo. Assim, um fragmento de DNA é amplificado, quando dois destes oligonucleotídeos anelam-se perto o suficiente e na orientação apropriada em relação um ao outro. Desta forma, indivíduos que possuem seqüências genômicas diferentes produzem um perfil de bandas diferentes.

A técnica de RAPD foi proposta como uma alternativa rápida e de baixo custo, em comparação com outras técnicas existentes, na diferenciação de linhagens de *Clostridium perfringens* para fins de estudos epidemiológicos (Leflon-Guibout et al., 1997). A diferenciação das diferentes espécies do gênero *Prevotella* por meio das técnicas de identificação morfológicas e bioquímicas, nem sempre é suficiente. Paquet e Mouton (1997) demonstraram que a técnica de RAPD é capaz de distinguir entre *Prevotella intermedia* e *Prevotella nigrescens*. A técnica de PCR utilizando oligonucleotídeos específicos e oligonucleotídeos universais, seguido do seqüenciamento parcial da região do gene rDNA 16S, e a técnica de RAPD foram comparadas por Robertson et al. (1999). Os autores concluíram que, na diferenciação das espécies do gênero *Prevotella*, as três técnicas são satisfatórias.

Edwards et al. (2004) analisaram seqüências de três bibliotecas genômicas depositadas no GenBank, construídas a partir da amplificação, por PCR do rDNA 16S, de amostras do conteúdo ruminal. Neste estudo comparativo, os autores estimaram que apenas 11 % das unidades taxonômicas operacionais (OTU), detectadas por técnicas moleculares, representam microrganismos cultiváveis em laboratório. Deste total, a maioria das espécies bacterianas foram isoladas do rúmen, embora algumas seqüências representem microrganismos, que foram isolados de cavidade oral do homem ou do intestino de suíno e que, ainda, não foram descritas no ambiente ruminal. As seqüências disponíveis também indicam que os dois maiores grupos presentes no rúmen são: Cytophaga-Fibrobacter-Bacteroides (CFB) e bactérias Gram-positivas com baixo conteúdo de G + C. Edwards et al. (2004) estimaram que o rúmen contém 341 OTUs e que a espécie *Prevotella ruminicola* é a mais abundante (5% da população). Foi constatado, também, que várias seqüências representam novos grupos taxonômicos, embora apenas a informação do rDNA 16S seja insuficiente para determinar a posição dessas novas unidades taxonômicas operacionais.

No Brasil, não existe controle do uso de antibióticos em animais, conseqüentemente não existe um estudo para estabelecer o perfil de resistência aos antibióticos de bactérias comensais de bovinos. O conhecimento do perfil de resistência aos antibióticos de bactérias comensais isoladas de bovinos, que não faziam uso de medicamentos no período da coleta de amostras do líquido ruminal e das fezes, é importante para se estabelecer uma base de comparação para se avaliar os efeitos dos diferentes usos de antibióticos no perfil de resistência das bactérias comensais destes animais.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Animais e coleta de material**

Foram realizadas coletas do líquido ruminal e fezes de três bovinos da raça holandesa da unidade de ensino, pesquisa e extensão em gado de leite do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa. As coletas dos materiais de cada animal foram realizadas em datas diferentes.

Os animais foram separados e alimentados de acordo com seus níveis de produção de leite. Esses animais não faziam uso de medicamentos nem de promotores de crescimento no período da coleta. Por ocasião da coleta, anotou-se a alimentação, a idade e o estado fisiológico de cada bovino (Tabela 1).

O conteúdo ruminal foi coletado através da fístula do animal. O líquido foi obtido, a partir da filtração da digesta ruminal através de um pano e armazenado em uma garrafa térmica. O material fecal foi coletado diretamente do reto do animal, em saco plástico de coleta e acondicionado em caixa de isopor. Imediatamente após a coleta, as amostras de líquido ruminal e de fezes foram levadas para o Laboratório de Microbiologia de Anaeróbios, para serem processadas.

A amostra do líquido ruminal e das fezes foram homogeneizadas e alíquotas de 1 mL e de 1 g foram diluídas em 9 mL de solução salina anaeróbia estéril sob fluxo de CO<sub>2</sub>. Os frascos foram lacrados e levados para câmara de anaerobiose [Thermo Forma

1025 Anaerobic Chamber; mistura anaeróbia (5% de CO<sub>2</sub>; 10% de H<sub>2</sub>, balanço com N<sub>2</sub> - Air Products)] onde foram realizadas as diluições 10<sup>-2</sup> a 10<sup>-11</sup> em solução salina anaeróbia estéril.

Tabela 1 – Dados dos bovinos selecionados para coleta

Bovino	Data da coleta	Idade	Dieta		pH do líquido ruminal	Estado fisiológico
			Concentrado	Volumoso		
1	08/12/2005	8 anos	2 Kg de ração (24% proteína)	Silagem de milho <i>ad libitum</i>	6,73	Prenha
2	06/01/2006	8 anos	8 Kg de ração (24% proteína)	Silagem de milho <i>ad libitum</i>	6,42	Prenha
3	16/02/2006	8 anos	6 Kg de ração (24% proteína)	Silagem de milho <i>ad libitum</i>	6,16	Não prenha

## 3.2. Isolamento de bactérias do rúmen e das fezes

### 3.2.1. Isolamento de bactérias

Para o isolamento de bactérias do rúmen e das fezes, foram realizadas estrias compostas e simples da diluição 10<sup>-1</sup> e o plaqueamento de alíquotas de 0,1 mL das diluições 10<sup>-6</sup> a 10<sup>-11</sup> pela técnica de “spread plate”. Todos os procedimentos foram realizados em triplicata.

Para o isolamento, foi utilizado o meio de cultivo basal sólido estéril pré-reduzido [40 ml de solução salina A (7,3 g/L de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3H<sub>2</sub>O, 6,0 g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 40 mL de solução salina B (6,0 g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 12,0 g/L de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 12,0 g/L de NaCl, 2,5g g/L de MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 1,6 g/L de CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O), 0,5 g de extrato de levedura, 1,0 g de tripticase<sup>®</sup>, 0,6 g de hidrocloreto de cisteína, 1,0 mL de solução de resazurina, 50 mL de solução anaeróbia de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 8%] adicionado de líquido ruminal clarificado (330 mL/L) e quatro fontes de carbono (glicose 0,2 %, maltose 0,2 %, sacarose 0,2 %, xilose 0,2 %).

As amostras foram incubadas a 39 °C em câmara de anaerobiose, sendo o surgimento de colônias isoladas verificado por até 120 horas. Após 18, 24, 48, 72, 96 e 120 horas, colônias isoladas foram escolhidas, ao acaso e transferidas para tubos Eppendorf de 1,5 mL, contendo meio líquido basal pré-reduzido e adicionado de líquido ruminal

clarificado e quatro fontes de carbono. Cada isolado foi numerado de acordo com a ordem do isolamento.

A partir da segunda coleta, em adição ao meio anterior, foi utilizado o meio basal adicionado de líquido ruminal clarificado, quatro fontes de carbono, cristal violeta (0,01 g/L) e sais biliares (1,5 g/L). Os dois últimos componentes foram adicionados, a fim de impedir o crescimento de bactérias Gram-positivas, promovendo, assim, o isolamento de bactérias Gram-negativas. As colônias isoladas nessas placas foram processadas da mesma maneira que as demais. Tomou-se essa decisão porque, no primeiro isolamento, só foram isoladas bactérias Gram-positivas.

### **3.2.2. Verificação da pureza dos isolados**

As colônias isoladas foram cultivadas em tubos Eppendorf, contendo o meio de cultivo basal por 48 hs a 39 °C. Após a incubação, foi realizada a coloração de Gram para determinar a forma e o Gram de cada isolado.

Nos casos em que a coloração de Gram indicou a presença de mais de um tipo bacteriano, foram realizadas estrias em placas de Petri, contendo o meio de cultivo basal para a purificação das culturas. Após o crescimento de colônias isoladas, foi realizada novamente a coloração de Gram. Quando foi confirmada a presença de bactérias diferentes, um dos isolados foi mantido com a identificação inicial enquanto o outro foi identificado com novo código.

### **3.2.3. Cultivo dos isolados em aerobiose e microaerofilia**

Após a verificação da pureza dos isolados, cada bactéria foi estriada em duas placas de Petri contendo meio de cultivo basal. A primeira placa foi incubada em condições aeróbias e a segunda foi incubada em condições de microaerofilia a 39 °C, durante um período de uma semana.

No crescimento em aerobiose, as placas foram depositadas em incubadora (B.O.D. MA 415 Marconi). Para incubação sob microaerofilia, as placas foram colocadas dentro de um dessecador contendo duas velas, que foram acesas antes de fechá-lo, sendo o dessecador também colocado dentro da B.O.D. (Harrigan & McCance, 1976).

### **3.2.4. Armazenamento e cultura-estoque dos isolados**

Transferiu-se 1 mL das culturas, mantidas em tubos Eppendorfs para tubos de ensaio contendo 5 mL de meio de cultivo basal líquido, adicionado de líquido ruminal clarificado e quatro fontes de carbono. Os microrganismos foram incubados durante 48 a 72 hs a 39 °C e 4 mL da cultura foram transferidos para frascos de penicilina (10 mL), contendo 3 mL de solução de glicerol anaeróbio estéril {10 mL de solução salina A [7,3 g/L de  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ , 6,0 g/L de  $KH_2PO_4$ ]; 10 mL de solução salina B [6,0 g/L de  $KH_2PO_4$ , 12,0 g/L de  $(NH_4)_2SO_4$ , 12,0 g/L de NaCl, 2,5 g/L de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 1,6 g/L de  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ]; 0,2 g de cisteína; 115 mL de glicerol; 115 mL de água destilada; e o pH foi ajustado para 6,5}, sendo os frascos congelados a -20 °C.

### **3.3. Avaliação da resistência dos isolados aos antibióticos**

Foi realizado o antibiograma de todos os isolados com os seguintes antibióticos: ácido nalidíxico\* (NAL), ampicilina (AMP), cloranfenicol (CHL), eritromicina (ERY), estreptomicina (STR), penicilina (PEN) e tetraciclina (TET). Empregou-se o método de Wadsworth (Diluição em Ágar), segundo recomendação do National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2004), com as seguintes modificações: em cada placa de Petri, foram inoculadas 44 bactérias, sendo a inoculação das culturas realizada com uma micropipeta multicanal calibrada para 1 µL. Apesar de o ácido nalidíxico, ser um antimicrobiano sintético e, portanto, um quimioterápico, será tratado como um antibiótico pertencente à classe das quinolonas, de acordo com sua classificação estrutural.

#### **3.3.1. Reativação das culturas**

As culturas foram descongeladas e cerca de 200 µL foram transferidos anaerobicamente para tubos de ensaio contendo 5 mL de meio de cultivo basal adicionado de líquido ruminal clarificado e quatro fontes de carbono. As culturas foram incubadas a 39 °C durante 24 a 48 hs em anaerobiose.

### **3.3.2. Padronização da densidade do inóculo**

Após a reativação das culturas, cada meio foi comparado com o tubo 0,5 da escala de *Mcfarland* [0,5 mL de BaCl<sub>2</sub> 0,048M (1,17% p/v BaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O) em 99,5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,18M (1% v/v)], segundo as recomendações (Andrews, 2001; NCCLS, 2004). Os meios mais densos foram diluídos com meio de cultivo basal estéril, até atingir a turbidez do tubo da escala 0,5 de *Mcfarland*.

Após a padronização dos inóculos, 20 µL de cultura foram transferidos para um poço de uma microplaca estéril, a fim de possibilitar o uso de uma micropipeta multicanal.

### **3.3.3. Inoculação dos isolados em meio sólido**

Para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do antibiótico de cada isolado, foi utilizado o meio de cultivo Agar Brucella suplementado com sangue, vitamina k e hemina (NCCLS 2004). Cada placa de Petri continha 10 mL do meio, adicionado de diferentes concentrações dos antibióticos a serem testados.

O antibiograma foi realizado em duas etapas. Na primeira etapa, cada antibiótico foi testado nas concentrações de 0,5 µg/mL, 4,0 µg/mL, 32 µg/mL, 256 µg/mL e 512 µg/mL. Na segunda etapa, levou-se em consideração a última concentração, em que ocorreu crescimento dos microrganismos, bem como a primeira diluição na qual não houve o crescimento para se determinar a CIM. Desta forma, foram testadas as concentrações de 1,0 µg/mL, 2,0 µg/mL, 4,0 µg/mL, 8,0 µg/mL, 16 µg/mL, 64 µg/mL e 128 µg/mL de acordo com cada isolado, sendo os resultados obtidos, para cada um dos antibióticos, na primeira etapa.

A inoculação das placas foi realizada, utilizando uma micropipeta multicanal (P10) calibrada para uma alíquota de 0,1 µL. Cada cultura foi inoculada na superfície do meio e este foi incubado por até 72 hs. Como controle, foram utilizadas placas, contendo o meio de cultivo sem a presença de antibiótico. Foram considerados positivos, para cada concentração dos diferentes antibióticos, os isolados que apresentavam crescimento semelhante ao do controle.

Para determinar a resistência ou sensibilidade dos isolados, foram utilizadas as referências encontradas na literatura para os antibióticos AMP, CHL ERY, NAL, PEN, STR e TET (NCCLS, 2004; Andrews, 2001; Piriz et al., 1992; MacGowan & Wise,

2001). Para o antibiótico STR, foi estabelecido que os isolados com uma CIM maior ou igual a 512 µg/mL são resistentes.

Tabela 2 - Parâmetros para determinação da resistência ou sensibilidade aos antimicrobianos testados.

Antibiótico	Sensível (µg/mL)	Intermediário (µg/mL)	Resistente (µg/mL)	Referência
NAL	≤ 16	—	≥ 32	Piriz et al., 2001
AMP	≤ 0,5	1,0	≥ 2,0	NCCLS, 2004
CHL	≤ 8,0	16,0	≥ 32,0	NCCLS, 2004
ERY	≤ 0,5	—	≥ 1,0	MacGowan e Wise, 2001
STR	≤ 256,0	—	≥ 512,0	—
PEN	≤ 0,5	1,0	≥ 2,0	NCCLS, 2004
TET	≤ 4	8,0	≥ 16,0	NCCLS, 2004

NAL = ácido nalidíxico; AMP = ampicilina; CHL = cloranfenicol; ERY = eritromicina; STR = estreptomicina; PEN = penicilina; TET = tetraciclina. R indica isolados resistentes à concentração de 512,0 µg/mL.

### 3.4. Extração de DNA total dos isolados resistentes a antibióticos

Com o objetivo de caracterizar os isolados quanto à diversidade genética, realizou-se a extração de DNA total de 57 isolados bacterianos. Destes, 29 pertenciam aos isolados obtidos do líquido ruminal, enquanto os outros 28 isolados foram obtidos das fezes.

Os isolados do rúmen e das fezes foram agrupados, segundo o perfil de resistência aos sete antibióticos, a forma e a coloração de Gram.

Os isolados foram retirados do estoque e inoculados em garrafas com tampas de borracha e lacres de alumínio, contendo 25 mL do meio líquido pré-reduzido e, então, incubados a 39° C por até 72 horas.

O DNA total dos isolados foi extraído, adotando-se o método descrito por Broudiscou et al. (1998) com algumas modificações.

Um volume de 13 mL de cultura de cada isolado foi centrifugado em tubos Falcon de 15 mL durante 10 minutos a 3446 g. O sedimento foi lavado duas vezes em 10 mL de solução salina estéril e centrifugado durante 10 minutos a 3446 g. O sedimento resultante foi ressuspensionado em 300 µL de tampão de lise (NaCl 0,1 M; Tris HCl 10 mM, pH 8 e EDTA 1 mM) e transferido para tubos Eppendorfs de 1,5 mL. Após esta etapa, foram adicionados 30 µL de lisozima (L6876 - Sigma) 50 mg/mL, seguindo-se incubação a 37 °C durante 1 hora. Em seguida, foram adicionados 160 µL de Dodecil

Sulfato de Sódio (SDS) 25 %. A mistura foi homogeneizada, incubada durante 30 minutos a -20 °C e, em seguida, durante 30 minutos a 37 °C. Foram adicionados 1/3 do volume da amostra de NaCl 5M e 1 volume de fenol tamponado, sendo as amostras incubadas em gelo durante 15 minutos e homogeneizadas a cada 2 minutos. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 11752 g por 15 minutos. A fase aquosa foi transferida para outro tubo Eppendorf adicionando-se 1 volume de fenol:clorofórmio. A mistura foi incubada em gelo por 15 minutos e homogeneizada a cada 2 minutos. As amostras foram centrifugadas a 11752 g durante 15 minutos, sendo a fase aquosa de cada amostra transferida para um tubo Eppendorf de 1,5 mL e adicionado 1 volume de clorofórmio. As amostras foram incubadas em gelo durante 15 minutos, homogeneizadas a cada 2 minutos e centrifugadas a 11752 g durante 15 minutos, sendo, posteriormente, recolhida a fase aquosa que foi transferida para um tubo Eppendorf. Em seguida, foi adicionado 1 volume de isopropanol, homogeneizando cuidadosamente as amostras, que, posteriormente, foram incubadas a -20 °C durante no mínimo 2 horas. As amostras foram centrifugadas durante 30 minutos a 11752 g, sendo o sobrenadante descartado e o sedimento lavado com etanol a 70 %, refrigerado por centrifugação durante 1 minuto a 11752 g. O sedimento foi seco e ressuspendido em 20 µL de água Milli-Q autoclavada e tratado durante 10 minutos com 5 µL de RNase, 50 mg mL<sup>-1</sup> (Promega) a 37 °C. As preparações foram avaliadas e quantificadas por eletroforese em gel de agarose a 0,8 %, utilizando, como referência, um padrão de DNA de quantidade conhecida. A imagem dos géis foi digitalizada no sistema de captura de imagens *Eagle EyeII* (Stratagene).

### **3.5. Diversidade genética dos isolados resistentes a antibióticos por meio de polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD)**

As reações de amplificação por RAPD foram realizadas em um volume total de 25 µL [2,5 µl de tampão IB (Phoneutria); 2,5 µL de oligonucleotídeo iniciador 4 mM; 1,6 µL de deoxiribonucleosídeos tri fosfatados [dNTP(s)] 10 mM (Sigma); 1 U de Taq polimerase (Phoneutria); aproximadamente 25 ng de DNA; 16,9 µL água Milli-Q ]. A reação de amplificação foi realizada em termociclador da MJ Research, Inc. modelo PTC 100, utilizando-se 40 ciclos com um passo de desnaturação inicial de 94 °C durante 15 segundos, 35 °C durante 30 segundos para anelamento, 72 °C durante 1 minuto e

uma etapa de extensão final de 72 °C durante 7 minutos. Foram utilizados 11 oligonucleotídeos iniciadores, fornecidos pela Operon Technologies® (Tabela 3).

Os produtos das reações de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5 %, contendo brometo de etídio (0,2 µg/mL). Utilizou-se como tampão TEB 1x (Trizma base 0,089 M, Ácido bórico 0,089 M e EDTA 2 mM pH 8,0), sendo a corrida realizada a 80 volts. As imagens dos géis foram digitalizadas no sistema de captura de imagens Eagle Eye II (Stratagene).

Tabela 3 - Oligonucleotídeos iniciadores, utilizados na análise por RAPD dos 60 isolados bacterianos

Oligonucleotídeos	Seqüência (5'→3')
OPAE 01	TGAGGGCCGT
OPH 05	AGTCGTCCC
OPD 08	GTGTGCCCCA
OPD 07	TTGGCACGGG
OPD12	CACCGTATCC
OPF 10	GGAAGCTTGG
OPD18	GAGAGCCAAC
OPM05	GGGAACGTGT
OPM20	AGGTCTGGG
OPJ 06	TCGTTCCGCA
OPJ 13	CCCACTACC

As análises das bandas amplificadas por RAPD foram realizadas,utilizando-se imagens dos perfis dos géis, obtidos na forma de arquivos digitais (padrão Tiff), com o auxílio do programa Gel Pro Analyser® 3.1 (Media Cybernetics Inc., Maryland-USA). Essas análises foram realizadas para o arquivo digital correspondente a cada gel. Dessa forma, e interativamente, as canaletas foram posicionadas e as bandas identificadas. Nos casos em que as bandas, detectadas pelo programa, não correspondiam àquelas detectadas visualmente, utilizou-se o recurso do programa para adição ou exclusão manual de bandas.

As matrizes quadradas de distância genética e os dendrogramas foram construídos, utilizando-se o programa GENES (Cruz, 1997). Para construção das matrizes utilizou-se o índice de Jaccard e análise de agrupamento hierárquico pelo método UPGMA.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Isolamento de bactérias do rúmen e das fezes de bovino

Foram isoladas 97 bactérias do rúmen (Tabela 4) e 87 bactérias das fezes (Tabela 5) de três bovinos. Após o isolamento, foi realizada a coloração de Gram para todos os isolados (Tabelas 4 e 5). Do rúmen, foram isolados 72,2 % (70) de cocos Gram-positivos, 6,2 % (6) de cocos Gram-negativos, 14,4 % (14) de bacilos Gram-positivos e 7,2 % (7) de bacilos Gram-negativos (Tabela 4). Das fezes, foram isolados 72,4 % (63) de cocos Gram-positivos, 6,9 % (6) de cocos Gram-negativos, 9,2 % (8) de bacilos Gram-positivos e 11,5 % (10) de bacilos Gram-negativos (Tabela 5).

A partir da segunda coleta, tentou-se enriquecer o isolamento de bactérias Gram-negativas, utilizando o meio de isolamento adicionado de cristal violeta e sais biliares. No entanto, houve a predominância de isolados cocos Gram-positivos

Dentre os isolados do rúmen, 57,7 % (56) das bactérias foram isoladas por meio método de “Spread Plate” das diluições  $10^{-7}$  a  $10^{-10}$  enquanto 42,3 % (41) dos isolados foram obtidos a partir de estrias simples ou compostas da diluição  $10^{-1}$ . Dentre as bactérias isoladas das fezes, 64,4 % (56) e 35,6 % (31) foram isoladas, respectivamente, pelo método de “Spread Plate” e de estria simples ou compostas. O método de “Spread Plate” favorece o isolamento das espécies, que estão presentes em maior número. Desta forma, espécies bacterianas presentes nas amostras em uma concentração menor que  $10^6$  UFC/mL não foram isoladas das placas das diluições  $10^{-7}$ . No entanto, o método de

estrias simples e compostas a partir da diluição  $10^{-1}$ , possibilita o isolamento das bactérias presentes.

Considerando os isolados do rúmen, 57,7 % (56) foram obtidos do animal 1; 13,4 % (13) foram obtidos do animal 2; e 28,9 % (28) foram obtidos do animal 3. Considerando os isolados das fezes e os animais, o percentual dos isolados dos animais 1, 2 e 3 respectivamente, são 62,1 % (54), 10,3 % (9) e 27,6 % (24). Um dos principais fatores, que podem alterar a população do rúmen, é a dieta. A dieta dos três animais era constituída do mesmo tipo de concentrado e silagem de milho (volumoso), porém a quantidade de concentrado foi diferente para cada animal. O volumoso ingerido pelos animais é rico em amido, o que favorece o aumento de bactérias amilolíticas. Desta forma, considerando a dieta dos animais e a predominância de isolados de cocos Gram-positivos, a grande maioria das bactérias isoladas devem ser amilolíticas e celulolíticas. As principais bactérias amilolíticas do rúmen são *Ruminobacter amylophilus*, *Streptococcus bovis* e *Succinomonas amyolytica* (Russell & Rychlik, 2001). Entre estas três espécies, *Streptococcus bovis* é um coco Gram-positivo. Além das bactérias amilolíticas, provavelmente, foram isoladas bactérias celulolíticas e outras bactérias capazes de utilizar outros substratos, devido a riqueza de nutrientes do meio de cultivo, utilizado no isolamento. As principais bactérias celulolíticas do rúmen são *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Butyrivibrio fibrisolvens* e *Fibrobacter succinogenes* (Russell & Rychlik, 2001). Destes dois gêneros, *Ruminococcus* é de coco Gram-positivo.

Do total de 97 isolados do rúmen, determinou-se que 71 % foram capazes de suportar a presença de oxigênio e que 29% são bactérias anaeróbias estritas. Dentre os 87 isolados das fezes, 72% suportaram a presença de oxigênio e 28% são anaeróbios estritos. O nível de tolerância ao oxigênio varia entre os isolados, visto que algumas bactérias foram capazes de crescer em aerobiose, enquanto outras, ao serem submetidas a uma breve exposição ao oxigênio, foram capazes de crescer em microaerofilia (dados não apresentados), mas não foram capazes de crescer em aerobiose. O grande número de microrganismos aerotolerantes pode ser justificado pelas condições intrínsecas da câmara de anaerobiose. O controle de anaerobiose da câmara foi realizado, usando indicadores químicos de anaerobiose (resazurina). O indicador de resazurina torna-se incolor em torno de - 45 mV, porém algumas espécies de bactérias anaeróbias estritas podem requerer potencial redox menor como, por exemplo, as bactérias metanogênicas que requerem potencial redox em torno de - 200. mV (Atlas & Bartha, 1998).

Tabela 4 - Caracterização e forma de plaqueamento dos isolados obtidos do rúmen dos bovinos 1, 2 e 3

Isolados	Forma	GRAM	Animal	Método de Plaqueamento	Isolados	Forma	GRAM	Animal	Método de Plaqueamento
R001	Cocos	+	1	Spread Plate	R051	Cocos	+	1	Spread Plate
R002	Cocos	+	1	Spread Plate	R052	Cocos	+	1	Spread Plate
R003	Cocos	+	1	Spread Plate	R053	Cocos	+	1	Spread Plate
R004	Cocos	+	1	Spread Plate	R054	Cocos	+	1	Spread Plate
R005	Cocos	+	1	Spread Plate	R055	Cocos	+	1	Spread Plate
R006	Cocos	+	1	Spread Plate	R056	Cocos	+	1	Spread Plate
R007	Cocos	+	1	Spread Plate	R057	Cocos	+	1	Spread Plate
R008	Cocos	+	1	Spread Plate	R059	Bacilos	-	2	Estria
R009	Cocos	+	1	Spread Plate	R066	Cocos	+	2	Estria
R010	Cocos	+	1	Spread Plate	R067	Bacilos	+	2	Estria
R011	Cocos	+	1	Spread Plate	R068	Bacilos	+	2	Estria
R012	Cocos	+	1	Spread Plate	R069	Bacilos	+	2	Estria
R013	Cocos	+	1	Spread Plate	R070	Bacilos	-	2	Estria
R014	Cocos	+	1	Spread Plate	R071	Cocos	+	2	Estria
R015	Cocos	+	1	Spread Plate	R072	Cocos	+	2	Estria
R016	Cocos	+	1	Spread Plate	R073	Cocos	+	2	Estria
R017	Cocos	+	1	Spread Plate	R076	Bacilos	+	2	Estria
R018	Cocos	+	1	Spread Plate	R077	Cocos	+	2	Estria
R019	Cocos	+	1	Spread Plate	R078	Bacilos	+	2	Estria
R020	Cocos	+	1	Spread Plate	R079	Cocos	+	2	Estria
R021	Cocos	+	1	Spread Plate	R080	Cocos	+	3	Estria
R022	Cocos	+	1	Spread Plate	R082	Cocos	-	3	Estria
R023	Cocos	+	1	Spread Plate	R085	Cocos	+	3	Estria
R024	Cocos	+	1	Spread Plate	R086	Bacilos	+	3	Estria
R025	Cocos	+	1	Spread Plate	R088	Cocos	+	3	Estria
R026	Cocos	+	1	Spread Plate	R089	Cocos	+	3	Estria
R027	Cocos	+	1	Spread Plate	R090	Bacilos	+	3	Estria
R028	Cocos	+	1	Spread Plate	R091	Cocos	+	3	Estria
R029	Cocos	+	1	Spread Plate	R092	Bacilos	+	3	Estria
R030	Cocos	+	1	Spread Plate	R094	Bacilos	+	3	Estria
R031	Cocos	+	1	Spread Plate	R095	Bacilos	+	3	Estria
R032	Cocos	+	1	Spread Plate	R096	Bacilos	+	3	Estria
R034	Cocos	+	1	Spread Plate	R097	Bacilos	+	3	Estria
R035	Cocos	+	1	Spread Plate	R099	Bacilos	-	3	Estria
R036	Cocos	+	1	Spread Plate	R100	Bacilos	-	3	Estria
R037	Cocos	+	1	Spread Plate	R104	Cocos	+	3	Estria
R038	Cocos	+	1	Spread Plate	R105	Cocos	+	3	Estria
R039	Cocos	+	1	Spread Plate	R110	Cocos	+	3	Estria
R040	Cocos	+	1	Spread Plate	R115	Bacilos	+	3	Estria
R041	Cocos	+	1	Spread Plate	R117	Bacilos	+	3	Estria
R042	Cocos	+	1	Spread Plate	R118	Cocos	-	3	Estria
R043	Cocos	+	1	Spread Plate	R120	Cocos	-	3	Estria
R044	Cocos	+	1	Spread Plate	R123	Bacilos	-	3	Estria
R045	Cocos	+	1	Spread Plate	R124	Cocos	-	3	Estria
R046	Cocos	+	1	Spread Plate	R126	Bacilos	-	3	Estria
R047	Cocos	+	1	Spread Plate	R127	Cocos	-	3	Estria
R048	Cocos	+	1	Spread Plate	R146	Cocos	-	3	Estria
R049	Cocos	+	1	Spread Plate	R152	Bacilos	-	3	Estria
R050	Cocos	+	1	Spread Plate					

Tabela 5 - Caracterização e forma de plaqueamento dos isolados obtidos das fezes dos bovinos 1, 2 e 3

Isolados	Forma	GRAM	Animal	Método de Plaqueamento	Isolados	Forma	GRAM	Animal	Método de Plaqueamento
F001	Cocos	+	1	Spread Plate	F045	Cocos	+	1	Spread Plate
F002	Cocos	+	1	Spread Plate	F046	Cocos	+	1	Spread Plate
F003	Cocos	+	1	Spread Plate	F047	Cocos	+	1	Spread Plate
F004	Cocos	+	1	Spread Plate	F048	Cocos	+	1	Spread Plate
F005	Cocos	+	1	Spread Plate	F049	Cocos	+	1	Spread Plate
F006	Cocos	+	1	Spread Plate	F050	Cocos	+	1	Spread Plate
F007	Cocos	+	1	Spread Plate	F051	Cocos	+	1	Spread Plate
F008	Cocos	+	1	Spread Plate	F052	Cocos	+	1	Spread Plate
F009	Cocos	+	1	Spread Plate	F053	Cocos	+	1	Spread Plate
F010	Cocos	+	1	Spread Plate	F054	Cocos	+	1	Spread Plate
F011	Cocos	+	1	Spread Plate	F055	Bacilos	-	2	Estria
F012	Cocos	+	1	Spread Plate	F056	Cocos	+	2	Estria
F013	Cocos	+	1	Spread Plate	F057	Bacilos	-	2	Estria
F014	Cocos	+	1	Spread Plate	F059	Bacilos	-	2	Estria
F015	Cocos	+	1	Spread Plate	F069	Cocos	-	2	Estria
F016	Cocos	+	1	Spread Plate	F072	Cocos	-	2	Estria
F017	Cocos	+	1	Spread Plate	F074	Bacilos	-	2	Estria
F018	Cocos	+	1	Spread Plate	F076	Bacilos	-	2	Estria
F019	Cocos	+	1	Spread Plate	F077	Bacilos	-	2	Estria
F020	Cocos	+	1	Spread Plate	F083	Bacilos	+	3	Estria
F021	Cocos	+	1	Spread Plate	F085	Cocos	+	3	Estria
F022	Cocos	+	1	Spread Plate	F091	Bacilos	-	3	Estria
F023	Cocos	+	1	Spread Plate	F092	Bacilos	+	3	Estria
F024	Cocos	+	1	Spread Plate	F093	Cocos	-	3	Estria
F025	Cocos	+	1	Spread Plate	F098	Cocos	-	3	Estria
F026	Cocos	+	1	Spread Plate	F103	Cocos	+	3	Estria
F027	Cocos	+	1	Spread Plate	F104	Cocos	+	3	Estria
F028	Cocos	+	1	Spread Plate	F107	Cocos	+	3	Estria
F029	Cocos	+	1	Spread Plate	F108	Bacilos	+	3	Estria
F030	Cocos	+	1	Spread Plate	F111	Cocos	+	3	Estria
F031	Cocos	+	1	Spread Plate	F114	Cocos	+	3	Estria
F032	Cocos	+	1	Spread Plate	F117	Bacilos	+	3	Estria
F033	Cocos	+	1	Spread Plate	F118	Bacilos	+	3	Estria
F034	Cocos	+	1	Spread Plate	F119	Bacilos	-	3	Estria
F035	Cocos	+	1	Spread Plate	F120	Bacilos	+	3	Estria
F036	Cocos	+	1	Spread Plate	F122	Bacilos	+	3	Estria
F037	Cocos	+	1	Spread Plate	F123	Cocos	-	3	Estria
F038	Cocos	+	1	Spread Plate	F124	Cocos	-	3	Estria
F039	Cocos	+	1	Spread Plate	F126	Bacilos	-	3	Estria
F040	Cocos	+	1	Spread Plate	F139	Bacilos	-	3	Estria
F041	Cocos	+	1	Spread Plate	F150	Cocos	+	3	Estria
F042	Cocos	+	1	Spread Plate	F157	Bacilos	+	3	Spread Plate
F043	Cocos	+	1	Spread Plate	F158	Cocos	+	3	Spread Plate
F044	Cocos	+	1	Spread Plate					

#### 4.2. Resistência dos isolados aos antibióticos.

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada para cada isolado, para os antibióticos ácido nalidíxico (NAL), ampicilina (AMP), cloranfenicol (CHL), eritromicina (ERY), estreptomicina (STR), penicilina (PEN) e tetraciclina (TET) (Tabelas 6 e 7). As maiores concentrações inibitórias mínimas, determinadas para os isolados do rúmen, foram: NAL > 512,0 µg/mL, AMP 64,0 µg/mL, CHL 32,0 µg/mL, ERY 64,0 µg/mL, STR > 512,0 µg/mL, PEN 512,0 µg/mL e TET 512,0 µg/mL. Para os isolados das fezes, a maior CIM determinada para cada antibiótico foi: NAL > 512,0 µg/mL, AMP 32,0 µg/mL, CHL 16,0 µg/mL, ERY 256,0 µg/mL, STR > 512,0 µg/mL, PEN 512,0 µg/mL e TET 64,0 µg/mL.

O menor valor de CIM, determinado dentre os isolados do rúmen e das fezes, para todos os antibióticos, foi de 0,5 µg/mL, com exceção do NAL, cujo menor valor de CIM foi de 32,0 µg/mL.

Com base nas referências (Tabela 2) encontradas na literatura, determinou-se a resistência ou sensibilidade de cada isolado bacteriano. Foram estabelecidos os percentuais dos isolados resistentes aos antibióticos testados (Tabela 8). Para o antibiótico CHL, os percentuais de isolados do rúmen e das fezes sensíveis e intermediários foram diferentes. A resistência a este antibiótico foi observada, somente, entre os isolados do rúmen. Os percentuais de isolados do rúmen e das fezes resistentes e sensíveis aos antibióticos PEN e ERY foram semelhantes. Todos os isolados mostraram-se resistentes ao NAL. Os percentuais de isolados resistentes, intermediários e sensíveis para o antibiótico TET dos isolados do rúmen e das fezes foram diferentes. Os percentuais de isolados do rúmen e das fezes sensíveis a AMP foram semelhantes, porém o percentual de isolados resistentes e intermediários foram diferentes entre os dois grupos de origem.

O antibiótico ácido nalidíxico é o precursor das quinolonas, sendo por isso o primeiro representante desta classe. Em geral, as quinolonas exibem excelente atividade *in vitro* contra membros da família Enterobacteriaceae, bacilos Gram-negativos fastidiosos e cocos Gram-negativos. Esses antibióticos também possuem atividade contra *Staphylococcus aureus* e outros estafilococos, mas são menos potentes contra estreptococos. Contra espécies anaeróbias, as quinolonas tendem a ser inativas (Wolfson & Hooper, 1989), o que justifica o fato de todos os isolados serem resistentes ao ácido nalidíxico.

Tabela 6 - Concentração inibitória mínima para os sete antibióticos testados dos 97 isolados do rúmen de bovino de leite

Isolado	Antibióticos (µg/mL)							Isolado	Antibióticos (µg/mL)						
	NAL	AMP	CHL	ERY	STR	PEN	TET		NAL	AMP	CHL	ERY	STR	PEN	TET
R001	R	2,0	8,0	0,5	16,0	128,0	64,0	R029	R	2,0	32,0	0,5	32,0	256,0	64,0
R002	R	2,0	8,0	0,5	32,0	128,0	64,0	R030	R	1,0	16,0	0,5	32,0	256,0	64,0
R003	R	2,0	8,0	0,5	32,0	128,0	64,0	R031	R	0,5	8,0	0,5	0,5	64,0	64,0
R004	R	2,0	8,0	0,5	32,0	128,0	64,0	R032	R	1,0	16,0	0,5	32,0	512,0	64,0
R005	R	1,0	8,0	0,5	8,0	64,0	64,0	R034	R	1,0	16,0	0,5	64,0	64,0	64,0
R006	R	1,0	8,0	0,5	8,0	128,0	64,0	R035	R	0,5	16,0	0,5	64,0	64,0	64,0
R007	R	2,0	8,0	0,5	32,0	128,0	64,0	R036	R	1,0	16,0	0,5	64,0	64,0	8,0
R008	R	2,0	8,0	0,5	16,0	128,0	64,0	R037	R	0,5	16,0	0,5	64,0	64,0	64,0
R009	R	2,0	8,0	0,5	16,0	128,0	64,0	R038	R	1,0	1,0	0,5	64,0	64,0	64,0
R010	R	2,0	8,0	0,5	32,0	256,0	64,0	R039	R	0,5	16,0	0,5	32,0	64,0	64,0
R011	R	2,0	8,0	0,5	32,0	256,0	64,0	R040	R	1,0	16,0	0,5	64,0	64,0	64,0
R012	R	2,0	8,0	0,5	32,0	256,0	64,0	R041	R	1,0	16,0	0,5	64,0	64,0	64,0
R013	R	2,0	8,0	0,5	32,0	256,0	64,0	R042	R	0,5	0,5	0,5	64,0	64,0	64,0
R014	R	1,0	8,0	0,5	8,0	128,0	64,0	R043	R	0,5	16,0	0,5	64,0	64,0	64,0
R015	R	2,0	8,0	0,5	16,0	128,0	64,0	R044	R	0,5	4,0	0,5	64,0	64,0	64,0
R016	R	2,0	8,0	0,5	16,0	128,0	64,0	R045	R	0,5	4,0	0,5	64,0	64,0	64,0
R017	R	2,0	8,0	0,5	16,0	256,0	64,0	R046	R	0,5	16,0	0,5	32,0	64,0	64,0
R018	R	2,0	8,0	0,5	32,0	256,0	64,0	R047	R	0,5	4,0	0,5	32,0	64,0	64,0
R019	R	2,0	8,0	0,5	32,0	256,0	64,0	R048	R	0,5	4,0	0,5	32,0	128,0	64,0
R020	R	2,0	8,0	0,5	32,0	256,0	64,0	R049	R	0,5	4,0	0,5	32,0	64,0	64,0
R021	R	2,0	8,0	0,5	32,0	128,0	64,0	R050	R	0,5	0,5	0,5	32,0	64,0	64,0
R022	R	2,0	4,0	0,5	8,0	128,0	64,0	R051	R	0,5	16,0	0,5	32,0	64,0	64,0
R023	R	2,0	8,0	0,5	16,0	128,0	64,0	R052	R	64,0	16,0	64,0	32,0	64,0	64,0
R024	R	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	R053	R	8,0	16,0	0,5	32,0	64,0	64,0
R025	R	2,0	16,0	0,5	32,0	128,0	64,0	R054	R	8,0	1,0	0,5	32,0	64,0	64,0
R026	R	2,0	32,0	0,5	32,0	256,0	64,0	R055	R	2,0	4,0	1,0	16,0	256,0	32,0
R027	R	2,0	32,0	0,5	16,0	512,0	64,0	R056	R	2,0	4,0	1,0	16,0	256,0	32,0
R028	R	2,0	16,0	0,5	16,0	512,0	64,0	R057	R	2,0	4,0	1,0	16,0	256,0	32,0

Tabela 6 (continuação)

Isolado	Antibióticos (µg/mL)							Isolado	Antibióticos (µg/mL)						
	NAL	AMP	CHL	ERY	STR	PEN	TET		NAL	AMP	CHL	ERY	STR	PEN	TET
R059	R	4,0	4,0	0,5	4,0	256,0	64,0	R092	256,0	16,0	1,0	0,5	R	32,0	64,0
R066	R	4,0	1,0	4,0	512,0	32,0	64,0	R094	256,0	1,0	0,5	0,5	R	64,0	4,0
R067	R	8,0	0,5	1,0	256,0	4,0	64,0	R095	R	1,0	4,0	64,0	256,0	64,0	64,0
R068	R	0,5	4,0	1,0	256,0	4,0	64,0	R096	64,0	8,0	0,5	0,5	32,0	32,0	4,0
R069	256,0	4,0	4,0	4,0	256,0	128,0	32,0	R097	256,0	4,0	1,0	4,0	256,0	256,0	64,0
R070	R	16,0	1,0	64,0	256,0	128,0	64,0	R099	256,0	4,0	4,0	0,5	32,0	32,0	64,0
R071	256,0	8,0	4,0	64,0	256,0	128,0	64,0	R100	256,0	4,0	2,0	0,5	R	256,0	32,0
R072	256,0	8,0	16,0	4,0	256,0	32,0	64,0	R104	R	4,0	8,0	1,0	256,0	64,0	8,0
R073	R	4,0	4,0	4,0	512,0	128,0	64,0	R105	256,0	0,5	1,0	0,5	8,0	32,0	8,0
R076	128,0	0,5	0,5	0,5	64,0	4,0	0,5	R110	R	16,0	8,0	1,0	256,0	512,0	512,0
R077	256,0	1,0	4,0	0,5	512,0	128,0	8,0	R115	64,0	1,0	4,0	0,5	0,5	128,0	4,0
R078	256,0	8,0	1,0	0,5	512,0	256,0	64,0	R117	64,0	1,0	1,0	0,5	8,0	8,0	0,5
R079	R	8,0	4,0	0,5	32,0	32,0	64,0	R118	64,0	1,0	4,0	0,5	8,0	32,0	4,0
R080	256,0	8,0	16,0	0,5	16,0	64,0	8,0	R120	64,0	4,0	8,0	0,5	128,0	128,0	4,0
R082	R	16,0	4,0	8,0	R	256,0	32,0	R123	64,0	0,5	8,0	64,0	8,0	32,0	4,0
R085	256,0	16,0	1,0	0,5	256,0	128,0	64,0	R124	64,0	1,0	8,0	0,5	8,0	32,0	4,0
R086	64,0	8,0	2,0	0,5	64,0	32,0	64,0	R126	64,0	4,0	1,0	0,5	8,0	32,0	4,0
R088	256,0	2,0	8,0	0,5	256,0	32,0	8,0	R127	64,0	16,0	8,0	0,5	32,0	128,0	4,0
R089	256,0	8,0	1,0	0,5	64,0	1,0	4,0	R146	64,0	0,5	1,0	8,0	64,0	32,0	4,0
R090	64,0	0,5	4,0	1,0	512,0	128,0	64,0	R152	32,0	0,5	4,0	1,0	0,5	4,0	4,0
R091	256,0	16,0	8,0	0,5	R	128,0	64,0								

NAL = ácido nalidixico; AMP = ampicilina; CHL = cloranfenicol; ERY = eritromicina; STR = estreptomicina; PEN = penicilina; TET = tetraciclina. R indica isolados resistentes a concentração de 512,0 µg/mL.

Tabela 7 - Concentração inibitória mínima para os sete antibióticos testados dos 87 isolados das fezes de bovino de leite

Isolado	Antibióticos (µg/mL)							Isolado	Antibióticos (µg/mL)						
	NAL	AMP	CHL	ERY	STR	PEN	TET		NAL	AMP	CHL	ERY	STR	PEN	TET
F001	R	4,0	8,0	0,5	32,0	64,0	8,0	F029	R	1,0	16,0	0,5	8,0	128,0	8,0
F002	R	4,0	8,0	0,5	32,0	64,0	8,0	F030	R	1,0	16,0	0,5	32,0	128,0	8,0
F003	R	4,0	8,0	0,5	32,0	64,0	8,0	F031	R	1,0	16,0	0,5	8,0	128,0	8,0
F004	R	4,0	8,0	0,5	32,0	64,0	8,0	F032	R	1,0	4,0	0,5	32,0	128,0	8,0
F005	R	1,0	8,0	0,5	4,0	64,0	8,0	F033	R	1,0	16,0	8,0	32,0	128,0	64,0
F006	R	4,0	8,0	0,5	8,0	64,0	8,0	F034	R	8,0	16,0	4,0	32,0	64,0	64,0
F007	R	4,0	16,0	0,5	8,0	64,0	8,0	F035	R	1,0	8,0	0,5	8,0	128,0	8,0
F008	R	4,0	16,0	0,5	32,0	64,0	8,0	F036	R	2,0	16,0	0,5	64,0	128,0	64,0
F009	R	4,0	16,0	0,5	32,0	64,0	8,0	F037	R	1,0	16,0	4,0	16,0	256,0	64,0
F010	R	0,5	16,0	0,5	32,0	64,0	8,0	F038	R	2,0	8,0	0,5	8,0	64,0	64,0
F011	R	4,0	16,0	0,5	32,0	32,0	8,0	F039	R	2,0	8,0	0,5	64,0	128,0	64,0
F012	R	1,0	8,0	0,5	32,0	64,0	8,0	F040	R	2,0	8,0	0,5	64,0	128,0	64,0
F013	R	1,0	8,0	0,5	32,0	64,0	8,0	F041	R	16,0	8,0	4,0	64,0	128,0	64,0
F014	R	4,0	8,0	0,5	32,0	64,0	8,0	F042	R	2,0	8,0	0,5	64,0	64,0	64,0
F015	R	4,0	8,0	0,5	8,0	64,0	8,0	F043	R	1,0	8,0	0,5	64,0	64,0	64,0
F016	R	1,0	16,0	0,5	32,0	64,0	8,0	F044	R	2,0	1,0	1,0	32,0	64,0	64,0
F017	R	1,0	8,0	0,5	32,0	4,0	8,0	F045	R	2,0	8,0	0,5	8,0	64,0	64,0
F018	R	2,0	4,0	0,5	32,0	64,0	8,0	F046	R	2,0	8,0	0,5	64,0	64,0	64,0
F019	R	2,0	8,0	0,5	32,0	64,0	8,0	F047	R	2,0	8,0	0,5	64,0	128,0	64,0
F020	R	2,0	16,0	0,5	32,0	128,0	8,0	F048	R	2,0	8,0	0,5	64,0	128,0	64,0
F021	R	2,0	16,0	0,5	8,0	128,0	8,0	F049	R	2,0	8,0	0,5	64,0	128,0	64,0
F022	R	1,0	16,0	0,5	8,0	128,0	8,0	F050	R	2,0	8,0	0,5	64,0	64,0	64,0
F023	R	1,0	16,0	0,5	8,0	128,0	8,0	F051	R	2,0	8,0	0,5	64,0	64,0	64,0
F024	R	1,0	16,0	0,5	32,0	128,0	8,0	F052	R	2,0	8,0	0,5	8,0	64,0	64,0
F025	R	1,0	16,0	0,5	32,0	64,0	8,0	F053	R	2,0	8,0	0,5	16,0	64,0	64,0
F026	R	2,0	16,0	0,5	32,0	128,0	8,0	F054	R	2,0	8,0	0,5	64,0	128,0	64,0
F027	R	2,0	16,0	0,5	32,0	128,0	8,0	F055	R	1,0	8,0	0,5	2,0	128,0	64,0
F028	R	2,0	16,0	0,5	32,0	128,0	8,0	F056	R	4,0	2,0	0,5	0,5	128,0	64,0

Tabela 7 (continuação)

Isolado	Antibióticos (µg/mL)							Isolado	Antibióticos (µg/mL)						
	NAL	AMP	CHL	ERY	STR	PEN	TET		NAL	AMP	CHL	ERY	STR	PEN	TET
F057	R	1,0	2,0	8,0	4,0	256,0	64,0	F108	256,0	0,5	1,0	0,5	64,0	8,0	8,0
F059	R	16,0	1,0	0,5	2,0	64,0	8,0	F111	R	2,0	8,0	4,0	R	128,0	8,0
F069	64,0	0,5	0,5	8,0	4,0	32,0	8,0	F114	R	1,0	8,0	4,0	R	128,0	8,0
F072	256,0	0,5	0,5	0,5	64,0	32,0	2,0	F117	256,0	0,5	1,0	0,5	256,0	64,0	8,0
F074	256,0	0,5	1,0	0,5	32,0	0,5	0,5	F118	256,0	0,5	1,0	0,5	64,0	64,0	8,0
F076	64,0	2,0	2,0	1,0	64,0	64,0	64,0	F119	64,0	0,5	1,0	0,5	64,0	128,0	16,0
F077	64,0	0,5	0,5	32,0	4,0	1,0	0,5	F120	256,0	0,5	1,0	0,5	64,0	64,0	8,0
F083	256,0	0,5	2,0	2,0	32,0	32,0	8,0	F122	256,0	0,5	1,0	0,5	256,0	64,0	8,0
F085	512,0	2,0	4,0	0,5	256,0	64,0	8,0	F123	64,0	0,5	1,0	0,5	64,0	64,0	8,0
F091	64,0	1,0	0,5	8,0	0,5	64,0	8,0	F124	64,0	0,5	4,0	0,5	128,0	64,0	8,0
F092	256,0	0,5	4,0	4,0	0,5	4,0	8,0	F126	64,0	0,5	4,0	0,5	32,0	32,0	8,0
F093	256,0	0,5	0,5	8,0	0,5	0,5	8,0	F139	256,0	0,5	1,0	0,5	64,0	4,0	8,0
F098	256,0	8,0	4,0	0,5	64,0	32,0	8,0	F150	256,0	0,5	8,0	64,0	64,0	4,0	8,0
F103	256,0	8,0	1,0	0,5	256,0	8,0	0,5	F157	32,0	32,0	8,0	256,0	64,0	512,0	8,0
F104	R	16,0	8,0	0,5	256,0	64,0	64,0	F158	32,0	32,0	8,0	256,0	64,0	512,0	16,0
F107	256,0	2,0	1,0	0,5	128,0	64,0	8,0								

NAL = ácido nalidixico; AMP = ampicilina; CHL = cloranfenicol; ERY = eritromicina; STR = estreptomicina; PEN = penicilina; TET = tetraciclina. R indica isolados resistentes a concentração de 512,0 µg/mL.

Tabela 8 - Percentual dos isolados do rúmen e das fezes que foram sensíveis, intermediários e resistentes para os antibióticos

Antibiótico	Rúmen			Fezes		
	S	I	R	S	I	R
NAL	0	—	100	0	—	100
AMP	22,68	17,53	59,79	21,84	24,14	54,02
CHL	78,35	18,56	3,09	74,71	25,29	0
ERY	78,35	—	21,65	79,31	—	20,69
STR	89,70	—	10,30	97,7	—	2,30
PEN	1,03	1,03	97,94	2,30	1,15	96,55
TET	15,46	6,19	78,35	4,60	63,22	32,18

NAL = ácido nalidíxico; AMP = ampicilina; CHL = cloranfenicol; ERY = eritromicina; STR = estreptomicina; PEN = penicilina; TET = tetraciclina. R indica isolados resistentes a concentração de 512,0 µg/mL.

A penicilina é um antibiótico com espectro de ação contra bactérias Gram-positivas, sendo ineficaz contra bactérias Gram-negativas (Tortora et al., 1998). No entanto, os resultados do antibiograma para os bacilos Gram-negativos mostram que os isolados F074 e F093 foram sensíveis à penicilina enquanto o isolado F077 foi intermediário à penicilina.

Mertz et al. (2005) determinaram o percentual de bactérias dos gêneros *Bacteroides* e *Prevotella*, resistentes aos antibióticos, em fezes de bovinos (gado de leite). Os percentuais de isolados resistentes aos antibióticos tetraciclina e ampicilina foram, respectivamente, 64,3 % e 63,5%. Verificou-se, neste estudo, que 54,02 % dos isolados das fezes eram resistentes à ampicilina e 32,18 % eram resistentes à tetraciclina.

Wang et. al. (1969) determinaram que 80% (12) bactérias isoladas do rúmen eram resistentes a STR. Foi observado que, apenas 10,30 % dos isolados do rúmen e 2,30 % dos isolados das fezes foram resistentes a STR.

O perfil dos isolados do rúmen e das fezes resistentes a antibióticos foi construído, a fim de possibilitar uma avaliação da resistência aos sete antibióticos testados (Figura 1). Comparando os perfis de isolados resistentes tem-se que: (i) os percentuais de isolados resistentes, obtidos do rúmen e das fezes, para os antibióticos NAL, ERY e PEN foram semelhantes; (iii) Os percentuais de isolados do rúmen resistentes aos antibióticos AMP, CHL, STR e TET foram maiores que os percentuais de isolados das fezes.

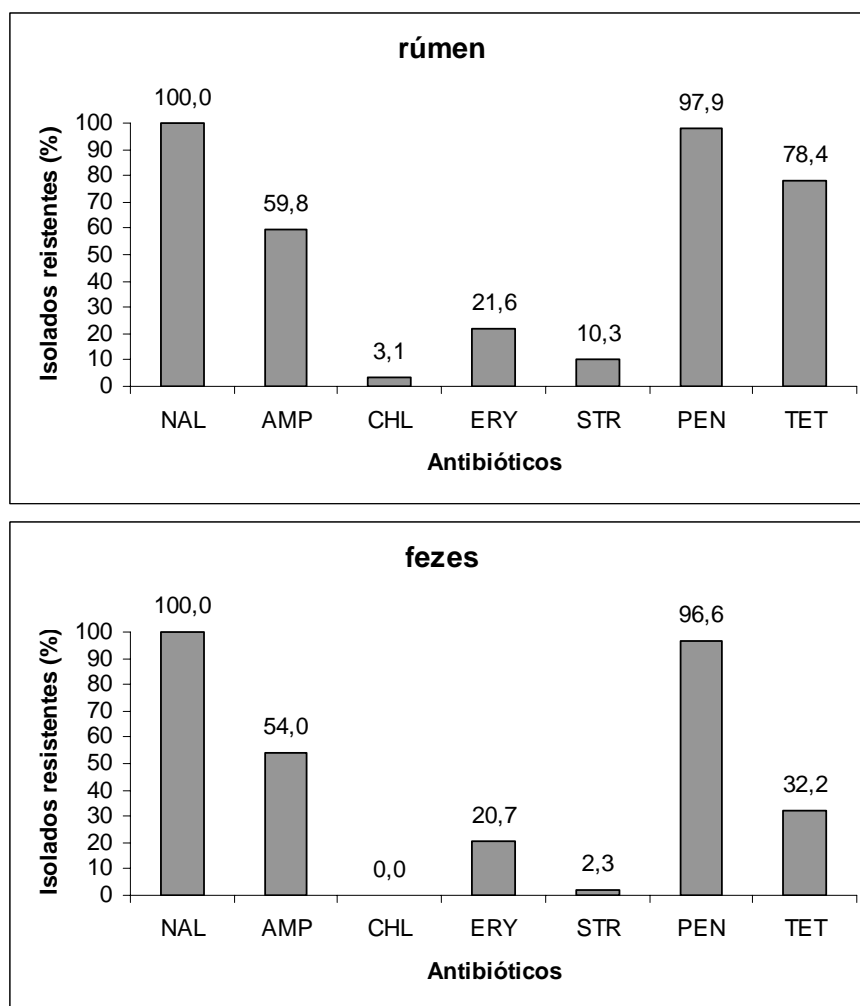


Figura 1. Perfil dos isolados resistentes aos antibióticos. NAL = ácido nalidíxico; AMP = ampicilina; CHL = cloranfenicol; ERY = eritromicina; STR = estreptomicina; PEN = penicilina; TET = tetraciclina.

Considerando a resistência de cada isolado a um antibiótico, como uma marca de resistência, foram construídos gráficos (Figura 2) para avaliar o percentual de isolados do rúmen e das fezes resistentes a vários antibióticos.

Tanto entre os isolados do rúmen como entre os isolados das fezes, o maior percentual de isolados possui três marcas de resistência. Entretanto, entre os isolados do rúmen, o segundo maior percentual de isolados apresenta quatro marcas de resistência, enquanto, entre os isolados das fezes, o segundo maior percentual apresenta duas marcas de resistência. O terceiro maior percentual de isolados, entre os isolados do rúmen, apresenta cinco marcas de resistência, enquanto, entre os isolados das fezes, o terceiro maior percentual apresenta quatro marcas de resistência.

Juntos, os dados de isolados resistentes a cada antibiótico e as marcas de resistência indicam uma provável relação entre a resistência dos isolados do rúmen e a

resistência dos isolados das fezes aos antibióticos. A possibilidade de relação de resistência entre os isolados do rúmen e das fezes é maior para os antibióticos NAL, ERY e PEN, uma vez que os percentuais de isolados resistentes a estes antibióticos, nos dois ambientes, apresentaram valores semelhantes. Houve predomínio de três marcas de resistência, tanto entre os isolados do rúmen quanto entre os isolados das fezes (Figura 2).

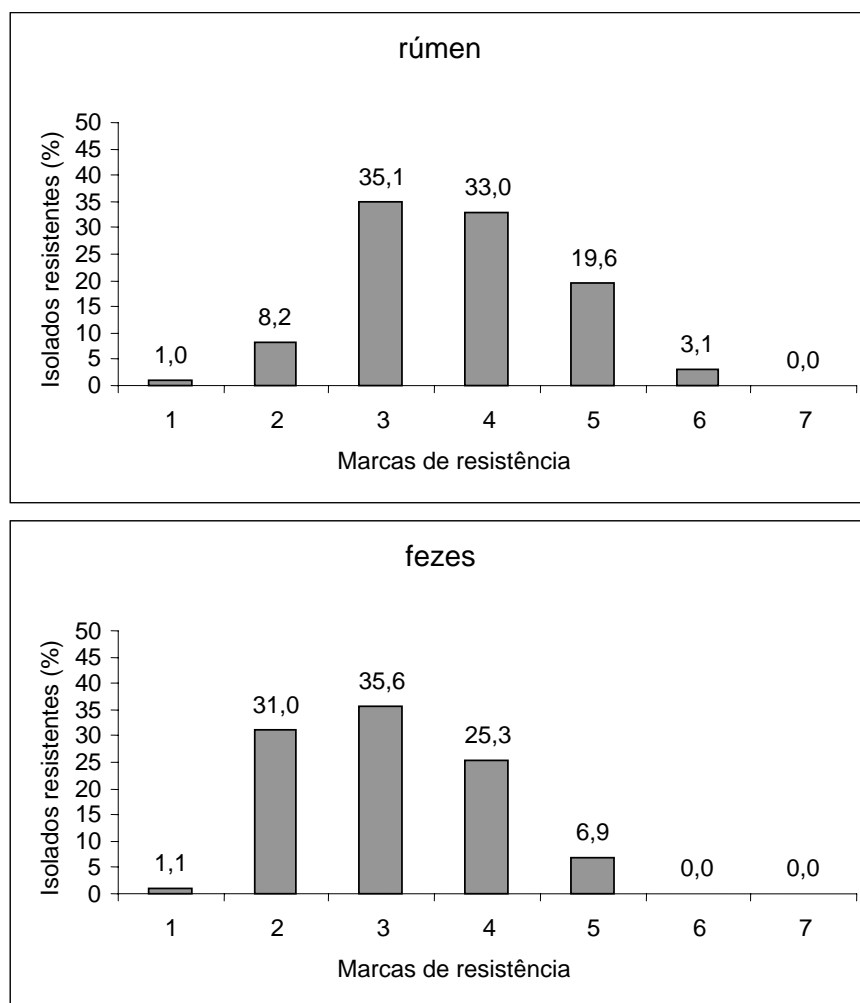


Figura 2. Percentual de isolados em função do número de marcas de resistência.

Para verificar se há mais semelhanças entre a resistência dos isolados do rúmen aqueles das fezes, foram construídos os gráficos de percentual de isolados e de marcas de resistência, separadamente, para as bactérias obtidas de cada animal (Figuras 3 e 4).

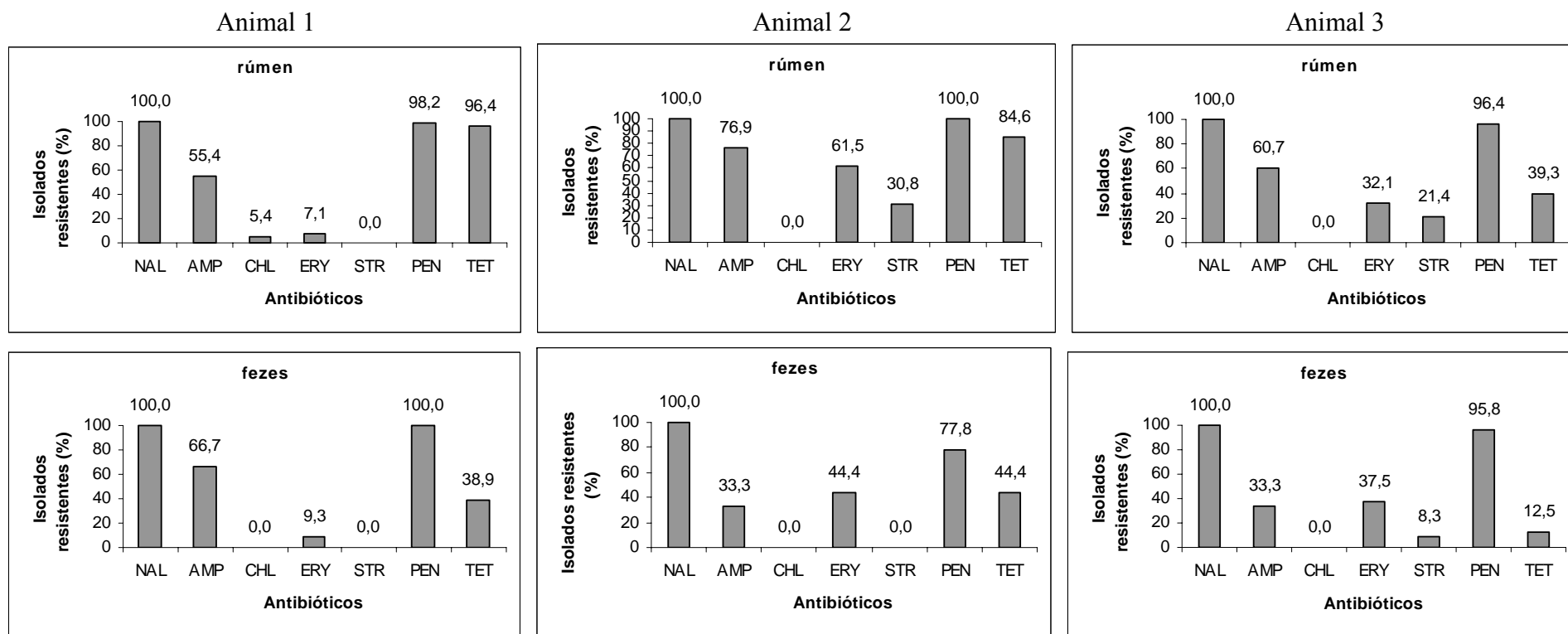


Figura 3. Perfil dos isolados quanto a resistência para os sete antibióticos. NAL = ácido nalidíxico; AMP = ampicilina; CHL = cloranfenicol; ERY = eritromicina; STR = estreptomicina; PEN = penicilina; TET = tetraciclina.

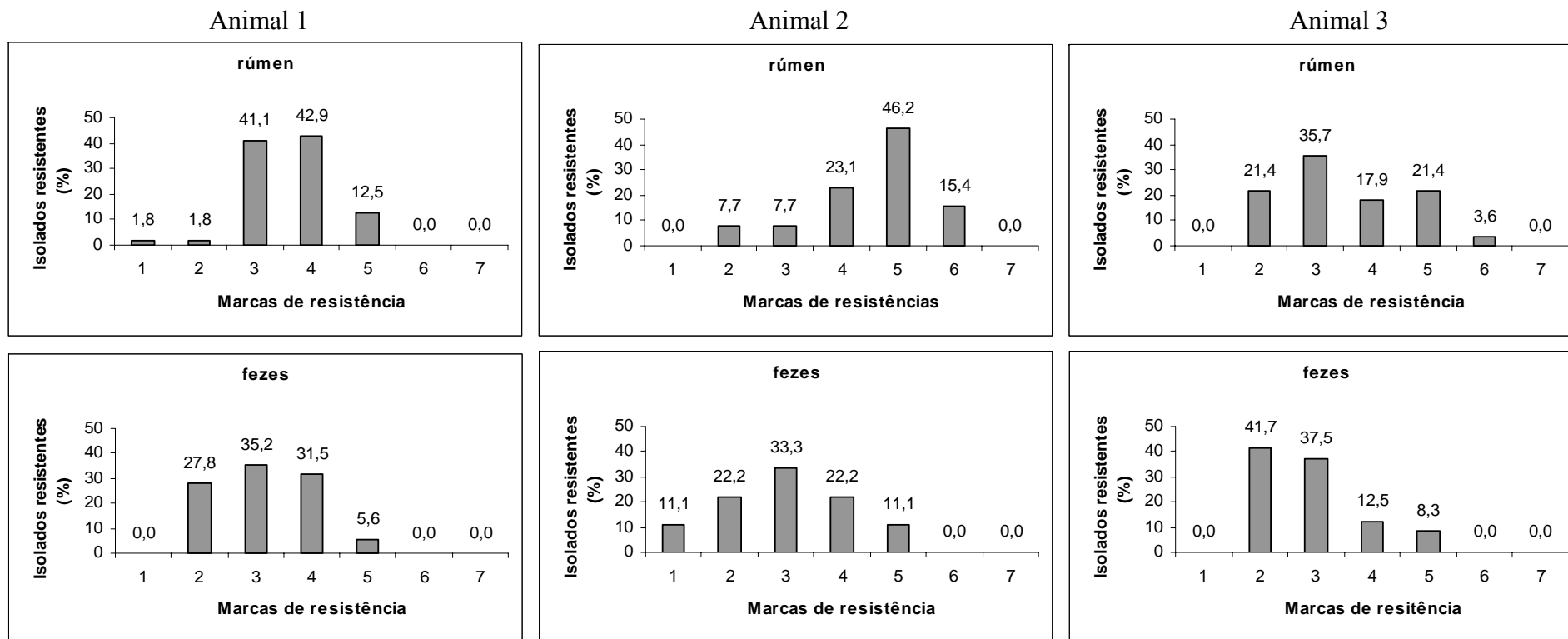


Figura 4. Percentual de isolados em função do número de marcas de resistência para cada animal.

Para o animal 1: (i) os percentuais de isolados do rúmen e das fezes resistentes aos antibióticos NAL, ERY e PEN foram semelhantes; (ii) os percentuais de isolados do rúmen resistentes aos antibióticos CHL e TET foram maiores que os percentuais dos isolados das fezes; e (iii) o percentual de isolados do rúmen resistentes ao antibiótico AMP foi menor que o percentual dos isolados das fezes. Nenhum dos isolados do animal 1 apresentou resistência a STR.

Para o animal 2: (i) os percentuais de isolados do rúmen e das fezes resistentes aos antibióticos CHL e NAL foram iguais; e (ii) os percentuais de isolados do rúmen resistentes aos antibióticos TET, AMP, ERY, STR e PEN foram maiores do que os percentuais dos isolados das fezes.

Para o animal 3: (i) os percentuais de isolados do rúmen e das fezes resistentes aos antibióticos CHL, NAL e PEN foram semelhantes; (ii) os percentuais de isolados do rúmen resistentes aos antibióticos AMP, STR e TET foram maiores que os percentuais dos isolados das fezes; e (iii) o percentual de isolados do rúmen resistentes ao antibiótico ERY foi menor que os percentuais dos isolados das fezes.

Quando o percentual de isolados do rúmen resistentes a antibióticos foram superiores ao percentual de isolados das fezes, ou quando os valores percentuais foram semelhantes, sugere-se uma relação entre o padrão de resistência dos isolados do rúmen e o padrão de resistência dos isolados das fezes. Os dados do percentual de isolados resistentes a cada um dos antibióticos, para o animal 1, sugerem uma relação da resistência para os antibióticos TET, PEN e AMP entre os isolados do rúmen e das fezes. Os dados para o animal 2 sugerem uma relação da resistência para os antibióticos TET, ERY, AMP e PEN entre os isolados do rúmen e das fezes. Os dados para o animal 3 sugerem uma relação da resistência para os antibióticos TET, ERY AMP, STR e PEN entre os isolados do rúmen e das fezes.

A análise de marcas de resistência dos isolados do rúmen e das fezes para cada animal (Figura 4) mostra que, entre os isolados do animal 1, o maior percentual de isolados do rúmen possui 4 marcas, enquanto, para as fezes, o maior percentual de isolados resistentes possui 3 marcas de resistência. Para o animal 2, o maior percentual de isolados do rúmen resistentes possui 5 marcas, enquanto, nas fezes, o maior percentual de isolados resistentes possui 3 marcas. Para o animal 3, o maior percentual de isolados do rúmen possui 3 marcas, enquanto, nas fezes, o maior percentual de isolados resistentes possui 2 marcas.

Com o objetivo de selecionar os isolados para o estudo de diversidade, os isolados do rúmen e das fezes resistentes a antibióticos foram agrupados, de acordo com as concentrações inibitórias mínimas para os sete antibióticos testados (Tabelas 9 e 10). Os bacilos isolados do rúmen não apresentaram valores de CIM iguais e por esta razão, não foram agrupados de acordo com as concentrações inibitórias mínimas para os sete antibióticos, mas, segundo a coloração de Gram.

Os cocos isolados do rúmen resistentes aos antibióticos formaram nove grupos. Entre estes, os grupos um e três continham apenas um isolado: o isolado do rúmen R082 apresentou resistência a seis antibióticos e não se agrupou com nenhum outro isolado; o isolado R100 apresentou CIM elevada para os antibióticos STR, PEN e TET e, por este motivo, não se agrupou com outros isolados. O grupo de isolados do rúmen resistentes a antibióticos com o maior número de microrganismos foi o grupo quatro, com sete microrganismos. Os grupos 10 e 11 dos isolados do rúmen foram compostos pelos bacilos Gram-negativos e pelos bacilos Gram-positivos, respectivamente.

O agrupamento dos isolados das fezes resultou 12 grupos. O grupo com maior número de isolados, segundo o perfil de resistência aos sete antibióticos, foi o grupo seis, com seis isolados. Os grupos 12 e 13, referentes aos bacilos isolados das fezes, continham apenas dois isolados cada um e apresentaram baixos valores de CIM para os antibióticos CHL, ERY e AMP.

Inicialmente, foram escolhidos dois representantes do grupo 10 e quatro representantes do grupo 11 para análise de diversidade. Entretanto, devido à dificuldade em obter preparações de DNA dos isolados do grupo 11, foram selecionados mais dois isolados do grupo 10.

Tabela 9 - Agrupamento dos isolados do rúmen segundo a forma e o perfil de resistência aos sete antibióticos e coloração de Gram

Grupo	Isolado*	NAL (µg/mL)	AMP (µg/mL)	CHL (µg/mL)	ERY (µg/mL)	STR (µg/mL)	PEN (µg/mL)	TET (µg/mL)	Forma	Gram
1	<b>R082</b>	R	16.0	4.0	8.0	R	256.0	32.0	Cocos	-
2	<b>R055</b>	R	2.0	4.0	1.0	16.0	256.0	32.0	Cocos	+
	R056	R	2.0	4.0	1.0	16.0	256.0	32.0	Cocos	+
	<b>R057</b>	R	2.0	4.0	1.0	16.0	256.0	32.0	Cocos	+
3	<b>R110</b>	R	16.0	8.0	1.0	256.0	512.0	512.0	Cocos	+
4	<b>R010</b>	R	2.0	8.0	0.5	32.0	256.0	64.0	Cocos	+
	R011	R	2.0	8.0	0.5	32.0	256.0	64.0	Cocos	+
	R012	R	2.0	8.0	0.5	32.0	256.0	64.0	Cocos	+
	<b>R013</b>	R	2.0	8.0	0.5	32.0	256.0	64.0	Cocos	+
	R018	R	2.0	8.0	0.5	32.0	256.0	64.0	Cocos	+
	<b>R019</b>	R	2.0	8.0	0.5	32.0	256.0	64.0	Cocos	+
	<b>R020</b>	R	2.0	8.0	0.5	32.0	256.0	64.0	Cocos	+
	5	<b>R002</b>	R	2.0	8.0	0.5	32.0	128.0	64.0	Cocos
R003		R	2.0	8.0	0.5	32.0	128.0	64.0	Cocos	+
<b>R004</b>		R	2.0	8.0	0.5	32.0	128.0	64.0	Cocos	+
<b>R007</b>		R	2.0	8.0	0.5	32.0	128.0	64.0	Cocos	+
<b>R021</b>		R	2.0	8.0	0.5	32.0	128.0	64.0	Cocos	+
6		<b>R001</b>	R	2.0	8.0	0.5	16.0	128.0	64.0	Cocos
	<b>R008</b>	R	2.0	8.0	0.5	16.0	128.0	64.0	Cocos	+
	R009	R	2.0	8.0	0.5	16.0	128.0	64.0	Cocos	+
	R015	R	2.0	8.0	0.5	16.0	128.0	64.0	Cocos	+
	<b>R016</b>	R	2.0	8.0	0.5	16.0	128.0	64.0	Cocos	+
	R023	R	2.0	8.0	0.5	16.0	128.0	64.0	Cocos	+
	7	<b>R034</b>	R	1.0	16.0	0.5	64.0	64.0	64.0	Cocos
<b>R040</b>		R	1.0	16.0	0.5	64.0	64.0	64.0	Cocos	+
<b>R041</b>		R	1.0	16.0	0.5	64.0	64.0	64.0	Cocos	+
8	<b>R039</b>	R	0,5	16,0	0,5	32,0	64,0	64,0	Cocos	+
	<b>R046</b>	R	0,5	16,0	0,5	32,0	64,0	64,0	Cocos	+
	R051	R	0,5	16,0	0,5	32,0	64,0	64,0	Cocos	+
9	<b>R035</b>	R	0.5	16.0	0.5	64.0	64.0	64.0	Cocos	+
	<b>R037</b>	R	0.5	16.0	0.5	64.0	64.0	64.0	Cocos	+
	<b>R043</b>	R	0.5	16.0	0.5	64.0	64.0	64.0	Cocos	+
10	<b>R059</b>	R	4,0	4,0	0,5	4,0	256,0	64,0	Bacilos	-
	<b>R070</b>	R	16,0	1,0	64,0	256,0	128,0	64,0	Bacilos	-
	<b>R099</b>	256,0	4,0	4,0	0,5	32,0	32,0	64,0	Bacilos	-
	<b>R100</b>	256,0	4,0	2,0	0,5	R	256,0	32,0	Bacilos	-
	R123	64,0	0,5	8,0	64,0	8,0	32,0	4,0	Bacilos	-
	R126	64,0	4,0	1,0	0,5	8,0	32,0	4,0	Bacilos	-
	R152	32,0	0,5	4,0	1,0	0,5	4,0	4,0	Bacilos	-

Tabela 9 (continuação)

Grupo	Isolado*	NAL (µg/mL)	AMP (µg/mL)	CHL (µg/mL)	ERY (µg/mL)	STR (µg/mL)	PEN (µg/mL)	TET (µg/mL)	Forma	Gram
11	R067	R	8,0	0,5	1,0	256,0	4,0	64,0	Bacilos	+
	R068	R	0,5	4,0	1,0	256,0	4,0	64,0	Bacilos	+
	R069	256,0	4,0	4,0	4,0	256,0	128,0	32,0	Bacilos	+
	R076	128,0	0,5	0,5	0,5	64,0	4,0	0,5	Bacilos	+
	R078	256,0	8,0	1,0	0,5	512,0	256,0	64,0	Bacilos	+
	<b>R086</b>	64,0	8,0	2,0	0,5	64,0	32,0	64,0	Bacilos	+
	R090	64,0	0,5	4,0	1,0	512,0	128,0	64,0	Bacilos	+
	R092	256,0	16,0	1,0	0,5	R	32,0	64,0	Bacilos	+
	R094	256,0	1,0	0,5	0,5	R	64,0	4,0	Bacilos	+
	R095	R	1,0	4,0	64,0	256,0	64,0	64,0	Bacilos	+
	<b>R096</b>	64,0	8,0	0,5	0,5	32,0	32,0	4,0	Bacilos	+
	R097	256,0	4,0	1,0	4,0	256,0	256,0	64,0	Bacilos	+
	R115	64,0	1,0	4,0	0,5	0,5	128,0	4,0	Bacilos	+
	R117	64,0	1,0	1,0	0,5	8,0	8,0	0,5	Bacilos	+

\* Em negrito, os isolados para os quais o DNA total foi extraído. NAL = ácido nalidíxico; AMP = ampicilina; CHL = cloranfenicol; ERY = eritromicina; STR = estreptomicina; PEN = penicilina; TET = tetraciclina. R indica isolados resistentes à concentração de 512,0 µg/mL. Os bacilos foram agrupados, de acordo com a coloração de gram.

Tabela 10 - Agrupamento dos isolados das fezes segundo o perfil de resistência aos sete antibióticos testados, forma e coloração de Gram

Grupo	Isolado*	NAL (µg/mL)	AMP (µg/mL)	CHL (µg/mL)	ERY (µg/mL)	STR (µg/mL)	PEN (µg/mL)	TET (µg/mL)	Forma	Gram
1	<b>F020</b>	R	2,0	16,0	0,5	32,0	128,0	8,0	Cocos	+
	<b>F026</b>	R	2,0	16,0	0,5	32,0	128,0	8,0	Cocos	+
	<b>F027</b>	R	2,0	16,0	0,5	32,0	128,0	8,0	Cocos	+
	F028	R	2,0	16,0	0,5	32,0	128,0	8,0	Cocos	+
2	<b>F016</b>	R	1,0	16,0	0,5	32,0	64,0	8,0	Cocos	+
	<b>F025</b>	R	1,0	16,0	0,5	32,0	64,0	8,0	Cocos	+
3	F024	R	1,0	16,0	0,5	32,0	128,0	8,0	Cocos	+
	<b>F030</b>	R	1,0	16,0	0,5	32,0	128,0	8,0	Cocos	+
4	<b>F022</b>	R	1,0	16,0	0,5	8,0	128,0	8,0	Cocos	+
	<b>F023</b>	R	1,0	16,0	0,5	8,0	128,0	8,0	Cocos	+
	F029	R	1,0	16,0	0,5	8,0	128,0	8,0	Cocos	+
	<b>F031</b>	R	1,0	16,0	0,5	8,0	128,0	8,0	Cocos	+
5	<b>F008</b>	R	4,0	16,0	0,5	32,0	64,0	8,0	Cocos	+
	F009	R	4,0	16,0	0,5	32,0	64,0	8,0	Cocos	+
6	<b>F039</b>	R	2,0	8,0	0,5	64,0	128,0	64,0	Cocos	+
	<b>F040</b>	R	2,0	8,0	0,5	64,0	128,0	64,0	Cocos	+
	<b>F047</b>	R	2,0	8,0	0,5	64,0	128,0	64,0	Cocos	+
	F048	R	2,0	8,0	0,5	64,0	128,0	64,0	Cocos	+
	<b>F049</b>	R	2,0	8,0	0,5	64,0	128,0	64,0	Cocos	+
	<b>F054</b>	R	2,0	8,0	0,5	64,0	128,0	64,0	Cocos	+
7	<b>F042</b>	R	2,0	8,0	0,5	64,0	64,0	64,0	Cocos	+
	<b>F046</b>	R	2,0	8,0	0,5	64,0	64,0	64,0	Cocos	+
	F050	R	2,0	8,0	0,5	64,0	64,0	64,0	Cocos	+
	<b>F051</b>	R	2,0	8,0	0,5	64,0	64,0	64,0	Cocos	+
8	F038	R	2,0	8,0	0,5	8,0	64,0	64,0	Cocos	+
	<b>F045</b>	R	2,0	8,0	0,5	8,0	64,0	64,0	Cocos	+
	<b>F052</b>	R	2,0	8,0	0,5	8,0	64,0	64,0	Cocos	+
9	F001	R	4,0	8,0	0,5	32,0	64,0	8,0	Cocos	+
	<b>F002</b>	R	4,0	8,0	0,5	32,0	64,0	8,0	Cocos	+
	<b>F003</b>	R	4,0	8,0	0,5	32,0	64,0	8,0	Cocos	+
	<b>F004</b>	R	4,0	8,0	0,5	32,0	64,0	8,0	Cocos	+
	<b>F014</b>	R	4,0	8,0	0,5	32,0	64,0	8,0	Cocos	+
10	<b>F012</b>	R	1,0	8,0	0,5	32,0	64,0	8,0	Cocos	+
	F013	R	1,0	8,0	0,5	32,0	64,0	8,0	Cocos	+
11	<b>F117</b>	256,0	0,5	1,0	0,5	256,0	64,0	8,0	Bacilos	+
	<b>F122</b>	256,0	0,5	1,0	0,5	256,0	64,0	8,0	Bacilos	+
12	<b>F118</b>	256,0	0,5	1,0	0,5	64,0	64,0	8,0	Bacilos	+
	F120	256,0	0,5	1,0	0,5	64,0	64,0	8,0	Bacilos	+

\* Em negrito, os isolados para os quais o DNA total foi extraído. NAL = ácido nalidíxico; AMP = ampicilina; CHL = cloranfenicol; ERY = eritromicina; STR = estreptomicina; PEN = Penicilina; TET = tetraciclina. R indica isolados resistentes à concentração de 512,0 µg/mL.

### 4.3. Diversidade genética dos isolados resistentes aos antibióticos

Foram amplificados o DNA total de 29 isolados do rúmen e 28 isolados das fezes. A diversidade genética desses isolados foi avaliada por RAPD, utilizando-se onze oligonucleotídeos (Tabela 3).

O padrão de bandas da amplificação do DNA total dos isolados do rúmen evidenciou uma alta diversidade genética entre os isolados (Figuras 5). O padrão de bandas da amplificação do DNA total dos isolados das fezes evidenciou que a diversidade genética, entre os isolados das fezes, foi menor do que a diversidade genética entre os isolados do rúmen (Figura 6).

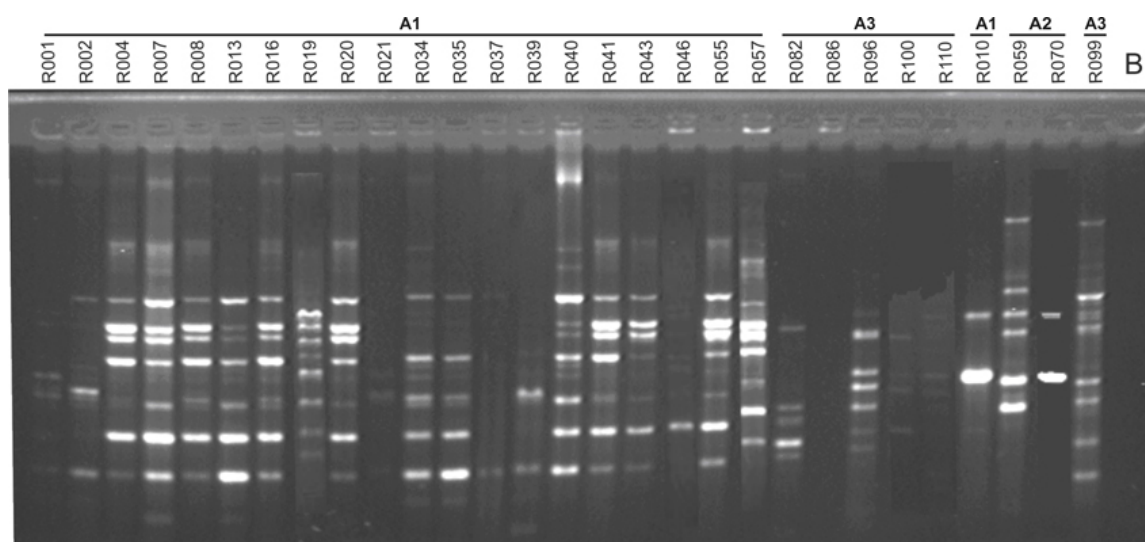


Figura 5. Eletroforese em gel de agarose do DNA total de 29 isolados do rúmen de bovinos amplificado por RAPD. Isolados: R001 a R099; B = Branco; A1 = Animal 1; A2 = Animal 2; A3 = Animal 3. Oligonucleotídeo OP AE 01.

A matriz de dissimilaridade, obtida a partir da análise por marcadores RAPD das bactérias isoladas do rúmen, mostra que a distância genética entre os isolados do rúmen variou de 58 % a 100 % (Figura 7), enquanto a matriz de dissimilaridade, obtida a partir da análise por marcadores RAPD das bactérias isoladas das fezes, mostra que a distância genética entre os isolados variou de 16 % a 96 % (Figura 8).

Baseando nas matrizes, que contêm os valores de distâncias genéticas, foram realizadas as análises de agrupamento pelo método hierárquico “Unweighted pair-group method using an arithmetic average”, ou UPGMA.

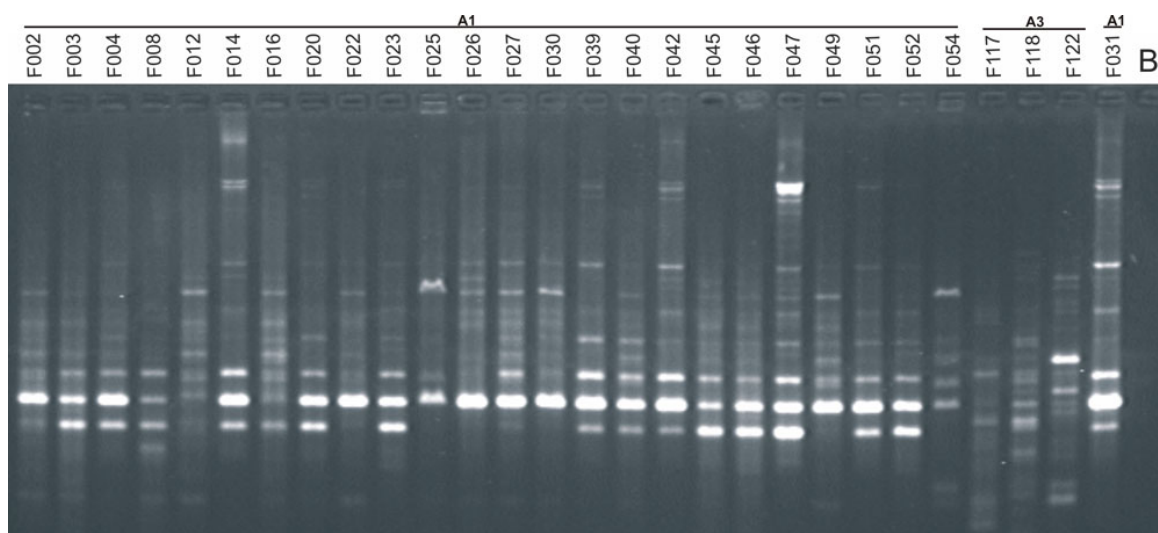


Figura 6. Eletroforese em gel de agarose do DNA total de 28 isolados de fezes de bovinos amplificado por RAPD. Isolados: F002 a F031; B = Branco; A1 = Animal 1; A3 = Animal 3. Oligonucleotídeo OPM 20.

No dendrograma dos isolados do rúmen (Figura 9), observa-se uma maior distância genética entre os isolados R010 e R019, em comparação com os demais isolados. No dendrograma dos isolados das fezes (Figura 10), verifica-se que os isolados F117, F118 e F122 possuem maior distância genética em comparação com os demais.

Considerando os valores de distância genética, apresentados na matriz de dissimilaridade referente aos isolados do rúmen (Figura 7), bem como o dendrograma da Figura 9, pode-se sugerir quais bactérias seriam de espécies diferentes. Desta forma, tomando-se o primeiro isolado do dendrograma como referencial (R020) e considerando os valores de distância genética entre os isolados acima de 70 %, pode-se inferir que os isolados R001, R002, R004, R008, R010, R016, R019, R020, R021, R034, R035, R037, R039, R040, R043, R055, R057, R059, R082, R086, R096, R099, R100 pertencem a espécies diferentes, sendo, assim, são candidatos à identificação. Realizou-se a análise da matriz de dissimilaridade e do dendrograma das bactérias isoladas das fezes (Figuras 8 e 10), levando em consideração as distâncias genéticas superiores a 70 % e o isolado F014, como referencial. Os isolados das fezes, que provavelmente pertencem a espécies diferentes, são F014, F117, F118 e F122.

Observando as Figuras 9 e 10, constata-se que, para os isolados do rúmen, existe um isolado apresentando seis marcas de resistência. Todos os isolados do rúmen, que apresentam cinco marcas, são resistentes aos mesmos antibióticos. Os isolados do rúmen e das fezes, que apresentam quatro marcas de resistência, são resistentes aos antibióticos NAL, AMP, PEN e TET. Os isolados do rúmen que apresentam três marcas

de resistência, com exceção do R096, são resistentes aos antibióticos NAL, PEN e TET. Os isolados das fezes, que apresentam três marcas de resistência, são resistentes aos antibióticos NAL, AMP e PEN. Os isolados das fezes, que apresentam duas marcas de resistência, são resistentes aos antibióticos NAL e PEN.

	R001	R002	R004	R007	R008	R010	R013	R016	R019	R020	R021	R034	R035	R037	R039	R040	R041	R043	R046	R055	R057	R059	R070	R082	R086	R096	R099	R100	R110
R001	0																												
R002	0,80	0																											
R004	0,72	0,92	0																										
R007	0,74	0,70	0,81	0																									
R008	0,85	0,87	0,82	0,78	0																								
R010	0,92	0,96	0,88	0,90	1,00	0																							
R013	0,60	0,74	0,86	0,69	0,88	1,00	0																						
R016	0,87	0,83	0,68	0,69	0,88	0,90	0,80	0																					
R019	0,94	1,00	0,94	0,97	0,92	1,00	0,94	0,95	0																				
R020	0,97	0,79	1,00	0,90	0,86	1,00	0,97	1,00	1,00	0																			
R021	0,95	0,86	0,96	0,88	0,95	1,00	0,84	0,96	1,00	0,92	0																		
R034	0,77	0,90	0,97	0,85	0,93	1,00	0,65	0,94	0,95	0,96	0,78	0																	
R035	0,95	1,00	0,94	0,97	1,00	1,00	0,92	0,90	0,80	1,00	0,92	0,85	0																
R037	0,85	0,90	0,86	0,85	0,95	0,92	0,85	0,92	0,91	1,00	0,94	0,88	0,92	0															
R039	1,00	0,96	1,00	0,93	1,00	0,83	0,94	0,83	1,00	1,00	1,00	0,95	1,00	1,00	0														
R040	0,86	0,88	0,96	0,83	0,86	0,94	0,80	0,93	1,00	0,94	0,84	0,72	0,94	1,00	1,00	0													
R041	0,84	0,82	0,80	0,81	0,92	0,94	0,86	0,68	1,00	0,95	0,86	1,00	1,00	0,91	1,00	0,96	0												
R043	0,78	0,82	0,88	0,80	0,86	1,00	0,81	0,92	1,00	0,87	0,89	0,86	0,91	0,76	1,00	0,79	0,88	0											
R046	0,80	0,83	0,68	0,82	0,96	0,95	0,80	0,76	1,00	0,95	0,88	0,97	0,95	0,78	0,95	0,93	0,73	0,70	0										
R055	0,97	0,92	0,94	0,97	1,00	1,00	0,97	0,95	1,00	0,88	1,00	1,00	1,00	0,83	1,00	1,00	0,94	0,91	0,90	0									
R057	0,97	0,92	0,94	0,97	1,00	0,86	0,95	0,95	1,00	1,00	0,92	0,95	1,00	0,92	1,00	0,87	1,00	0,96	0,90	1,00	0								
R059	0,89	0,89	0,84	0,83	0,94	0,90	0,92	0,81	1,00	0,91	0,93	0,96	1,00	1,00	1,00	1,00	0,78	0,96	0,86	1,00	1,00	0							
R070	0,84	0,94	1,00	0,91	0,67	1,00	0,81	0,92	0,90	0,92	0,94	0,83	0,92	1,00	1,00	0,84	1,00	0,85	1,00	1,00	1,00	0,93	0						
R082	0,89	0,93	0,84	0,91	0,80	1,00	0,92	0,86	0,88	0,91	1,00	1,00	1,00	0,94	1,00	0,95	0,90	0,96	1,00	0,90	1,00	1,00	0,93	0					
R086	0,94	1,00	0,94	0,93	1,00	0,80	0,97	0,95	1,00	1,00	1,00	0,95	1,00	1,00	1,00	0,93	0,94	1,00	1,00	1,00	1,00	0,88	1,00	1,00	0				
R096	0,92	0,84	0,89	0,94	0,93	0,88	0,95	0,95	1,00	0,57	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,89	0,92	0,95	0,88	1,00	0,80	0,92	0,91	0,83	0			
R099	0,92	0,97	0,78	0,91	1,00	0,78	0,92	0,81	1,00	1,00	0,93	1,00	0,90	0,87	0,89	1,00	0,95	0,92	0,75	1,00	0,90	0,83	1,00	1,00	1,00	1,00	0		
R100	0,92	0,85	1,00	0,94	0,94	1,00	0,86	1,00	1,00	0,78	1,00	0,96	1,00	1,00	1,00	0,94	0,89	0,92	0,96	0,89	1,00	0,92	0,93	0,92	1,00	0,78	1,00	0	
R110	0,85	0,74	0,74	0,66	0,89	0,85	0,80	0,58	1,00	0,91	0,96	0,94	1,00	0,88	0,84	0,97	0,74	0,89	0,77	0,95	0,95	0,76	0,96	0,96	1,00	0,91	0,82	1,00	0

Figura 7. Matriz quadrada das distâncias genéticas obtidas a partir da análise por marcadores RAPD de 29 genótipos de bactérias isoladas do rúmen de bovinos.

	F002	F003	F004	F008	F012	F014	F016	F020	F022	F023	F025	F026	F027	F030	F031	F039	F040	F042	F045	F046	F047	F049	F051	F052	F054	F117	F118	F122	
F002	<b>0</b>																												
F003	0,38	<b>0</b>																											
F004	0,44	0,39	<b>0</b>																										
F008	0,61	0,40	0,56	<b>0</b>																									
F012	0,46	0,59	0,50	0,65	<b>0</b>																								
F014	0,61	0,62	0,42	0,65	0,58	<b>0</b>																							
F016	0,42	0,50	0,35	0,63	0,25	0,43	<b>0</b>																						
F020	0,59	0,60	0,64	0,52	0,62	0,61	0,64	<b>0</b>																					
F022	0,41	0,55	0,54	0,56	0,38	0,61	0,39	0,55	<b>0</b>																				
F023	0,61	0,47	0,37	0,56	0,57	0,44	0,47	0,61	0,61	<b>0</b>																			
F025	0,56	0,61	0,56	0,67	0,63	0,54	0,55	0,74	0,52	0,62	<b>0</b>																		
F026	0,57	0,62	0,39	0,59	0,44	0,37	0,32	0,58	0,44	0,53	0,62	<b>0</b>																	
F027	0,53	0,57	0,49	0,62	0,63	0,59	0,58	0,60	0,51	0,65	0,54	0,61	<b>0</b>																
F030	0,40	0,44	0,37	0,53	0,51	0,51	0,47	0,61	0,47	0,56	0,36	0,51	0,32	<b>0</b>															
F031	0,70	0,67	0,62	0,62	0,68	0,55	0,64	0,48	0,66	0,62	0,76	0,56	0,58	0,67	<b>0</b>														
F039	0,60	0,64	0,43	0,68	0,68	0,44	0,58	0,66	0,63	0,53	0,48	0,58	0,37	0,36	0,58	<b>0</b>													
F040	0,55	0,43	0,33	0,59	0,60	0,53	0,47	0,61	0,64	0,37	0,62	0,50	0,56	0,52	0,54	0,50	<b>0</b>												
F042	0,63	0,66	0,47	0,70	0,60	0,16	0,46	0,66	0,63	0,50	0,56	0,40	0,56	0,51	0,48	0,38	0,53	<b>0</b>											
F045	0,57	0,51	0,34	0,59	0,53	0,42	0,47	0,55	0,60	0,38	0,65	0,43	0,55	0,52	0,51	0,50	0,30	0,50	<b>0</b>										
F046	0,56	0,44	0,45	0,53	0,51	0,56	0,51	0,45	0,59	0,49	0,70	0,55	0,57	0,54	0,46	0,60	0,42	0,58	0,27	<b>0</b>									
F047	0,72	0,69	0,54	0,64	0,65	0,37	0,58	0,60	0,65	0,51	0,75	0,44	0,68	0,69	0,48	0,58	0,59	0,40	0,45	0,60	<b>0</b>								
F049	0,56	0,68	0,59	0,71	0,63	0,67	0,55	0,71	0,47	0,65	0,41	0,62	0,54	0,50	0,72	0,58	0,65	0,66	0,67	0,72	0,75	<b>0</b>							
F051	0,50	0,42	0,43	0,54	0,56	0,43	0,49	0,57	0,53	0,50	0,55	0,49	0,55	0,39	0,58	0,55	0,53	0,46	0,53	0,48	0,63	0,64	<b>0</b>						
F052	0,61	0,50	0,60	0,55	0,61	0,69	0,63	0,50	0,61	0,53	0,75	0,63	0,62	0,63	0,59	0,73	0,53	0,75	0,47	0,39	0,64	0,69	0,62	<b>0</b>					
F054	0,55	0,51	0,44	0,61	0,50	0,58	0,42	0,72	0,54	0,40	0,49	0,54	0,60	0,49	0,68	0,57	0,48	0,58	0,57	0,59	0,67	0,44	0,57	0,64	<b>0</b>				
F117	0,92	0,94	0,93	0,92	0,91	0,96	0,92	0,88	0,93	0,93	0,94	0,95	0,86	0,88	0,87	0,85	0,85	0,95	0,86	0,84	0,94	0,88	0,95	0,81	0,92	<b>0</b>			
F118	0,83	0,84	0,86	0,85	0,85	0,93	0,87	0,82	0,83	0,86	0,92	0,90	0,81	0,86	0,85	0,84	0,77	0,93	0,79	0,76	0,90	0,86	0,88	0,72	0,89	0,47	<b>0</b>		
F122	0,86	0,90	0,90	0,88	0,88	0,93	0,86	0,81	0,86	0,85	0,91	0,92	0,86	0,88	0,84	0,86	0,82	0,93	0,86	0,81	0,94	0,85	0,90	0,78	0,89	0,60	0,74	<b>0</b>	

Figura 8. Matriz quadrada das distâncias genéticas obtidas a partir da análise de marcadores RAPD de 28 genótipos de bactérias isoladas das fezes de bovinos.

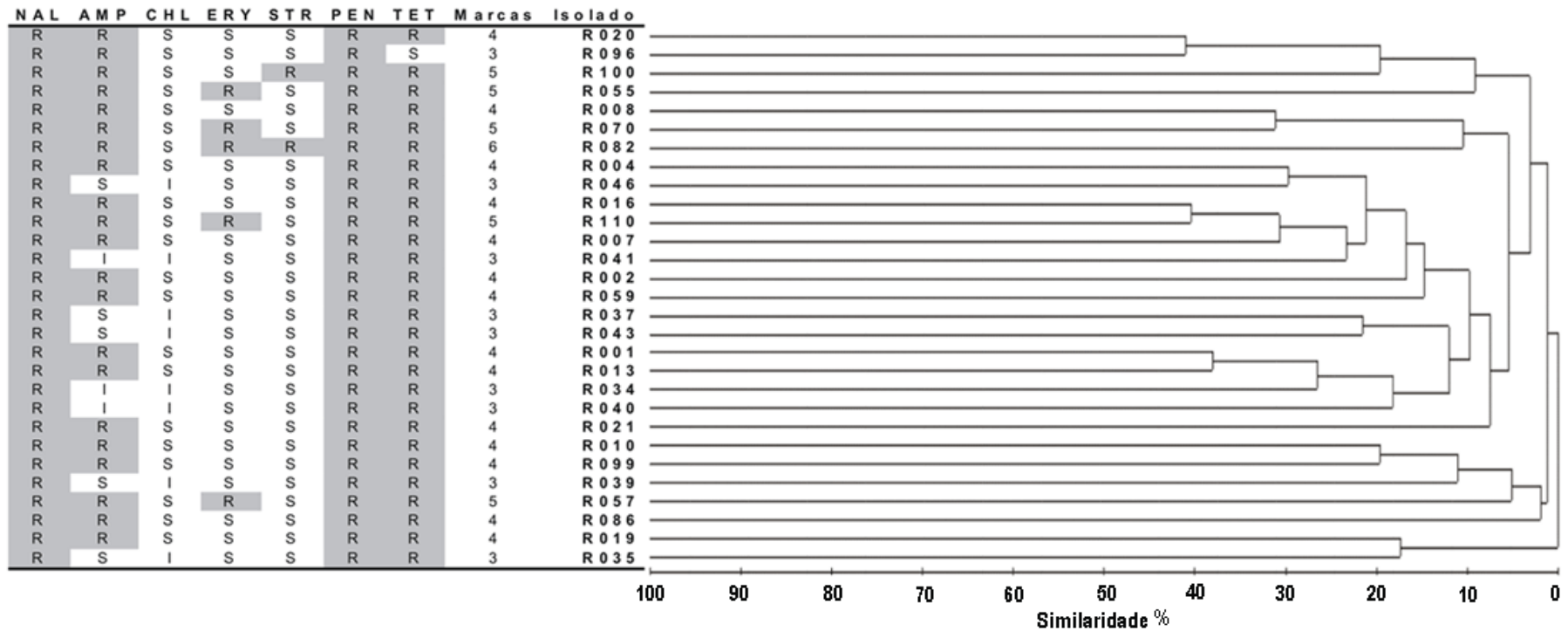


Figura 9. Dendrograma da análise de agrupamento hierárquico pelo método UPGMA, com base no complemento aritmético do índice de Jaccard. Os valores alfanuméricos correspondem à identificação dos isolados do rúmen.

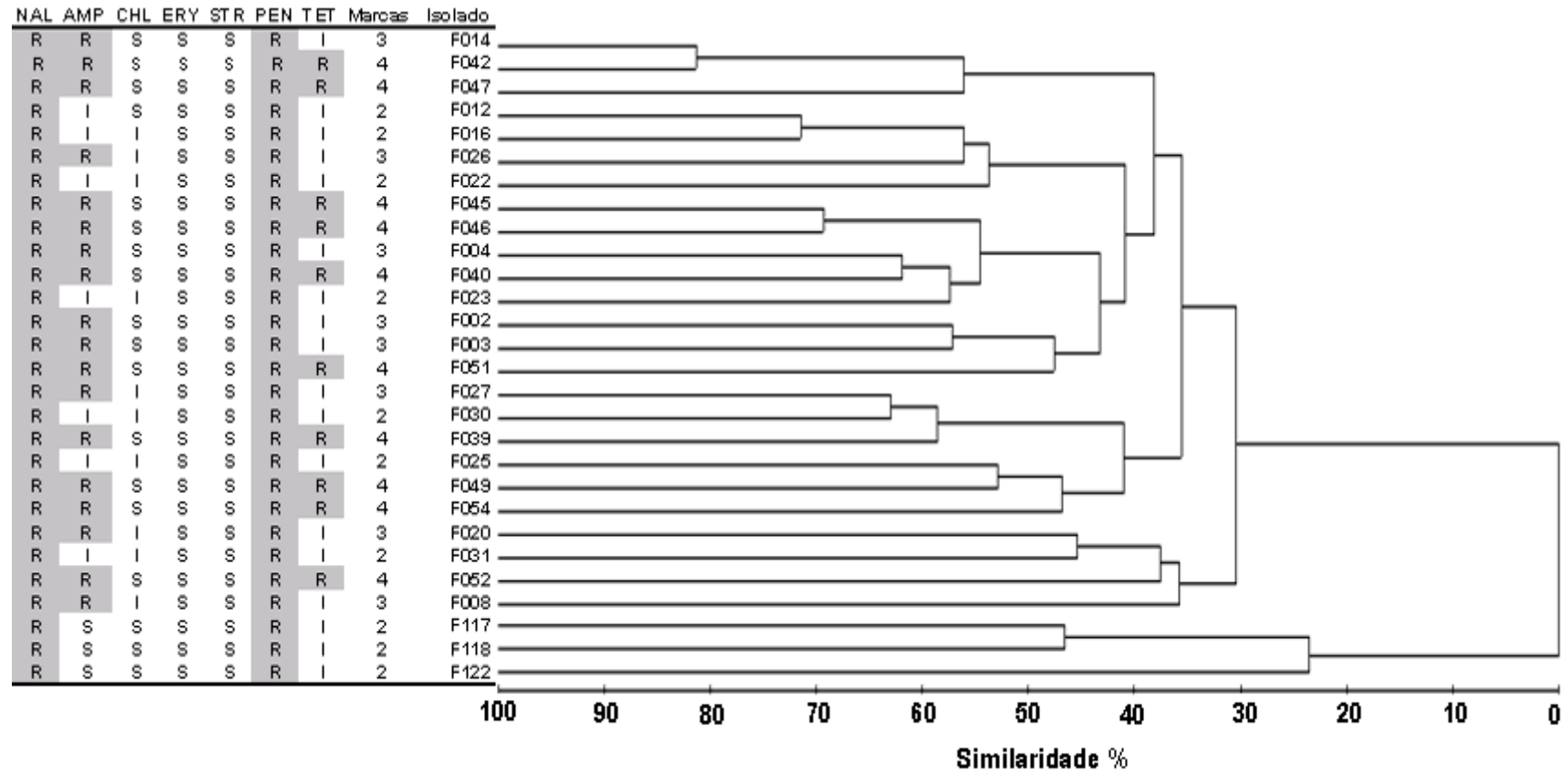


Figura 10. Dendrograma da análise de agrupamento hierárquico pelo método UPGMA, com base no complemento aritmético do índice de Jaccard. Os valores alfanuméricos correspondem à identificação dos isolados das fezes.

## 5. CONCLUSÕES

- Nenhum isolado do rúmen ou das fezes foi, simultaneamente, resistente aos sete antibióticos. Os isolados do rúmen, que apresentaram maior número de marcas de resistência, foram simultaneamente resistentes a seis antibióticos, enquanto os obtidos das fezes foram, simultaneamente, resistentes a cinco antibióticos.

- Entre os isolados do rúmen, que apresentaram resistência a seis ou cinco antibióticos, nenhum foi resistente ao cloranfenicol.

- A maioria dos isolados, que apresentaram quatro marcas, foram simultaneamente resistentes ao ácido nalidíxico, à ampicilina, à penicilina e à tetraciclina, enquanto a maioria dos isolados, que apresentaram três marcas de resistência, foram resistentes ao ácido nalidíxico, à ampicilina e à penicilina.

- Os dados indicam uma provável relação entre o perfil de resistência das bactérias do rúmen e o perfil de resistência das bactérias das fezes, para os antibióticos: ácido nalidíxico, ampicilina, eritromicina, penicilina e tetraciclina.

- Os valores de distância genética para os isolados do rúmen variaram de 58 % a 100 %, indicando grande diversidade genética entre os isolados.

- Os valores de distância genética entre os isolados das fezes variaram de 16 % a 96 %, indicando grande diversidade genética entre os isolados, sendo estes valores menores, em comparação com os isolados do rúmen.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 48: 5-16. 2001.
- ARCURI, P. B.; MANTOVANI, H. C. Recentes avanços em microbiologia ruminal e intestinal: (BIO)tecnologias para a nutrição de ruminantes. **V Simpósio de Produção de Gado de Corte**. Anais: 271-312. 2006.
- ATLAS, R. M; BARTHA, R. Microbial ecology: fundamentals and applications - 4th edition, 694p.. 1998.
- BRASIL. Departamento de fomento e fiscalização da produção animal/secretaria de apoio rural e cooperativismo/ Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – DFPA/SARC/MAPA. 2002.
- BRASIL. Instrução normativa nº. de 24 de novembro de 2004. Departamento de fomento e fiscalização da produção animal/secretaria de apoio rural e cooperativismo/ Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – DFPA/SARC/MAPA. 2004.
- BROUDISCOU, L. P; GEISSLER, H; BROUDISCOU, A. Estimation of the growth rate of mixed ruminal bacteria from short-term DNA radiolabelling. **Anaerobe**, 4: 145-152. 1998.
- BRUINSMA, N.; WILLEMS, R. J. L.; VAN DEN BOGAARD, A. E.; VAN SANTEN-VERHEUVEL, M.; LONDON, NANCY; DRIESSEN C.; STOBBERINGH, E. E. Different levels of genetic homogeneity in vancomycin-resistant and susceptible *Enterococcus faecium* isolates from different human and animal sources analyzed by amplified-fragment length polymorphism. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 46: 2779-2783. 2002.

- BURCH, D. G. S. Is it time to ban all antibiotics as animal growth-promoting agents? **The Lancet**, 348: 1455. 1996.
- CASEWELL, M.; FRIIS, C.; MARCO, E.; MCMULLIN, P. AND PHILLIPS, I. The european ban on growth-promoting and emerging consequences for human and animal health. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 52: 159-161. 2003.
- CRUZ, C. D. Programa GENES – aplicativo computacional em genética e estatística, MG: UFV, 442p.. 1997.
- EDWARDS, J. E; MCEWAN, N. R.; TRAVIS, A. J.; WALLACE, R. J. 16S rDNA library-based analysis of ruminal bacterial diversity. **Antonie Leeuwenhoek**, 86: 263-281. 2004.
- FAO 2005. Food and Agriculture Organization (FAO)/ International Dairy Federation (IDF) **Dairy Development Newsletter**, 9. 2005.
- FLINT, H. J. The rumen microbial ecosystem – some recent developments. **Trends in Microbiology**, 12: 483-488. 1997.
- FLINT H. J; THOMSON, A. M.; BISSET, J. Plasmid associated transfer of tetracycline resistance in *Bacteroides rumenicola*. **Applied and Environmental Microbiology**, 54: 855-860. 1988.
- FLINT H. J.; STEWART, C. S. Antibiotic resistance and plasmid of ruminal strains of *Bacteroides rumenicola* and *Bacteroides multiaacidus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 26: 450-455. 1987.
- FLINT H. J.; DUNCAN, S. H.; STEWART, C. S. Transmissible antibiotic resistance in strains of *Escherichia coli* isolated from the ovine rumen. **Letters in Applied Microbiology**, 5: 47-49. 1987.
- FRANKLIN, R. B.; TAYLOR, D. R.; MILLS, A. L. Characterization of microbial communities using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). **Journal of Microbiological Methods**, 35: 225-235. 1999.
- HARRIGAN, W. F.; MCCANCE M. E.. Laboratory methods in food and dairy microbiology, 451p.. 1976.
- HASTINGS, E. G. The significance of the bacteria and the protozoa of the rumen of the bovine. **Microbiology Reviews**, 8: 235-254. 1944.
- HEFFORD, M. A.; KOBAYASHI, Y.; ALLARD, S. E.; FORSTER, R. J.; TEATHER, R. M. Sequence analysis and characterization of pOM1, a small cryptic plasmid from *Butyrivibrio fibrisolvens*, and its use in construction of a new family of clonig vectors for *Butyrivibrios*. **Applied and Environmental Microbiology**, 63: 1701-1711. 1997.
- HEFFORD, M; TEATHER, R. M.; FORSTER, R. J.. The complete nucleotide sequence of a small cryptic plasmid from a rumen bacterium of the genus *Butyrivibrio*. **Plasmid**, 29: 63-69. 1993.

- HESPELL, R. B.; WHITEHEAD, T. R.. Conjugal transfer of Tn916, Tn916 $\Delta$ E, and pAM $\beta$ 1 from *Enterococcus faecalis* to *Butyrivibrio fibrisolvens* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, 57: 2703-2709. 1991.
- HOUWELING, C.D.; GAINER, J. H. Public health concerns relative to the use of subtherapeutic levels of antibiotics in animal feeds. **Journal of Animal Science**, 46: 1413-1424. 1978.
- IBGE, DIRETORIA DE PESQUISA, COORDENAÇÃO DE AGROPECUÁRIA, Pesquisa da Pecuária Municipal 2004, 2005.
- JENSEN, L. B., HAMMERUM A. M., AARESTRUP, F. M., VAN DEN BOGAARD, A. E. AND STOBBERINGH, E. E. Occurrence of *satA* and *vgb* genes in streptogramin-resistant *Enterococcus faecium* isolates of animal and human origins in the Netherlands. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 42(12): 3330–3331, 1998.
- KOBAYASHI, Y.; FORSTER, R. J.; HEFFORD, M. A.; TEATHER, R. M.; WAKITA, M.; OHMIYA, K. HOSHINO, S. Analysis of the sequence of a new cryptic plasmid, pRJF2, from a rumen bacterium of the genus *Butyrivibrio*: comparison with other *Butyrivibrio* plasmid and application in the development of a cloning vector. **FEMS Microbiology Letters**, 130: 137-144. 1995.
- KRAUSE, D. O.; DALRYMPLE, B. P.; SMITH, W. J.; MACKIE, R. I.; MCSWEENWY, C. S. 16S rDNA sequencing of *Ruminococcus albus* and *Ruminococcus flavefaciens*: design of a signature probe and its application in adult sheep. **Microbiology**, 145: 1797-1807. 1999.
- KRAUSE, D. O.; RUSSELL, J. B. Symposium: ruminal microbiology: how many bacteria are there? **Journal of Dairy Science**, 79: 1467-1475. 1996.
- LEFLON-GUIBOUT, V.; PONS, J. L.; HEYM, B.; NICOLAS-CHANOINE, M. H. Typing of *Clostridium perfringens* strains by use of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) system in comparison with zymotyping. **Anaerobe**, 3: 245-250. 1997.
- MACGOWAN, A. P.; WISE R. Establishing MIC breakpoints and the interpretation of in vitro susceptibility tests. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 48: 17-28. 2001.
- MALÍK, R; PRISTAS, P.; JAVORSKÝ, P. Occurrence of Plasmid-Mediated Ampicillin Resistance among Enterobacteria from the Ovine Rumen. **Folia Microbiologica**, 49: 187-190. 2004.
- MARTIN, S. A.; DEAN, R. G.. Characterization of a plasmid from the ruminal bacterium *Selenomonas ruminantium*. **Applied and Environmental Microbiology**, 55: 3035-3038. 1989.
- MAY, T.; KOCHERGINSKAYA, S. A.; MACKIE, R. I.; VERCOE, P. E.; WHITE, B. A. Complete nucleotide sequence of a cryptic plasmid, pBAW301, from the ruminal anaerobe *Ruminococcus flavefaciens* R13e2. **FEMS Microbiology Letters**, 144: 221-227. 1996.

- MELVILLE, C. M.; SCOTT, K. P.; MERCER, D. K.; FLINT, H. J. The *Butyrivibrio fibrisolvens* tet (W) gene is carried on the novel conjugative transposon TnB1230, which contains duplicated nitroreductase coding sequences. **Journal of Bacteriology**, 186: 3656-3659. 2004.
- MERCER, D. K.; PATEL, S.; FLINT, H. J. Sequence analysis of the plasmid pPRI2 from the rumen bacterium *Prevotella ruminicola* 223/m2/7 and the use of pPRI2 in prevotella/bacteroides shuttle vectors. **Plasmid**, 45: 227-232. 2001.
- MERTZ, E. L.; MADDOX, C. W.; SINGER, R. S. The prevalence of antimicrobial resistance in anaerobic bacteria of dairy cattle. **105<sup>th</sup> General Meeting of the American Society for Microbiology**, 258: Z035. 2005.
- MORRIS JR, J. GLENN; MCINTOSH, A.; JOHNSON, J. A. Contamination of animal feed by multiresistant enterococci – authors' reply. **The Lancet**, 354: 163. 1999.
- National Committee for clinical Laboratory Standards. Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria; approved standard. Six Edition: M11-A6. 41p. 2004.
- NIKOLICH, M. P.; HONG, G.; SHOEMAKER, N. B.; SALYERS, A. A. Evidence for natural horizontal transfer of tetQ between bacteria that normally colonize humans and bacteria that normally colonize livestock. **Applied and Environmental Microbiology**, 60: 3255-3260. 1994.
- NÓGRÁDY, N.; GADO, I.; TÓTH, A.; PÁSZTI, J.. Antibiotic resistance and class 1 integron patterns of non-typhoidal human *Salmonella* serotypes isolated in Hungary in 2002 and 2003. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 26: 126-132. 2005.
- OGATA, K.; AMINOV, R. I.; NAGAMINE, T.; BENNO, Y.; SEKISAKI, T.; MITSUMORI, M.; MINATO, H.; ITABASHI, H. Structural organization of pRAM4, a cryptic plasmid from *Prevotella ruminicola*. **Plasmid**, 35: 91-97. 1996.
- OHARA, H.; MIYAGI, T.; KANEICHI, K.; KARITA, S.; KOBAYASHI, Y.; KIMURA, T.; SAKKA, K.; OHMIYA, K. Structural analysis of a new cryptic plasmid pAR67 isolated from *Ruminococcus albus* AR67. **Plasmid**, 39: 84-88. 1998.
- PAQUET C. and MOUTON, C.. RAPD fingerprint for the distinction of *Prevotella intermedia* sensu stricto from *Prevotella nigrescens*. **Anaerobe**, 3: 271-278. 1997
- PIRIZ, S.; CUENCA, R.; VALLE, J.; VADILLO, S. Susceptibilities of anaerobic bacteria isolated from animal with ovine foot rot to 28 antimicrobial agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 36: 198-201. 1992.
- ROBERTSON, L. K.; DRUCKER, D. B.; BLINKHORN, A. S.; DAVIES, R. M. A Comparison of techniques used to distinguish strains of *Prevotella intermedia* from *Prevotella nigrescens*. **Anaerobe**, 5: 119-122. 1999.
- RUSSELL, J. B.; RYCHLIK, J. L. Factors that alter rumen microbial ecology. **Science**, 292: 1119-1122. 2001.

- SCOTT K. P. The role of conjugative transposons in spreading antibiotic resistance between bacteria that inhabit the gastrointestinal tract. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 59: 2071-2082. 2002.
- SCOTT, K. P.; BARBOSA, T. M.; FORBES, K. J.; FLINT, H. J. High-frequency transfer of a naturally occurring chromosomal tetracycline resistance element in the ruminal anaerobe *Butyrivibrio fibrisolvens*. **Applied and Environmental Microbiology**, 63: 3405-3411. 1997.
- SEBALD, M. Genetic basis for antibiotic resistance in anaerobes. **Clinical Infectious Diseases**, 18: S297-304. 1994.
- SINDAN. 2005. Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para saúde animal - SINDAN <http://www.sindan.org.br/informacoes/mercado.aspx>. Acesso em 12/07/2006.
- SOLOMONS, I. A. Antibiotics in animal feeds – human and animal safety issues. **Journal of Animal Science**, 46: 1360-1368. 1978.
- SPRINCOVA, A.; JAVORSKY, P.; PRISTAS, P. pSRD191, a new member of RepL replicating plasmid family from *Selenomonas ruminantium*. **Plasmid**, 54: 39-47. 2004.
- TAJIMA, K.; ARAI, S.; OGATA, K.; NAGAMINE, T.; MATSUI, H.; NAKAMURA, M.; AMINOV, R. I.; BENNO, T. Rumen bacterial community transition during adaptation to high-grain diet. **Anaerobe**, 6: 273-284. 2000.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L.. Microbiologia - 6ª edição, 827 p.. 1998.
- VAN DEN BOGAARD, A. E., STOBBERINGH, E. E. Epidemiology of resistance to antibiotics links between animals and humans. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 14: 327-335. 2000.
- VAN DEN BOGAARD, A. E.; STOBBERINGH, E. E. Time to ban all antibiotics as animal growth-promoting agents? **The Lancet**, 348: 619. 1996.
- WANG, C.; BALDWIN, B. B.; FULGHUM, R. S.; WILLIAMS, P. P. Quantitative antibiotic sensitivities of ruminal bacteria. **Applied Microbiology**, 18: 677-679. 1969.
- WANG, J.; SHOEMAKER, N. B.; WANG, G.; SALYERS, A. Characterization of bacteroides mobilizable transposon, NBU2, which carries a functional lincomycin resistance gene. **Journal of Bacteriology**, 182: 3559-3571. 2000.
- WEGENER<sup>a</sup>, H. C. Antibiotics feed and their role in resistance development. **Current Opinion in Microbiology**, 6: 439-445. 2003.
- WEGENER<sup>b</sup>, H. C. Ending the use of antimicrobial growth promoters is making a difference. **ASM News**, 69: 443-448.

WOLFSON, J S. HOOPER, D. C. Fluoroquinolone antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, 2: 378-424. 1989.

YU, Z.; MORRISON, M. Comparisons of different hypervariable regions of rrs genes for use in fingerprinting of microbial communities by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, 70: 4800-4806. 2004.