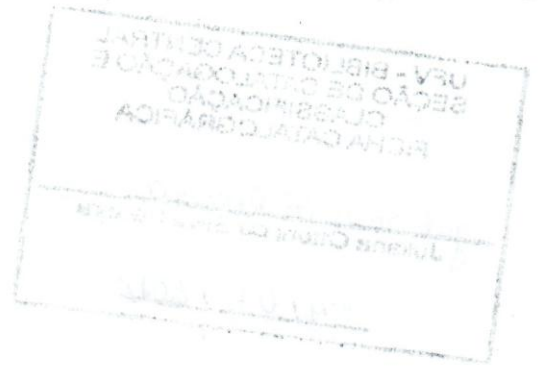


**MARIA ALEJANDRA OSPINA BARRERO**

**SISTEMAS DE EFLUXO MULTIDROGAS EM *Escherichia coli* ISOLADAS DE  
MASTITE BOVINA E USO DE SEUS INIBIDORES COMO POSSÍVEIS  
ADJUVANTES**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2012



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

T

O83s  
2012

Ospina Barrero, Maria Alejandra, 1987-

Sistemas de efluxo multidrogas em *Escherichia coli* isoladas de mastite bovina e uso de seus inibidores como possíveis adjuvantes / Maria Alejandra Ospina Barrero. – Viçosa, MG, 2012.

xii, 49f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f. 37-49

1. Mastite. 2. Drogas - Resistência em microorganismos.  
3. Bovino - Doenças. 4. Bactérias patogênicas.  
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

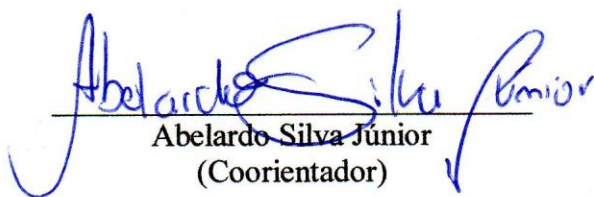
CDD 22. ed. 636.2089692

**MARIA ALEJANDRA OSPINA BARRERO**

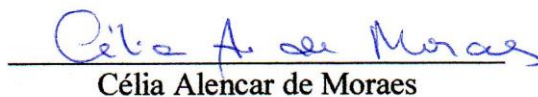
**SISTEMAS DE EFLUXO MULTIDROGAS EM *Escherichia coli* ISOLADAS DE  
MASTITE BOVINA E USO DE SEUS INIBIDORES COMO POSSÍVEIS  
ADJUVANTES**

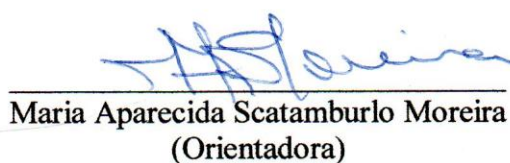
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 20 de abril de 2012.

  
Abelardo Silva Júnior  
(Coorientador)

  
Sérgio Oliveira de Paula

  
Célia Alencar de Moraes

  
Maria Aparecida Scatamburlo Moreira  
(Orientadora)

*Aos meus A Deus.*

*A minha família.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, o orientador de toda minha vida.

Aos meus pais, Julio Cesar Ospina Rodriguez e Maria Doris Barrero Carretero; e irmão, Julio Cesar Ospina Barrero, pelos esforços imensuráveis despendidos para minha formação. A toda a minha família, pelo incentivo e apoio.

A minha orientadora, professora Maria Aparecida Scatamburlo Moreira, exemplo de competência e sucesso profissional, meu profundo respeito e admiração. Muito obrigada pela oportunidade, confiança, amizade, disponibilidade permanente para me ajudar e pela generosidade com que partilho comigo seus conhecimentos científicos, sem os quais não teria sido possível a realização deste trabalho.

Aos professores Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo, Abelardo Silva Júnior e Sérgio Oliveira de Paula pela orientação, apoio, conhecimentos transmitidos.

Aos professores, membros da banca examinadora.

Agradeço a meus colegas de LDBAC, que se tornaram meus amigos, João, Fábio, Isabel, Vitor em especial a Priscila, David.

A meus amigos Yesid, Adriana, Irina, Carlos, Catalina, Rafael Blanco e Sara, obrigada por terem feito com que eu me sentisse especial.

A Rose e Bety, secretárias da Coordenação de Pós-graduação, pela ajuda prestada.

Aos funcionários do Setor de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Pública da UFV.

A Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Departamento de Veterinária.

A Dra Laura McMurry da Tufts University (EUA) pela doação da cepa E. coli AG100 e a Fundação de Amparo à Pesquisa em Minas Gerais (FAPEMIG), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

A todos vocês eu agradeço e desejo toda paz e todo bem.

## **BIOGRAFIA**

Maria Alejandra Ospina Barrero, filha de Julio Cesar Ospina Rodriguez e Maria Doris Barrero Carretero, nasceu em 09 de maio de 1987, na cidade de Ibague, departamento del Tolima.

Em março de 2004, iniciou seus estudos acadêmicos na Universidade del Tolima, no curso de Medicina Veterinária e Zootecnia. Em setembro de 2009, pela mesma instituição, graduou-se Médico Veterinário e Zootecnista.

Em março de 2010, ingressou no Programa de Pós-Graduação Strictu Sensu em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, em nível de mestrado, sob orientação da Professora Maria Aparecida Scatamburlo Moreira, e em abril de 2012 submeteu-se ao exame final de defesa de dissertação.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	2
3.1 OBJETIVO GERAL.....	12
3.2 Objetivos específicos.....	12
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	13
4.1 Bactérias.....	13
4.2 Perfil de resistência aos antimicrobianos.....	13
4.3 Detecção dos sistemas de efluxo multidrogas.....	14
4.4 Determinação da concentração inibitória mínima – CIM.....	15
4.5 Teste da efetividade de inibidores dos sistemas de efluxo multidrogas in vitro.....	15
4.6 Quantificação da expressão relativa dos genes dos sistemas de efluxo multidrogas.....	16
4.6.2 Síntese de cDNA.....	17
4.6.3 Reação de PCR em Tempo Real.....	18
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
5.2 Sistemas de efluxo multidrogas – PCR.....	20
5.3 Determinação da concentração inibitória mínima – CIM.....	24
5.4 Teste da efetividade in vitro de inibidores dos sistemas de efluxo multidrogas.....	25
5.5 Quantificação da expressão relativa dos genes dos sistemas de efluxo multidrogas.....	29
6 CONCLUSÃO.....	36
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Principais sistemas de efluxo em <i>Escherichia coli</i> .....	7
Quadro 2 - Inibidores dos sistemas de efluxo multidrogas em <i>Escherichia coli</i> .....	8
Quadro 3 - Tratamentos utilizados na quantificação relativa dos diferentes genes dos sistemas de efluxo multidrogas estudados.....	16
Quadro 4 - Oligonucleotídeos utilizados na técnica de PCR Tempo Real Quantitativa para os genes que codificam os sistemas de efluxo multidrogas estudados.....	18

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Presença de genes de sistemas de efluxo multidrogas em <i>Escherichia coli</i> isolados de leite provenientes de bovinos com mastite clínica, detectados pela técnica de PCR.....	22
Tabela 2- Concentração inibitória mínima (CIM) dos antimicrobianos em caldo Muller Hinton, dos isolados de <i>Escherichia coli</i> resistentes, na ausência e presença de PA $\beta$ N e NMP.....	26
Tabela 3- Concentração inibitória mínima (CIM) dos antimicrobianos em caldo Muller Hinton, dos isolados de <i>Escherichia coli</i> sensíveis, na ausência e presença de PA $\beta$ N e NMP.....	27

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação diagramática da membrana citoplasmática e membrana externa dos sistemas de efluxo multidrogas em bactérias.....	4
Figura 2- Efeito dos inibidores sobre o crescimento de <i>Escherichia coli</i> .....	16
Figura 3- Porcentagem dos genes que codificam os três sistemas de efluxo multidrogas estudados em <i>Escherichia coli</i> detectados por PCR.....	23
Figura 4- Produtos de PCR de <i>Escherichia coli</i> 21 de genes que codificam três sistemas de efluxo multidrogas.....	24
Figura 5- Expressão relativa dos genes <i>acrA</i> , <i>acrB</i> , <i>acrE</i> , <i>acrF</i> , <i>emrA</i> e <i>emrB</i> na ausência de tratamento.....	30
Figura 6- Expressão relativa dos genes <i>acrA</i> , <i>acrB</i> , <i>acrE</i> , <i>acrF</i> , <i>emrA</i> e <i>emrB</i> em relação aos tratamentos realizados: (A) Ampicilina; (B) Ampicilina mais PAβN; (C) Ampicilina mais NMP.....	31
Figura 7- Expressão relativa dos genes <i>acrA</i> , <i>acrB</i> , <i>acrE</i> , <i>acrF</i> , <i>emrA</i> e <i>emrB</i> em relação aos tratamentos realizados: (A) Sulfametoxazol/trimetoprim; (B) Sulfametoxazol/trimetoprim mais PAβN; (C) Sulfametoxazol/trimetoprim mais NMP.....	32

## RESUMO

OSPINA, Maria Alejandra, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2012. **Sistemas de efluxo multidrogas em *Escherichia coli* isolados de mastite bovina e uso de seus inibidores como possíveis adjuvantes.** Orientadora: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira. Coorientadores: Abelardo Silva Júnior e Sérgio Oliveira de Paula.

A mastite é uma das doenças mais relevantes do rebanho leiteiro, a qual tem um grande impacto econômico na cadeia produtiva do leite. A etiologia bacteriana desta enfermidade tem mudado de patógenos contagiosos para ambientais onde *Escherichia coli*, é um dos principais agentes etiológicos. Entre outros fatores, falhas na terapia poderiam ser atribuídas aos sistemas de efluxo multidrogas presentes em bactérias. Estes sistemas têm a capacidade de expulsar antimicrobianos praticamente de todas as classes, contribuindo na sua resistência. Estudaram-se 27 isolados de *Escherichia coli* provenientes de leite de bovinos com mastite, os quais foram submetidos a testes de sensibilidade aos principais antimicrobianos usados no tratamento desta doença na região. A técnica de reação em cadeia da polimerase, foi utilizada para identificar a presença de genes que codificam três sistemas de efluxo multidrogas, AcrAB, AcrEF e EmrAB. Avaliou-se também a efetividade in vitro de dois inibidores desses sistemas, o Phe-Arg- $\beta$ -naphthylamide e 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine, utilizando a Concentração Inibitória Mínima (CIM) como referência. Nos isolados resistentes, quantificou-se a expressão relativa dos genes relacionados a esses sistemas, em relação aos sete tratamentos realizados, pela técnica de PCR em Tempo Real. Os resultados revelaram que apenas quatro isolados de *E. coli* (14,8%), apresentaram resistência a ampicilina e a sulfametoxazol/trimetoprim, simultaneamente. Enquanto todos os 27 foram sensíveis a ceftiofur, gentamicina, enrofloxacin e cefalexina. Os isolados apresentaram pelo menos um sistema de efluxo multidrogas. Na CIM, observaram-se valores para ampicilina variando de 6  $\mu\text{g/mL}$  a 250  $\mu\text{g/mL}$  e para sulfametoxazol/trimetoprim de 12  $\mu\text{g/mL}$  a 1500  $\mu\text{g/mL}$  e verificou-se redução das CIM de ampicilina e sulfametoxazol/trimetoprim em todos os isolados na presença dos dois inibidores, exceto para sulfametoxazol/trimetoprim na presença do NMP. Os genes analisados apresentaram diferentes níveis de expressão relativa em relação aos sete tratamentos realizados, embora a literatura reporte que o sistema de efluxo AcrAB-TolC é o principal em *E. coli*, os genes que constituem esse sistema foram os que menos se expressaram, porém os genes *emrA* e *emrB* tiveram as maiores expressões relativas. Verificou-se que os

inibidores avaliados contribuíram na diminuição da expressão relativa do gene *acrF*, no tratamento com ampicilina.

## ABSTRACT

OSPINA, Maria Alejandra, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April, 2012. **Multidrug efflux systems in *Escherichia coli* isolated from bovine mastitis and use of their inhibitors as possible adjuvants.** Adviser: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira. Co-Advisers: Abelardo Silva Júnior e Sérgio Oliveira de Paula.

Mastitis is one of the most important diseases of the dairy herd, which has has great economic impact on the milk production chain. The bacterial etiology of this disease had moved from contagious pathogens for environmental ones in which *Escherichia coli*, is one of the main etiologic agents. Among other things, crashes in therapy could be attributed to the multidrug efflux systems present in bacteria. These systems have the ability to drive virtually all antimicrobial classes, thus contributing to its resistance. Were studied 27 strains of *Escherichia coli* from cattle with clinical mastitis, which were subjected to sensitivity tests, to the main antimicrobials used in the treatment of this disease in the region. The technique of polymerase chain reaction, was used to identify the presence of genes encoding three multidrug efflux systems, AcrAB, AcrEF and EmrAB. We also evaluated in vitro effectiveness of two inhibitors of these systems, the Phe-Arg- $\beta$ -naphthylamide (PA $\beta$ N) and 1 -(1-naphthylmethyl)-piperazine (NMP), using the minimum inhibitory concentration (MIC) as a reference. In the resistant strains was quantified the relative expression of genes related aspect of these systems in relation to the seven treatments performed by the technique of Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR). The results showed that only four strains of *E. coli* (14.8%) were resistant to ampicillin and trimethoprim/sulfamethoxazole, simultaneously. However, all 27 strains were sensitive to ceftiofur, gentamicin, enrofloxacin and cephalexin. The isolates showed at least a multidrug efflux system. In MIC were observed for values ranging from 6 mg ampicillin / mL to 250 mg / mL, and trimethoprim / sulfamethoxazole 12 mg / mL to 1500 mg / mL and was found to reduce the MIC of ampicillin and trimethoprim/ sulfamethoxazole in all isolates in the presence of two inhibitors, except for trimethoprim / sulfamethoxazole in the presence of NMP. The genes analyzed showed different relative expression levels, relative to the seven treatments done, although literature reporting the AcrAB-efflux system is the main Tolc *E. coli*, the genes that constitute this system were the least expressed themselves, but the genes *Emra* and *emrB* had the

highest relative expressions. It has been found that inhibitors contributed to the measured decrease in the relative expression of the gene *acrF*, treatment with ampicillin.

## 1. Introdução

A mastite bovina é uma das doenças mais importantes na indústria leiteira, a qual resulta em perdas que podem chegar a mais de 50% na produção pelo descarte do leite, gastos com medicamentos e assistência veterinária, pelas mortes e descarte do animal, com perda de material genético. Além destas perdas, há um risco potencial na saúde pública, já que promove a veiculação de patógenos causadores de zoonoses e de toxinas produzidas pelos mesmos. *Escherichia coli* é considerada um dos principais agentes etiológicos da mastite ambiental. Esta doença se apresenta como uma inflação local e nos casos crônicos, severas alterações sistêmicas com atonia ruminal, desidratação, choque toxêmico resultando na morte do animal. O uso dos antimicrobianos tem contribuído na diminuição da morbidade e mortalidade das enfermidades infecciosas. Entretanto, sua utilização incorreta na produção animal, com objetivos profiláticos e de promoção de crescimento, pode selecionar cepas com resistência natural, além de contribuir na aquisição e disseminação de genes de resistência, tornando as bactérias resistentes a um ou mais de um antimicrobiano simultaneamente. Entre os mecanismos de resistência encontram-se os sistemas de efluxo multidrogas que conferem às bactérias a capacidade de expulsar antimicrobianos de todas as classes, reduzindo as concentrações da droga dentro da célula e consequentemente produzindo falhas no tratamento da doença.

Tendo em vista a importância desse mecanismo de resistência em bactérias, pesquisas vêm sendo desenvolvidas com o intuito de modificar ou reverter a sensibilidade bacteriana mediada por efluxo multidrogas. Assim, o presente estudo teve como finalidade avaliar a efetividade *in vitro* de inibidores de sistemas de efluxo multidrogas (EPI), tais como fenilalanina arginyl  $\beta$  naftilamida (PABN) e 1-(1-Naphthylmethyl)-piperazine (NMP), para restaurar a atividade antimicrobiana de drogas usadas na terapia da mastite bovina. Este estudo poderia contribuir no desenvolvimento de novos tratamentos para combater esta doença de grande impacto econômico na cadeia produtiva do leite.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

A mastite é a inflamação da glândula mamária que se caracteriza por apresentar alterações patológicas no tecido glandular e uma série de modificações físico-químicas no leite (RADOSTITS et al., 2007). Trata-se de uma doença multifatorial, a qual é necessária para sua ocorrência a interação de fatores relacionados ao animal, patógeno e o ambiente (LEBLANK et al., 2006). Apresenta-se de duas formas, subclínica ou clínica. A primeira exige exames complementares para sua percepção e a segunda possui sinais evidentes de sua manifestação. Geralmente a mastite clínica ocorre de maneira hiperaguda ou aguda, nas primeiras semanas pós-parto, caracterizada pela difícil resolução terapêutica, nos casos com comprometimento sistêmico e morte ocasional de animais por toxemia (RIBEIRO et al., 2006).

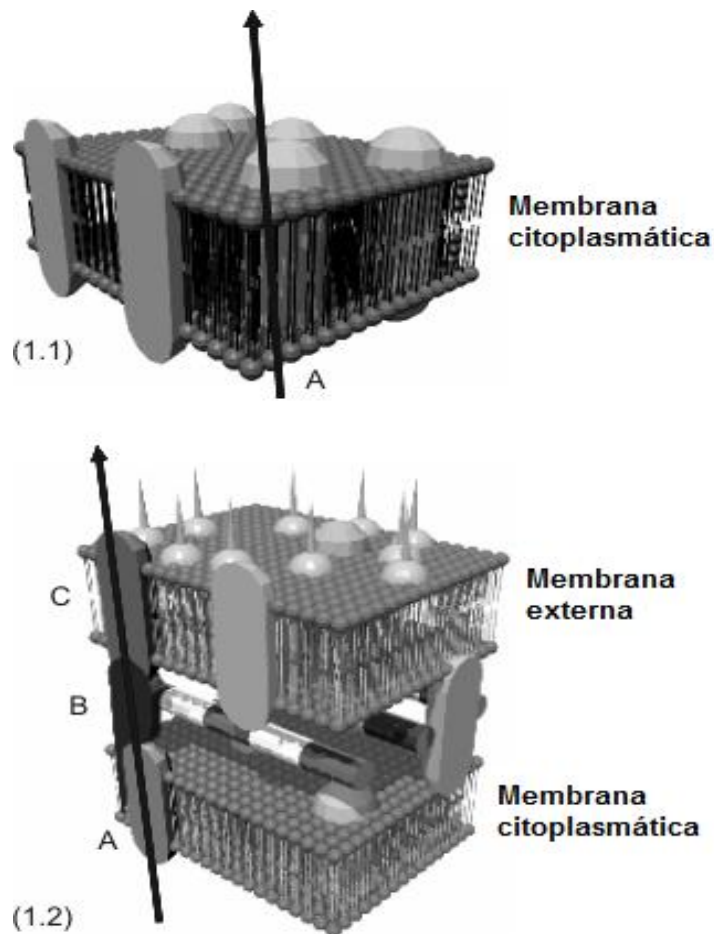
Epidemiologicamente, a mastite divide-se em mastite contagiosa e ambiental. A transmissão dos patógenos da mastite contagiosa é direta, o reservatório é representado pelo próprio animal, mais especificamente a glândula mamária. Por outro lado a mastite ambiental caracteriza-se pelo fato do reservatório dos agentes etiológicos estarem localizados no próprio ambiente de criação dos animais, como a cama, os equipamentos de ordenha, a água, o solo do curral, entre outros (ANDREWS et al., 2008). O patógeno mais importante deste tipo de mastite é *Escherichia coli*, esta invade a glândula mamária através do canal do teto, por meio do contato dos tetos com o ambiente contaminado. Após a invasão, o agente pode se multiplicar ou permanecer em latência, sem causar sinais clínicos, por dias (BLUM et al.; 2008; BRADLEY e GREEN, 2009). *E. coli* é uma bactéria Gram-negativa, aeróbia facultativa, bacilo não formador de esporos, tem origem no trato intestinal de humanos e animais, a bactéria pode ser encontrada no estrume que contamina as camas, o solo e a água (HAMELIN et al., 2007; BIGGS, 2009).

O conhecimento dos fatores de risco é de extrema importância na construção de programas de controle para esta enfermidade. Estes fatores podem ser individuais ou ambientais, nos fatores individuais, estão incluídos os mecanismos de defesa do animal e a anatomia da glândula mamária e nos ambientais, os quais estão relacionados o tipo de clima da região, limpeza das instalações, alimentação e virulência dos patógenos (WHIST et al., 2006). O controle da mastite tem importância, pois é reconhecida mundialmente como uma doença com altos custos econômicos e de maior prevalência que afeta os bovinos leiteiros (GERLACH,

2009). A doença causa grandes perdas econômicas no setor lácteo que se estima em ordem de 35 bilhões de dólares anuais em todo o mundo (HUIJPS et al., 2009). Estas perdas são ocasionadas pela redução da produção; comprometimento da qualidade do leite e derivados em decorrência da alteração dos seus componentes nutricionais; perda parcial ou total da capacidade secretória da glândula mamária; ou mesmo pelo abate de animais (COSTA, 2009; PYORALA e TAMPONEM, 2009). Além destes prejuízos, há ainda um risco potencial à saúde pública, visto que, a disseminação de toxinas e patógenos causadores de zoonoses, via leite e derivados, é um risco, principalmente em nichos de mercado de produtos lácteos não pasteurizados, comércio de leite informal ou durante falhas no processo de pasteurização (ALTALHI et al., 2009).

Os programas de controle atuais desta enfermidade baseiam-se na higiene da ordenha, no tratamento à base de antimicrobianos e no abate de animais cronicamente infectados. A distribuição do agente antimicrobiano no tecido mamário pode ser afetada por mudanças fisiopatológicas da glândula mamária como, por exemplo, necrose e isquemia, impedindo que o antimicrobiano chegue ao local de atuação ou chegue a concentrações subinibitórias (BENGTSSON et al., 2009). Em geral, os testes utilizados para verificar a sensibilidade a antimicrobianos se baseiam no antibiograma pela técnica de difusão de discos e na avaliação da concentração mínima inibitória (CIM) (STEENEVELD et al., 2011).

Nos últimos anos casos de mastite ambiental vem aumentando em muitos países, geralmente em rebanhos onde houve sucesso no controle na mastite contagiosa (OLIVER et al., 2011). Este fato pode estar relacionado a falhas na terapia, resultando em infecções persistentes na glândula mamária, tanto no período de lactação quanto no seco (RIBEIRO et al., 2006; BIGGS, 2009). Estas falhas são atribuídas a diversos fatores entre eles o uso incorreto de antimicrobianos, presença de biofilmes na superfície do tecido da glândula mamária infectada, e sistemas de efluxo multidrogas (MDR) das bactérias, os quais tem a capacidade de expulsar antimicrobianos de todas as classes, reduzindo as concentrações da droga dentro da célula como mostra a Figura 1. Além de expulsar substâncias tóxicas, como metais pesados, antissépticos e quimioterápicos (LEE et al., 2000; WEBBER e PIDDOCK, 2003). Estudos indicam que esses sistemas interferem na entrada de nutrientes a célula bacteriana, manutenção da homeostase, mediação da adesão e na adaptação das bactérias as células do hospedeiro, os quais são importantes fatores de virulência. (PIDDOCK, 2006; RICCI e PIDDOCK, 2009).



Fonte MOREIRA et al., (2004)

Figura 1- Representação diagramática da membrana citoplasmática e membrana externa dos sistemas de efluxo multidrogas em bactérias Gram-positivas (1.1) e bactérias Gram-negativas (1.2). Proteína de membrana citoplasmática (A) proteína de fusão de membrana (B) e proteína de membrana externa (C). No (1.2) as proteínas A, B, e C constituem o sistema tripartite que transporta drogas através da membrana citoplasmática até a membrana externa em bactérias Gram-negativas. Nas bactérias Gram-positivas (1.1) apenas uma proteína é necessária (A) no transporte da droga. As setas indicam o efluxo da droga.

O sistema de efluxo multidrogas (MDR) foi identificado primeiramente ao se analisar o mecanismo pelo qual as células humanas cancerosas se tornavam resistentes a agentes quimioterápicos, sendo que este sistema de transporte diminuiu a captação e aumenta o efluxo de drogas anticâncer (GOTTESMAN et al., 1995). Nos Trabalhos realizados por DANO (1973) e

JULIANO e LING (1976), com células resistentes do tumor ascítico de Ehrlich e com células mutantes de ovário de hamster, respectivamente, os pesquisadores identificaram tanto alteração fisiológica (acúmulo reduzido da droga devido ao efluxo) quanto mudança bioquímica (aumento da quantidade de uma proteína de superfície celular, P-glicoproteína). Esta é uma proteína que media a resistência a ampla variedade de drogas citotóxicas via efluxo dependente de ATP (GOTTESMAN et al., 1995), em células multirresistentes selecionadas com colchicina. A colchicina é uma droga antimicrobiana que inibe a formação do microtúbulo por se ligar á proteína tubulina (ALBERTS et al., 1994).

Em procariotos, a primeira evidência da presença dos sistemas de efluxo multidrogas foi mostrada por TENNET et al. (1989); ROUCH et al. (1990); LITTLEJOHN et al. (1991) e LITTLEJOHN et al. (1992), em isolados de *Staphylococcus* resistentes a compostos quaternários de amônia. Em bactérias Gram-negativas estes sistemas são formados por três proteínas, uma proteína de membrana plasmática, uma proteína de fusão de membrana (MFP) e um fator de membrana externa (OMF) (LEWIS, 1994; NIKAIDO, 1996). Alguns sistemas excluem, seletivamente, antimicrobianos específicos, sistema de efluxo droga específica, enquanto outros são referidos como sistemas de efluxo de resistência multidrogas (MDR), pois expulsam drogas de estruturas químicas diferentes (LEE et al., 2000). Os genes que codificam sistemas MDR, normalmente, são constituintes dos cromossomos bacterianos e os que codificam sistemas de drogas específicas estão localizados, geralmente, em plasmídeos transmissíveis ou em transposons, (LEE et al., 2000; MOREIRA, et al., 2004), o que facilita a sua propagação. Assim a bactéria pode sobreviver em ambientes hostis, como, por exemplo, na presença de antimicrobianos e desinfetantes (POOLE 2005). Análises de sequências do genoma revelam que, em média, sistemas de efluxo constituem pelo menos 10% dos transportadores em várias espécies de bactérias (POOLE, 2007).

Os sistemas de efluxo são caracteristicamente dependentes de energia, podendo utilizar o transporte ativo primário ou secundário. O transporte ativo primário é dependente da energia da hidrólise do ATP e os membros da família ABC são exemplos deste tipo de transporte (PIDDOCK, 2006 a). O transporte ativo secundário é dirigido por uma gradiente eletroquímico transmembrana de prótons ou possivelmente de íons de sódio (PUTMAN et al., 2000), e os sistemas de efluxo das famílias MFS, RND e SMR utilizam este tipo de energia para realizar o

transporte (PIDDOCK, 2006 a ). O Quadro 1 mostra os principais sistemas de efluxo identificados em *E. coli*, pertencentes a diferentes famílias.

Em *E. coli* o AcrAB-TolC é um dos principais sistemas de efluxo tripartite e desempenha um papel importante na produção de resistência a múltiplas drogas. O sistema é composto de uma proteína transportadora ou de membrana plasmática, AcrB, que remove as drogas do citoplasma para o periplasma, onde a proteína de fusão de membrana, AcrA, dirige o transporte inter-membrana da droga através do canal, a proteína tipo porina de membrana externa, TolC, para o ambiente (NIKAIDO, 2009). Esta última proteína pode servir como porina para mais de um sistema de efluxo multidrogas (POS, 2009). VIVEROS et al. (2007) demonstraram que uma maior exposição a concentrações crescentes de tetraciclina em *E. coli*, faz aumentar a expressão de AcrAB-TolC tornando a bactéria cada vez mais resistente aos antimicrobianos. Por outro lado, GERKEN e MISRA (2004) observaram que é possível ligações cruzadas entre AcrA e TolC sem a presença de AcrB, sugerindo que AcrB não é essencial para interações *in vivo* entre TolC-AcrA. O perfil de substratos deste sistema inclui cloranfenicol,  $\beta$ -lactâmicos, fluoroquinolonas, tetraciclinas, rifampicina, novobiocina, ácido fusídico, ácido nalidíxico, brometo de etídio, acriflavina, sais biliares, ácidos graxos de cadeia curta, detergente dodecil sulfato de sódio (SDS), tritón-X 100 e triclosan (Quadro 1) (SANCHEZ et al., 2007; NIKAIDO e TAKATSUKA, 2009; TAKATSUKA et al., 2010). Em *E. coli*, além do sistema AcrAB, o AcrEF também é importante no aspecto clínico de resistência a antimicrobianos. A homologia das seqüências de aminoácidos e o perfil de substratos destes sistemas são semelhantes (NISHINO e YAMAGUCHI, 2004). HIRAKAWA et al. (2008) induziram uma super-expressão do sistema AcrEF e observaram uma diminuição na expressão do sistema AcrAB, concluindo que quando há uma super-expressão de um sistema o outro diminui. O sistema de efluxo EmrAB confere resistência a antimicrobianos e desacopladores, ambos hidrofóbicos (KORONAKIS et al., 2004; BAMBEKE et al., 2006). Este sistema pode estar associado a uma porina de membrana externa como a TolC, formando um sistema tripartite (GRNOVIC et al., 2002).

Quadro 1 - Principais sistemas de efluxo multidrogas em *Escherichia coli*

Sistema de efluxo	Família	Substratos	Referência
MacAB-TolC	ABC	Macrolídeos	KOBAYASHI et al., 2001
MdfA	MFS	Cloranfenicol	POOLE, 2005
Flo, FloR, pp-Flo		Cloranfenicol e Florfenicol	SCHWARZ et al., 2004
MdfA		Eritromicina tetraciclina Fluoroquinolonas	POOLE, 2005 PIDDOCK et al., 2006 a
Bcr		Bafilomicina e sulfatiazol Tetraciclina	BENTLEY et al., 1993; BAMBEKE et al., 2006
EmrAB-TolC		Acido nalidíxico, tiolactomicina, Flouroquinolonas, tetraciclina, testosterona, carbonil cianeto m clorofenilhidrazona (CCCP)	KORONAKIS et al., 2004; BAMBEKE et al., 2006; ELKINS, 2007
EmrKY		Tetraciclina	PUTMAN et al., 2000
YebQ		Trimetoprim	BAMBEKE et al., 2006
YdhE		MATE	Corantes, fluoroquinolonas hidrofílicas, aminoglicósídeos, Trimetoprim e Cloranfenicol
EmrE	SMR	Proflavina, safranina O, brometo de etidio, metil viologen, eritromicina, tetraciclina e sulfadiazina	SULAVIK et al., 2001; BAMBEKE et al., 2006
AcrAB-TolC	RND	Cloranfenicol, macrólídeos, ácido nalidíxico, β-lactâmicos, cetolídeos, flouroquinolonas, brometo de etídeo, acriflavina, sais biliares, ácidos grasos de cadeia curta, detergente dodecil sulfato de sódio, tritón-X100, triclosan	NIKAIDO e TAKATSUKA, 2009; TAKATSUKA et al., 2010
AcrAD-TolC		Aminoglicosídeos	PIDDOCK et al., 2006A ; BAMBEKE et al., 2006
AcrEF-TolC		Flouroquinolonas, β-lactâmicos, macrólídeos, tetraciclina e trimetoprim	PIDDOCK et al., 2006B; BAMBEKE et al., 2006
MdtABC		Desoxicolato, sais biliares, novobiocina e norfloxacina	BARANOVA e NIKAIDO, 2002; NAGAKUBO et al., 2002
YegN		Flouroquinolonas	BAMBEKE et al., 2006
YhiUV		Desoxicolato, cristal violeta, bemzalcônio, detergente dodecil sulfato de sódio.	BOHNERT et al., 2007

A inibição desses sistemas de efluxo em bactérias, mediante o uso de inibidores de sistemas de efluxo (EPIs) pode ser uma alternativa promissora no tratamento da mastite. Os EPIs ajudam a aumentar a concentração intracelular de antimicrobianos que são expelidos por sistemas de efluxo multidrogas (THORARENSEN, 2001; LOMOVSKAYA e BOSTIAN, 2006). Assim, restabelecendo a sensibilidade às drogas de cepas clínicas resistentes, obtendo êxito no tratamento da doença.

Classes estruturalmente diferentes de EPIs foram descritos e testados em bactérias (Quadro 2), com diferentes mecanismos de ação entre eles, desacoplador da força próton motora, aumento da permeabilidade da membrana externa.

Quadro 2 - Inibidores dos sistemas de efluxo multidrogas em *Escherichia coli*

<b>Tipo</b>	<b>Substrato de efluxo</b>	<b>Referencia</b>
Fenotiazina	Tetraciclinas	VIVEROS et al., 2008 a; VIVEROS et al., 2008 b
Fenilpiperidina	Norfloxacina, tetraciclinas, brometo de etídio	KAATZ et al., 2003
Análogos de tetraciclina	Tetraciclinas	MARK e LEVY1999
Análogos de flouroquinolona	Flouroquinolonas, macrolidos	MAHAMOUD et al., 2007
Fenilalanina arginyl $\beta$ naftilamida (PA $\beta$ N)	Quinolonas, cloranfenicol macrolides, ampicilina, carbenicilina, tetraciclina	TAKATSUKA, 2010; MATSUMOTO et al., 2011
Arilpiperidine	Linezolida	THORARENSEN et al.,2001
1-(1-Naphthylmethyl)-piperazine (NMP)	Fluoroquinolonas, tetraciclinas,macrólideos, linezolida, cloranfenicol	SHUMACHER et al., 2006; TAKATSUKA, 2010
Carbonil cianeto m-clorofenilhidrazona	Cefaclor, furazolidona, nitrofurantóina, espiramicina, sulfametoxazol/trimetoprim, tetraciclina	MOREIRA et al., 2009

Entre os EPIs incluem-se compostos naturais e análogos de substratos de antimicrobianos e novas moléculas químicas (VIVEROS et al., 2007; VIVEROS et al., 2008 a; MATSUMOTO et al., 2011), como: indóis, uréias, amidas aromáticas, ácido alquilamino, peptidomiméticos, e alcaloides de plantas (BAMBEKE et al., 2006). Os alcaloides de plantas mais utilizados são: o CCCP, o dinitrofenol (DNP), a reserpina e o fenilalanina arginyl  $\beta$  naftilamida (PA $\beta$ N), (DENNY et al., 2005; MOREIRA et al., 2008; MATSUMOTO et al., 2011).

A atividade do inibidor PA $\beta$ N (Quadro 2), foi identificada a partir de estudos dos mecanismos de efluxo em cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes aos antimicrobianos (LOMOVSKAYA, 2001). Este composto é um peptidomimético, que apresenta propriedades de EPI com um amplo espectro para vários sistemas de efluxo em diferentes bactérias Gram-negativas, entre eles o sistema AcrAB em *E. coli* (VIVEROS et al., 2007; VIVEROS et al., 2008 a; MATSUMOTO et al., 2011). Este EPI possui um mecanismo de ação, de natureza competitiva, com os antimicrobianos que enquanto o sistema de efluxo bombeia PA $\beta$ N para fora da célula, o antimicrobiano permanece no interior da célula, chegando a sua concentração necessária para exercer sua atividade sobre o alvo na bactéria. Assim o efeito final de PA $\beta$ N é reduzir a resistência ou reverter a sensibilidade bacteriana. Porém, o PA $\beta$ N pode competir com alguns antimicrobianos e com outros não, ocorrendo uma relação diferencial entre o PA $\beta$ N e o antimicrobiano baseada na natureza do sistema de efluxo e no sítio de ligação do antimicrobiano ao sistema (MURAKAMI et al., 2006).

A partir de estudos em cepas de *E. coli* resistentes aos antimicrobianos, desenvolveu-se a família dos arilpiperazínicos, com uma grande capacidade de reverter a sensibilidade a múltiplas drogas, de células que superexpressam sistemas de efluxo da família RND (THORARENSEN, 2001). Entre os arilpiperazínicos se encontra o 1-(1-Naphthylmethyl)-piperazine (NMP), atua por competição com os antimicrobianos (MURAKAMI et al., 2006), com uma concentração mínima eficaz e uma capacidade dose-dependente para aumentar a concentração intracelular de diversos substratos, tais como fluoroquinolonas, cloranfenicol, corantes fluorescentes e linezolida. NMP foi testado em espécies bacterianas diferentes, incluindo *Acinetobacter baumannii*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, em isolados clínicos (PANNEK et al., 2006; SHUMACHER et al., 2006; TAKATSUKA, 2010).

VIVEROS et al. (2007) induziram um alto nível de resistência à tetraciclina em *Escherichia coli* K-12 suscetível, por um aumento gradual, da exposição ao antimicrobiano e esta resistência foi revertida mediante a transferência da bactéria ao meio livre de drogas ou pelo uso de PA $\beta$ N. Estudos tem demonstrado que este EPI é indicado para restaurar a atividade de levofloxacina, fluoroquinolonas, ampicilina, rifampicina e outras classes de antimicrobianos, incluindo cloranfenicol e macrolídeos (LOMOVSKAYA e BOSTIAN, 2006; TAKATSUKA, 2010; MATSUMOTO et al., 2011).

No trabalho realizado por KERN et al (2006) com isolados de *E. coli* comparando diferentes inibidores, entre eles o NMP e o PA $\beta$ N, os autores observaram que na presença destes inibidores nas concentrações de 50 mg/L e 100 mg/L respectivamente, o PA $\beta$ N diminuiu até 16 vezes a CIM de oxacilina, rifampicina, cloranfenicol e claritromicina, naqueles isolados que super expressaram *acrAB* e *acrEF*, enquanto o NMP diminuiu em somente quatro vezes. Estes dois inibidores tem sido testados também em outras bactérias entre elas *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* e *P. aeruginosa*, para restaurar a atividade de diferentes antimicrobianos como ciprofloxacina, eritromicina, rifampicina, tetraciclina e enrofloxacina (LOMOVSKAYA et al., 2001; HANNULA e HÄNNINEN, 2008; NIKAIDO e TAKATSUKA, 2009).

Os EPIs além de servir como adjuvantes dos antimicrobianos para combater a resistência nas bactérias, são utilizados como uma ferramenta na detecção de sistemas de efluxo, baseado na comparação da CIM para o antimicrobiano na ausência e presença do EPIs (LOMOVSKAYA et al., 2001; DENNY et al., 2005). Uma limitação para combinação de determinados EPIs com antimicrobianos é que eles precisam ser usados em concentrações significativamente maiores como inibidores em comparação com a concentração utilizada para exercer seus efeitos farmacológicos mais conhecidos (atividade sobre o sistema nervoso central, anti-hipertensivos, inibidores da bomba de prótons usados no tratamento de úlceras gastrointestinais), podendo ser tóxico para o homem e animais (BAMBEKE et al., 2006). Entretanto o PA $\beta$ N e o NMP são inibidores específicos dos sistemas de efluxo presentes em bactérias e não interagem com transportadores das células eucariotas, favorecendo sua ação em células bacterianas e minimizando os efeitos colaterais em células eucariotas (BAMBEKE et al., 2006).

Em razão da grande importância da mastite no âmbito social, econômico e de saúde pública, e do sistema de efluxo multidrogas, como um mecanismo de resistência emergente em

bactérias, o presente estudo teve como objetivo geral detectar a presença de três sistemas de efluxo multidrogas em *E. coli* isoladas de leite provenientes de bovinos com mastite e estudar a efetividade *in vitro* de dois inibidores destes sistemas, frente aos principais antimicrobianos usados na terapia desta doença.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Detectar a presença de três sistemas de efluxo multidrogas AcrAB, AcrEF, EmrAB, em *Escherichia coli* isolados de leite provenientes de bovinos com mastite e estudar a efetividade *in vitro* de dois inibidores destes sistemas, frente a antimicrobianos usados no tratamento da doença.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Identificar o perfil de resistência e de multirresistencia de *E. coli* aos principais antimicrobianos utilizados no tratamento de mastite bovina.
- Identificar genes que codificam para dois componentes, proteína de membrana citoplasmática e de fusão de membrana, de três sistemas de efluxo multidrogas: AcrAB, AcrEF e EmrAB utilizando a técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR).
- Testar dois inibidores destes sistemas de efluxo, Phe-Arg- $\beta$ -naphthylamide (PA $\beta$ N) e 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine (NMP), determinando as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) dos antimicrobianos antes e após a adição destes inibidores.
- Quantificar a expressão relativa dos genes relacionados aos sistemas de efluxo multidrogas estudados, pela técnica de PCR em Tempo Real.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Bactérias**

Neste trabalho foram usados 27 isolados de *Escherichia coli* obtidos de leite provenientes de bovinos com mastite clínica. Esta bacterioteca pertence à ao Laboratório de Doenças Bacterianas (LDBAC) do Departamento de Veterinária (DVT) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), MG e a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA - Gado de Leite, Unidade Juz de Fora, MG.

Os experimentos foram realizados no LDBAC, no Laboratório de Biologia Molecular, ambos localizados no DVT, e no Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores localizado no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), todos pertencentes ao DVT, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG.

Os isolados foram armazenados em microtubos contendo caldo infusão de Cérebro e Coração BHI (Oxoid) acrescidos de 20% de glicerol e estocados a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **4.2 Perfil de resistência aos antimicrobianos**

O antibiograma foi realizado seguindo as normas preconizadas pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008). Os isolados de *E. coli* foram reativados em caldo Mueller Hinton e incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$ , durante 16-18 horas. As culturas foram diluídas em caldo Muller Hinton, para  $10^5$  UFC/mL, ao atingirem densidade ótica (DO) líquida de 0,3 em um comprimento de onda de 550 nm. Nesta D.O., as culturas estão a  $10^8$  UFC/mL, turbidez equivalente a 0.5 na escala de MacFarland. Uma vez obtida esta concentração, cada duplicata foi semeada com o auxílio de um swab estéril, em placas contendo 4 mm agar Muller Hinton. Os discos de antimicrobianos foram distribuídos sobre as placas, com auxílio de uma pinça flambada e resfriada, de forma equidistante e posteriormente as placas foram incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$ , durante 16-18 horas. Após esse período foi realizada a leitura utilizando uma régua milimetrada e os diâmetros da media dos halos de inibição foram interpretados de acordo com os critérios preconizados pelo CLSI (2008). Para o controle do teste foi utilizada a linhagem de referencia

*Escherichia coli* ATCC 25922. Os antimicrobianos utilizados foram os de uso frequente no tratamento da mastite clínica: ampicilina (Amp - 10 µg), sulfametoxazol/trimetoprim (S/T - 25 µg), gentamicina (Gen - 10 µg), ceftiufur (Cef - 30 µg), cefalaxina (Cen - 30 µg), enrofloxacin (Enr - 5 µg), (OXOID).

#### **4.3 Detecção dos sistemas de efluxo multidrogas**

Foi utilizada a técnica de PCR de colônia para detectar os genes dos sistemas de efluxo multidrogas, AcrAB, AcrEF e EmrAB. Os oligonucleotídeos foram sintetizados pela Integrated DNA Technologies, São Paulo.

Os isolados foram estriados em placa de Petri contendo agar BHI (Oxoid) e incubadas a 37 °C, durante 16-18 horas para a obtenção de colônias. As reações de amplificação foram conduzidas, para cada isolado, em 25µL da mistura de reação contendo colônias de bactéria, 12,5 µL do Mix GoTaq Green Master Mix, 2X (Promega); 20 pmol de cada oligonucleotídeo; 10,5 µL de água ultrapura.

A amplificação do DNA foi realizada segundo Viveiros et al (2007) em um termociclador (Nyx Technik) com desnaturação inicial de 95 °C, por 15 minutos, seguida de 94°C, por um minuto; anelamento a 51°C, por um minuto; e extensão a 72°C, durante um minuto. Após completar 35 ciclos, as amostras foram incubadas por 5 minutos, a 72°C. No caso da amplificação do fragmento de 699 pb, a temperatura de anelamento foi 57°C.

A mistura de reação que não continha colônias bacteriana foi usada como controle negativo em cada experimento. Para todas as reações foi incluído como controle positivo, *E. coli* AG100, cepa doada gentilmente por Dr. Levy, e Dra Murry, Tufts University, EUA.

Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% preparado em tampão TBE 0.5X. Os géis foram corados com GelRed (Biotim). O tamanho dos fragmentos amplificados foi estimado por comparação com o marcador de peso molecular Ladder 100bp (Invitrogen).

#### **4.4 Determinação da concentração inibitória mínima - CIM**

Para a determinação da CIM foi seguida a metodologia de MOREIRA et al (2005) e (CLSI, 2008). Para isso, 230 µL de cultura de cada isolado, diluída em caldo Muller Hinton a  $1,0 \times 10^5$  UFC/ mL, foram adicionadas aos orifícios de placas de microtitulação (Nunc-Immuno plates, Dinamarca), juntamente com 70 µl das soluções dos antimicrobianos, em diferentes concentrações, em um total de 300 uL por orifício da placa.

O caldo Muller Hinton no volume de 300 µL foi utilizado como controle de esterilidade e para o controle positivo utilizou-se 230 µl das culturas diluídas juntamente com 70 µL de água ultra pura.

O crescimento dos isolados foi acompanhado em um aparelho leitor de ELISA (Titertek multiskan®, Plus-MKII) e as leituras das D.O550 foram feitas em intervalos preestabelecidos até a estabilização dos valores. A curva de crescimento foi construída com a média estabelecida das triplicatas e plotada em programa Excel 2007. A CIM foi estabelecida, como a menor concentração do antimicrobiano que impediu o crescimento bacteriano até duas horas após o tempo correspondente ao início da fase estacionária do controle positivo. Como controle do teste foi utilizado *E. coli* ATCC 25922.

#### **4.5 Teste da efetividade de inibidores dos sistemas de efluxo multidrogas in vitro**

As concentrações utilizadas dos inibidores foram baseadas no trabalho realizado por KERN et al (2006), os quais empregaram a concentrações de 25 mg/L e 100 mg/L de PAβN e NMP.

As CIM dos antimicrobianos foram determinadas com adição destes inibidores utilizando a mesma metodologia citada acima (4.4), porem com: 230 µL de cultura de cada isolado, 40 µl das soluções dos antimicrobianos, em diferentes concentrações e 30 µl de cada inibidor, em um total de 300 uL por orifício da placa. O experimento foi realizado em triplicata.

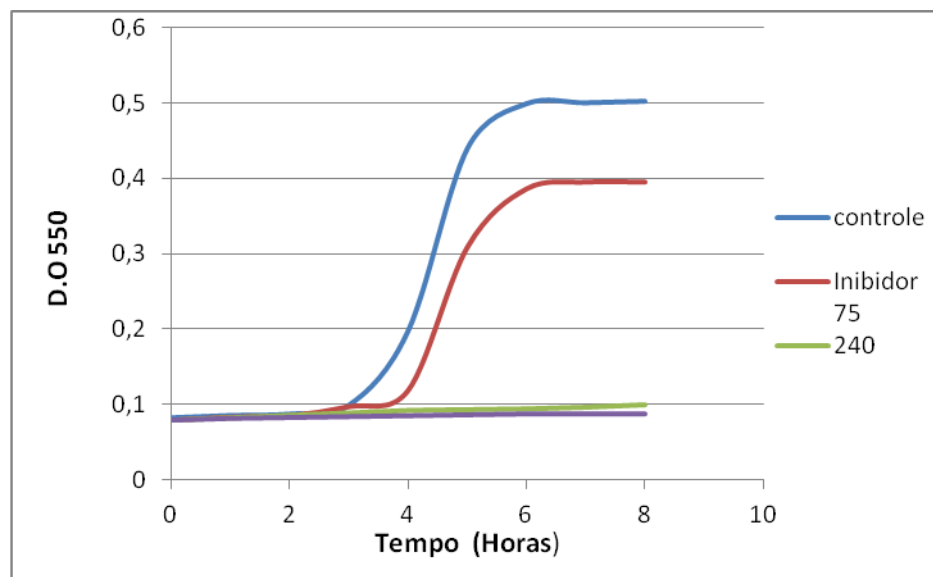


Figura 2 - Efeito dos inibidores sobre o crescimento de *Escherichia coli*, em caldo Muller Hinton. A concentração do inibidor foi de 75 µg/mL.

#### 4.6 Quantificação da expressão relativa dos genes dos sistemas de efluxo multidrogas

A expressão relativa dos diferentes genes dos sistemas de efluxo multidrogas estudados, *acrA*, *acrB*, *acrE*, *acrF*, *emrA*, *emrB*, dos quatro isolados resistentes, *E. coli* 13, 21 24 e 27 foi quantificada na presença dos tratamentos mostrados no Quadro 3, usando a técnica de PCR em Tempo Real.

Quadro 3- Tratamentos utilizados na quantificação relativa dos diferentes genes dos sistemas de efluxo multidrogas estudados.

Tratamentos
<b>Sem tratamento</b> (cultura bacteriana + meio de crescimento).
<b>Ampicilina</b> (cultura bacteriana + meio de crescimento + ampicilina (10 µg/mL).
<b>Ampicilina + PAβN</b> (cultura bacteriana + meio de crescimento + ampicilina (10 µg/mL) + PAβN (50µg/mL)).
<b>Ampicilina + NMP</b> (cultura bacteriana + meio de crescimento + ampicilina (10 µg/mL) + NMP (75 µg/mL)).
<b>Sulfametoxazol/trimetoprim</b> (cultura bacteriana + meio de crescimento + sulfametoxazol/trimetoprim (25 µg/mL)).
<b>Sulfametoxazol/trimetoprim + PAβN</b> (cultura bacteriana + meio de crescimento + sulfametoxazol/trimetoprim (25 µg/mL) + PAβN (50µg/mL)).
<b>Sulfametoxazol/trimetoprim + NMP</b> (cultura bacteriana + meio de crescimento + sulfametoxazol/trimetoprim (25 µg/mL) + NMP (75 µg/mL)).

#### **4.6.1 Extração de RNA total**

A extração de RNA total dos isolados foi realizada como reagente Trizol® (*Life Technologies*), de acordo com as especificações do fabricante. Os microtubos com 1 µL de cada amostra, foram centrifugados a 10000 g durante 5 minutos a 4°C. Logo foram adicionados 750 µL de Trizol. Os microtubos foram mantidos em temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, foram acrescentados 150 µL de clorofórmio e às amostras que foram homogeneizadas em vórtex, mantidas à temperatura ambiente por 2 minutos. Em seguida foram centrifugadas por 15 minutos a 14000 g a 4°C. Recuperou-se o sobrenadante (aproximadamente 300 µL) em outros microtubos estéreis e foram adicionados 380 µL de isopropanol, sendo os mesmos mantidos em temperatura ambiente durante 10 minutos. Concluído este período, as amostras foram centrifugadas a 12000 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado adicionado de 750 µL de etanol 75% (v/v) gelado. Em seguida, os microtubos foram centrifugados a 10000 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi eliminado, deixando o precipitado secar em temperatura ambiente por 5 minutos e posteriormente foi adicionado de 25 µL de *DEPC-treated Water* (*Invitrogen*). Por ultimo, os microtubos foram incubados 37°C durante 10 minutos. Após a extração, o RNA foi quantificado no Qubit® 2.0 Fluorometer e analisado em gel de agarose a 1,5%.

#### **4.6.2 Síntese de cDNA**

A síntese de cDNA foi realizada utilizando-se a enzima M-MLV Reverse Transcriptase (*Invitrogen*), de acordo com as recomendações do fabricante. Em microtubos estéreis de 0,2 mL distribuíram-se 1 µL de RNA total (100 ng) de cada isolado, 100 ng de primer randômico, 1 µL da mistura de desoxinucleotídeos (10 mM de cada um: dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 12 µL de água destilada estéril, a mistura foi incubada a 65°C por 5 minutos e em seguida, mantidos no gelo por 1 minuto. A seguir foram adicionados 4 µL do tampão First Strand 5X, 2 µL de DTT 0,1 mM, 1µL *RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor* (40 units/µl) e as amostras foram incubadas a 37°C por 2 minutos. Posteriormente, foram adicionadas 200 U da enzima *M-MLV Reverse Transcriptase*, incubando as amostras a 25°C por 10 minutos. Por ultimo, as

amostras foram incubadas a 37°C por 50 minutos e a reação foi inativa por aquecimento a 70°C por 15 minutos.

#### 4.6.3 Reação de PCR em Tempo Real

As reações foram realizadas em placas com 48 orifícios em duplicatas, no equipamento Eco™ Real-Time PCR system e foi utilizado o kit *Maxima® SYBR® Green/ROX qPCR Master Mix* (Fermentas), segundo o manual de instrução do fabricante. Os pares de oligonucleotídeos utilizados e suas respectivas concentrações seguem no Quadro 4.

Quadro 4- Oligonucleotídeos utilizados na técnica de PCR Tempo Real Quantitativa para os genes que codificam os sistemas de efluxo multidrogas estudados.

Genes	Oligonucleotídeos seqüência (5'-3')	Concentração (nM)	Tamanho (pb)	Referência
<i>acrA</i>	CTTAGCCCTAACAGGATGG TTGAAATTACGCTTCAGGAT	1400	189	(Viveiros et al.2007)
<i>acrB</i>	CGTACACAGAAAGTGCTCA CGCTTCAACTTTGTTTTCTT	1000	183	(Viveiros et al.2007)
<i>acrE</i>	GCCCTCCTTTATTCTGATCT GGCTATACGATAAGCATTG	1200	166	(Viveiros et al.2007)
<i>acrF</i>	TAGCAATTTCCCTTTGTGGTT CCTTTACCCTCTTTCTCCAT	1600	247	(Viveiros et al.2007)
<i>emrA</i>	CAACCGGTAAAGAAGAGCG GTTATCGGCCCCAGACTTTG	600	40	*
<i>emrB</i>	ATTATGTATGCCGTCTGCTT TTCGCGTAAAGTTAGAGAG	1000	196	(Viveiros et al.2007)
<i>GAPDH</i>	ACTTACGAGCAGATCAAAC AGTTTCACGAAGTTGTCGTT	1000	170	(Viveiros et al.2007)

\* Foi desenhado utilizado o programa DNAMAN version 4.0, Lynnon biosoft 1994-98.

Para a realização do teste foram utilizados 10 µl de *MIX*; 1 µl de cada oligonucleotídeo; 7 µl de água nuclease-free, 1 µl de cDNA (sintetizado como descrito anteriormente) na

concentração de aproximadamente 10 ng/μl, totalizando 20 μl por reação. As condições ótimas foram as seguintes: incubação por 2 minutos a 50 °C, seguida de ativação da polimerase por 10 minutos a 95 °C. Após este pré-tratamento, as amostras foram submetidas a 40 ciclos nas seguintes condições de termo-ciclagem: 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 1 minuto. Ao final, uma etapa adicional de dissociação foi realizada (95 °C por 15 segundos, 55 °C por 15 segundos e 95 °C por 15 segundos) para a geração da curva de melting. A análise desta curva permitiu verificar a especificidade da reação, ou seja, se não havia a presença de bandas inespecíficas e ou dímero de oligonucleotídeos.

PCR em tempo real foi realizado simultaneamente para os genes alvos *acrA*, *acrB*, *acrE*, *acrF*, *emrA*, *emrB* e para o controle endógeno (*GAPDH*). Os resultados dos valores médios de Cts obtidos por duplicata foram utilizados para calcular a expressão gênica relativa dos genes alvos através do método comparativo utilizando a fórmula  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (APPLIED BIOSYSTEMS, 2004).

Na análise dos dados foi utilizado o programa Graphpad Prism, sendo utilizado o teste Anova para a análise de variância e o teste de Bonferroni, para a comparação das médias dos diferentes tratamentos. O nível de significância adotado para os testes foi de 5% ( $P < 0,05$ ).

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1 Perfil de resistência aos antimicrobianos**

Dos 27 isolados analisados, os isolados de *E. coli* 13, 21, 24 e 27 (14,8%) apresentaram resistência a ampicilina e ao sulfametoxazol/ trimetoprim, simultaneamente. Enquanto todos os 27 isolados (100%) foram sensíveis a ceftiofur, gentamicina, enrofloxacina e cefalexina.

Resultados semelhantes foram obtidos por RIBEIRO et al. (2006) em linhagens de *E. coli* isoladas de 80 casos de mastite clínica e 40 de mastite subclínica. Os autores observaram que 20% dos isolados apresentaram resistência a dois ou mais antimicrobianos, entre estes, a ampicilina e a sulfametoxazol/trimetoprim.

RANGEL e MARIN (2009) analisaram a resistência de 231 cepas de *E. coli* a diferentes antimicrobianos indicados na terapia da mastite bovina e entre esses, a ampicilina e a sulfametoxazol/trimetoprim. As cepas apresentaram resistência a diversos antimicrobianos, incluindo ampicilina. Entretanto, os autores observaram sensibilidade ao sulfametoxazol/ trimetoprim divergindo dos nossos dados.

Embora, todos os antimicrobianos testados no trabalho sejam utilizados no tratamento da mastite clínica bovina, o fenótipo de resistência apresentado para ampicilina e sulfametoxazol/trimetoprim somente em quatro isolados indica que os demais antimicrobianos poderiam ser utilizados na terapia da doença nas propriedades onde foram coletadas as amostras. Porém, o uso destes dois antimicrobianos poderá resultar no insucesso do tratamento. Além disso, poderá contribuir na seleção de microrganismos ainda mais resistentes dentro de uma população (MOREIRA et al., 2008).

### **5.2 Sistemas de efluxo multidrogas - PCR**

Os isolados analisados apresentaram diferentes perfis genotípicos relacionados à presença / ausência de genes que codificam sistemas de efluxo multidrogas (Tabela 1). Observa-se que todos os 27 isolados apresentaram pelo menos um sistema de efluxo multidrogas, o que poderia inferir presença de resistência aos antimicrobianos testados, porém, isso não foi observado no perfil fenotípico destes isolados. Apenas 4 isolados de *E. coli* 13, 21, 24 e 27 exibiram perfil de

multirresistência, ampicilina e sulfametoxazol/trimetoprim. A ausência do perfil fenotípico de resistência e a presença de genes que compõem mecanismos de resistência nem sempre estão relacionados. Os genes podem não estar sendo expresso; ou sendo expressos em um nível não detectado pelo teste usado, e durante todo o processo, os produtos podem sofrer alterações que resultam na inativação dos mesmos. A Figura 2 apresenta a porcentagem dos diferentes genes detectados pela PCR em todos os isolados analisados.

Trabalhos realizados por NIKAIDO, (2009) e POS, (2009), reportam que em bactérias Gram-negativas há necessidade de um sistema tripartido para lançar a droga do meio interno para o meio externo. No presente estudo foi analisado a presença de apenas dois componentes desses sistemas, e observou-se em 14 isolados (56%) ausência de alguns genes (Tabela 1) referentes a essas duas proteínas estudadas, a proteína de membrana plasmática e a proteína de fusão de membrana. GERKEN e MISRA (2004) observaram que é possível ligações cruzadas entre AcrA e TolC sem a presença de AcrB, sugerindo que AcrB não é essencial para interações *in vivo* entre TolC-AcrA. Infere-se a existencia de ligações cruzadas também para proteínas pertencentes aos outros sistemas de efluxo pois há necessidade de tres componentes compondo o sistema de elfuxo devido a estrutura da bacteria gram negativa. No presente trabalho, o gene da proteína TolC não foi avaliada, é uma porina que compoe mais de um sistema de efluxo multidrogas em *E. coli* (POS, 2009), A Figura 3 demonstra a amplificação dos genes que compoem os sistemas de efluxo multidrogas estudados de *E. coli* 21, exceto o gene *acrF* que não amplificou.

Tabela 1- Presença de genes de sistemas de efluxo multidrogas em *Escherichia coli* isolados de leite provenientes de bovinos com mastite clínica, detectados pela técnica de PCR.

Isolados	Genes					
	<i>acrA</i>	<i>acrB</i>	<i>acrE</i>	<i>acrF</i>	<i>emrA</i>	<i>emrB</i>
1	-	-	+	+	-	-
2	+	+	+	+	-	-
3	+	+	+	+	-	-
4	-	-	+	+	+	+
5	+	+	+	+	-	+
6	+	+	-	-	-	-
7	+	+	+	+	-	-
8	+	+	+	+	-	-
9	-	-	-	-	+	+
10	+	+	-	-	+	+
11	+	+	+	+	-	-
12	-	+	+	+	-	-
<b>13</b>	+	+	+	+	+	+
14	-	-	-	+	+	+
15	+	+	+	-	-	+
16	+	+	-	+	-	-
17	+	+	+	+	-	-
18	-	+	+	+	+	+
19	+	+	+	+	-	-
20	+	+	-	-	-	-
<b>21</b>	+	+	-	+	-	-
22	-	-	-	-	+	+
23	+	+	+	-	+	-
<b>24</b>	-	-	-	+	+	+
25	+	+	-	+	+	+
26	+	+	+	+	-	+
<b>27</b>	+	-	+	+	+	+

+ : Presença do gene ; — : Ausência do gene; Isolados marcados: Resistentes a ampicilina e sulfametoxazol/trimetoprim.

Os antimicrobianos utilizados neste trabalho são substratos dos sistemas de efluxo analisados (Quadro 1). A enrofloxacin pertence à família das fluoroquinolonas que são substratos dos três sistemas: AcrAB, AcrEF e EmrAB. Os  $\beta$ -lactâmicos, ampicilina, cefalaxina e ceftiufur são substratos dos sistemas efluxo multidrogas AcrAB e AcrEF, enquanto sulfametoxazol/trimetoprim é substrato de AcrEF. Deste modo, esperava-se uma maior porcentagem de resistência nos isolados analisados, porém, apenas quatro isolados (14,8%)

foram resistentes a ampicilina e a sulfametoxazol/trimetoprim, sendo os demais classificados na categoria de sensíveis segundo o CLSI (2008). Existem outros sistemas de efluxo que não foram analisados neste trabalho, nos quais estes antimicrobianos também são substratos (Quadro 1).

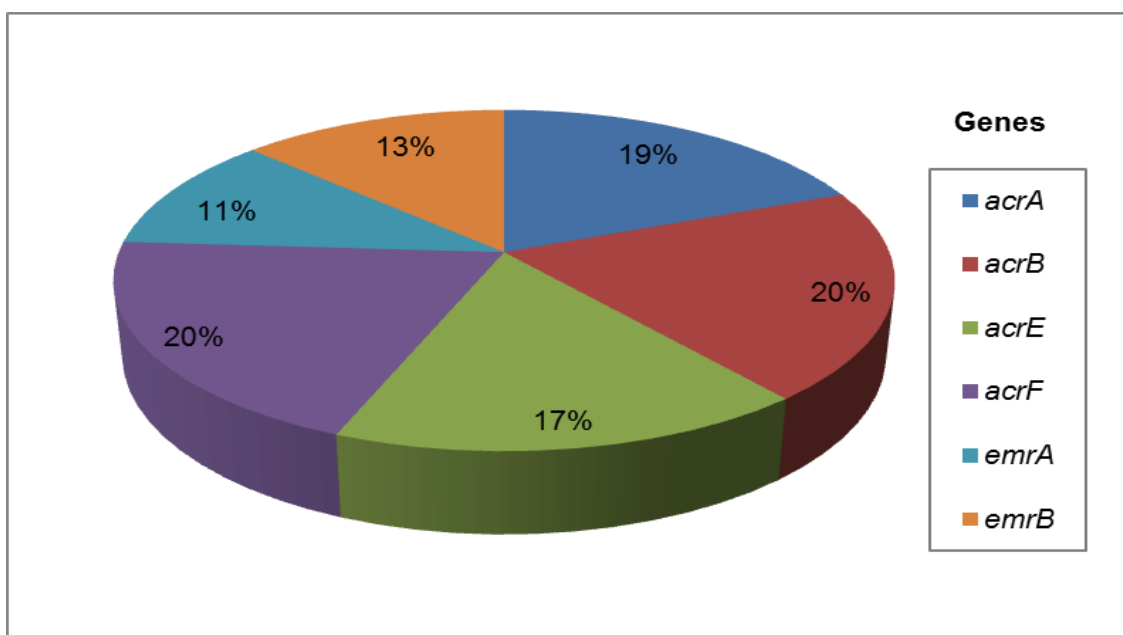


Figura 3- Porcentagem dos genes que codificam os três sistemas de efluxo multidrogas estudados em *Escherichia coli* detectados por PCR.

No estudo realizado por MOREIRA et al. (2009), com isolados de *E. coli* e *Enterobacter cloacae*, multirresistentes, provenientes de frangos clinicamente sadios foi utilizada a técnica de PCR para identificar genes codificadores de AcrA e AcrB. Os autores observaram presença destes genes em todos os isolados de *E. coli* e em dois, de *E. cloacae*. Embora, nossos isolados de *E. coli*, eram provenientes de bovinos com mastite clínica, este trabalho concorda com os nossos achados pois os genes *acrA* e *acrB* também foram observados (Figura 4).

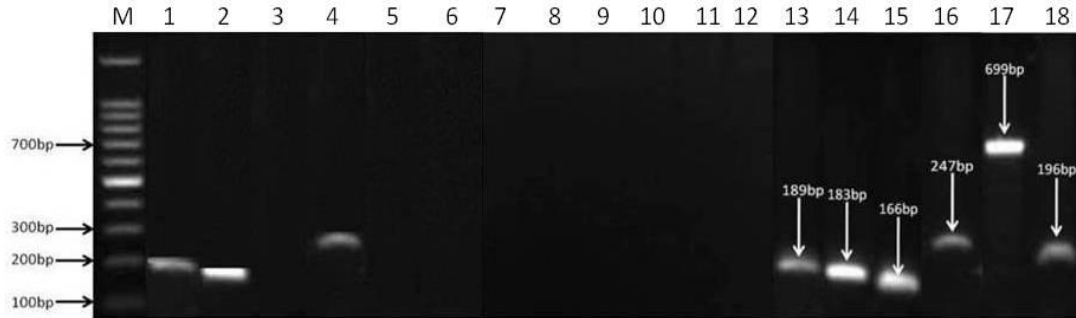


Figura 4- Produtos de PCR de *Escherichia coli* 21 de genes que codificam três sistemas de efluxo multidrogas.

M: Lader; 1: gene *acrA*; 2: gene *acrB*; 3: gene *acrE*; 4: gene *acrF*; 5: gene *emrA*; 6: gene *emrB*; 7: controle negativo gene *acrA*; 8: controle negativo *acrB* 9: controle negativo gene *acrE*; 10: controle negativo gene *acrF*; 11: controle negativo gene *emrA*; 12: controle negativo gene *emrB*; 13: controle positivo gene *acrA*; 14: controle positivo gene *acrB*; 15: controle positivo gene *acrE*; 16: controle positivo *acrF*; 17 :controle positivo gene *emrA*; 18: controle positivo gene *emrB*.

### 5.3 Determinação da concentração inibitória mínima – CIM

As CIMs foram realizadas para todos os 27 isolados utilizando os dois antimicrobianos, ampicilina e sulfametoxazol/trimetoprim, que compõe o perfil de resistência dos quatro isolados de *E. coli*.

Observaram-se valores de CIM para ampicilina variando de 6 µg/mL a 250 µg/mL e para sulfametoxazol/trimetoprim de 12 µg/mL a 1500 µg/mL. Estas diferenças de CIM para um mesmo antimicrobiano sugerem diferentes perfis fenotípicos de resistência nesses isolados, mesmo sendo obtido de uma mesma fonte, leite de animais com mastite. Os maiores valores da CIM observados para ampicilina e sulfametoxazol / trimetoprim foram de 250 µg/mL nos isolados de *E. coli* 13 e 21, seguido da CIM de 110 µg/mL dos isolados 24 e 27 e de 1500 µg/mL, verificada nos isolados de *E. coli* 13, 21, 24 e 27. Entretanto, os 23 isolados restantes apresentaram valores de CIM baixos, variando de 6 µg/mL a 12 µg/mL para ampicilina e de 12 µg/mL a 36 µg/mL para sulfametoxazol/trimetoprim, sendo classificados na categoria de sensíveis, segundo o CLSI (2008) e confirmado pelo resultado do antibiograma.

No estudo realizado por NISHINO et al. (2003), com cepas de *E. coli*, observaram que a CIM para  $\beta$ -lactâmicos (ampicilina, cefuroxima, e cefotaxima) aumentou de 2-8 vezes nas cepas que super expressavam o sistema de efluxo multidrogas AcrAB-TolC. Baseado no relato desses autores pode-se sugerir que as CIM elevadas para ampicilina de *E. coli* 13, 21, 24 e 27, em relação a dos sensíveis, é devido a atividade de sistemas de efluxo. JELLEN-RITTER e KERN (2001), trabalhando com cepas de *E. coli*, verificaram um aumento da CIM para diferentes antimicrobianos entre esses, o trimetoprim, em cepas que expressavam os sistemas de efluxo AcrAB e AcrEF. No caso houve um aumento de até 3 vezes em relação às cepas que não apresentavam esses sistemas.

#### **5.4 Teste da efetividade in vitro de inibidores dos sistemas de efluxo multidrogas**

As concentrações dos inibidores utilizadas, foram com base no estudo realizado por KERN et al (2006). Empregou-se 50  $\mu\text{g/mL}$  de PA $\beta$ N e 75  $\mu\text{g/mL}$  de NMP. Embora seja de conhecimento que estes inibidores atuam por competição com os antimicrobianos (MURAKAMI et al., 2006) e o PA $\beta$ N, além disso, aumenta a permeabilidade da membrana externa (MATSUMOTO et al., 2011). Estas concentrações usadas não alteravam o crescimento dos isolados estudados, pois foram previamente testados pela metodologia de MOREIRA et al (2005). Uma das vantagens destes inibidores é que são específicos dos sistemas de efluxo presentes em bactérias e não interagem com transportadores das células eucariotas, favorecendo sua ação em células bacterianas e minimizando os efeitos colaterais em células eucariotas (BAMBEKE et al., 2006).

Verificou-se a redução das CIM de ampicilina e sulfametoxazol/ trimetoprim, tanto nos isolados resistentes (Tabela 2), quanto nos sensíveis (Tabela 3), na presença de PA $\beta$ N e NMP sugerindo uma atividade de sistemas de efluxo nesses isolados, embora indetectável nos isolados sensíveis pelo método usado, antibiograma. Qualquer alteração nos valores das CIM (valores abaixo da CIM na ausência de inibidores) dos isolados na presença dos inibidores foi considerada resultado positivo pela metodologia adotada.

Tabela 2- Concentração inibitória mínima (CIM) dos antimicrobianos em caldo Muller Hinton, nos isolados de *Escherichia coli* resistentes, na ausência e presença de PAβN e NMP.

Isolados	Antimicrobianos	CIM µg/mL		
		Ausência de inibidores	Presença de inibidores PAβN	NMP
13	Ampicilina	250	230	240
	Sulfametoxazol/trimetoprim	1500	1480	1500
21	Ampicilina	250	220	240
	Sulfametoxazol/trimetoprim	1500	1490	1500
24	Ampicilina	110	90	110
	Sulfametoxazol/trimetoprim	1500	1490	1500
27	Ampicilina	110	90	110
	Sulfametoxazol/trimetoprim	1500	1480	1500

Na presença dos inibidores, observou-se uma maior diminuição dos valores da CIM para ampicilina, em relação ao sulfametoxazol/trimetoprim comparando com as CIM na ausência dos inibidores. Verificou-se uma redução de 14,09% na CIM de ampicilina na presença de PAβN e de 2% com NMP na media dos isolados resistentes (Tabela 2).

A CIM de Sulfametoxazol/trimetoprim com a adição de PAβN diminuiu 1% nos isolados resistentes, enquanto na presença de NMP não se apresentaram variações (Tabela 2). Isto sugere que este inibidor não atua em sinergismo com sulfametoxazol/trimetoprim para inibir sistemas de efluxo multidrogas.

Tabela 3- Concentração inibitória mínima (CIM) dos antimicrobianos em caldo Muller Hinton, de isolados de *Escherichia coli* sensíveis, na ausência e na presença de PA $\beta$ N e NMP.

Isolados	Antimicrobianos	CIM $\mu$ g/mL		
		Ausência de inibidores	Presença de inibidores	
			PA $\beta$ N	NMP
1	Ampicilina	6	2	4
	Sulfametoxazol/trimetoprim	20	14	14
2	Ampicilina	6	2	4
	Sulfametoxazol/trimetoprim	22	16	18
3	Ampicilina	12	4	8
	Sulfametoxazol/trimetoprim	36	30	30
4	Ampicilina	10	4	6
	Sulfametoxazol/trimetoprim	34	28	28
5	Ampicilina	12	4	6
	Sulfametoxazol/trimetoprim	36	28	30
6	Ampicilina	6	2	4
	Sulfametoxazol/trimetoprim	20	10	12
7	Ampicilina	6	2	4
	Sulfametoxazol/trimetoprim	22	8	10
8	Ampicilina	12	4	8
	Sulfametoxazol/trimetoprim	26	14	12
9	Ampicilina	12	2	4
	Sulfametoxazol/trimetoprim	28	10	14
10	Ampicilina	6	2	4
	Sulfametoxazol/trimetoprim	18	10	12
11	Ampicilina	6	2	2
	Sulfametoxazol/trimetoprim	12	6	8
12	Ampicilina	6	2	4
	Sulfametoxazol/trimetoprim	18	12	12
14	Ampicilina	8	2	2
	Sulfametoxazol/trimetoprim	16	10	12
15	Ampicilina	8	2	4
	Sulfametoxazol/trimetoprim	28	12	12
16	Ampicilina	6	2	4
	Sulfametoxazol/trimetoprim	26	8	10
17	Ampicilina	12	4	6
	Sulfametoxazol/trimetoprim	26	10	10
18	Ampicilina	6	2	4
	Sulfametoxazol/trimetoprim	28	12	12
19	Ampicilina	8	2	2
	Sulfametoxazol/trimetoprim	30	22	24
20	Ampicilina	8	2	4
	Sulfametoxazol/trimetoprim	32	24	24
22	Ampicilina	8	2	2
	Sulfametoxazol/trimetoprim	30	20	24
23	Ampicilina	6	2	4
	Sulfametoxazol/trimetoprim	28	10	12
25	Ampicilina	8	2	6
	Sulfametoxazol/trimetoprim	32	18	18
26	Ampicilina	8	2	4
	Sulfametoxazol/trimetoprim	30	18	18

Em média para os isolados sensíveis foi verificada uma redução da CIM para ampicilina de 69,64% na presença de PA $\beta$ N e de 45,22% na presença de NMP, enquanto a CIM de Sulfametoxazol/trimetoprim diminuiu 42,66% com adição de PA $\beta$ N e 37,64% com NMP (Tabela 3).

No trabalho realizado por KERN et al (2006) com *E. coli* comparando diferentes inibidores, entre eles o NMP e o PA $\beta$ N, os autores observaram que na presença desses inibidores nas concentrações de 50 mg/L e 100 mg/L respectivamente, o PA $\beta$ N diminuiu até 16 vezes a CIM de oxacilina, rifampicina, cloranfenicol e claritromicina, naqueles isolados que super expressaram *acrAB* e *acrEF*, enquanto o NMP diminuiu até quatro vezes.

Estes resultados concordam com os do presente estudo devido ao fato que o inibidor PA $\beta$ N teve uma melhor atividade que o NMP nos isolados, frente sulfametoxazol/trimetoprim, enquanto para a ampicilina, ambos apresentaram eficiência, embora na presença de PA $\beta$ N, a diferença dos valores da CIM foi maior (Tabela 2).

Sugere-se uma atividade de sistemas de efluxo multidrogas pelos resultados apresentados (Tabela 2) e pelo antibiograma, mas devem ser mencionados outros mecanismos de resistência relacionados à ampicilina e ao sulfametoxazol/trimetoprim que podem estar presentes nestes isolados. Redução da permeabilidade da membrana externa e produção de  $\beta$ -lactamases AmpC podem atuar em sinergismo com os sistemas de efluxo em *E. coli* conferindo resistência a  $\beta$ -lactâmicos, entre eles a ampicilina (JACOBY, 2009). São também mecanismos de resistência bacteriana às sulfas alteração da permeabilidade da parede celular, aumento da produção enzimática e aumento da produção metabólito essencial (ACAR e MOULIN, 2006)

A diminuição das CIM para ampicilina em relação ao sulfametoxazol/trimetoprim verificada na presença de PA $\beta$ N sugere-se um sinergismo entre o inibidor e as drogas. MURAKAMI et al. (2006), verificaram que o PA $\beta$ N pode competir com alguns antimicrobianos e com outros não, existindo uma relação diferencial entre esse inibidor e o antimicrobiano que é baseada na natureza do sistema de efluxo e no sítio de ligação do antimicrobiano ao sistema.

## 5.5 Quantificação da expressão relativa dos genes dos sistemas de efluxo multidrogas

Foram analisados em conjunto os quatro isolados que apresentaram resistência no antibiograma, para comparar a expressão relativa dos genes *acrA*, *acrB*, *acrE*, *acrF*, *emrA* e *emrB* em relação aos diferentes tratamentos (Quadro 4).

Nos tratamentos mostrados nas figuras 5, 6 e 7A, não se observaram diferença estatística significativa entre os genes analisados, enquanto os tratamentos mostrados nas figuras 7B e 7C, o gene *emrA* apresentou diferença estatística significativa em relação aos demais genes analisados, com exceção ao *emrB*, e na Figura 6C, em relação a todos os genes.

Embora não houve diferença estatística significativa, na maioria dos genes em relação aos tratamentos, diferentes expressões desses genes foram observadas (Fig. 5, 6 e 7).

Os comportamentos dos diferentes genes que constituem os sistemas de efluxo multidrogas analisados, na ausência de tratamento (sem antimicrobiano e nem inibidor) são mostrados na Figura 5, na qual é observada uma maior expressão relativa do gene *emrA* (89,264 vezes), em comparação aos demais genes, seguido dos genes *acrF* (40,619 vezes), *emrB* (14,484 vezes), *acrA* (9,972 vezes), *acrE* (5,604 vezes), e o *acrB* (1,118 vezes). Esperava-se uma maior expressão dos genes *acrA* e *acrB* pois diferentes trabalhos reportam que o AcrAB-TolC, se expressa constitutivamente em *E. coli*, e é considerado como seu principal sistema de efluxo multidrogas (LI, e NIKAIDO, 2004; PIDDOCK, 2006a; BOHNERT et al., 2007; NIKAIDO, 2009). No presente trabalho esses genes foram os que menos expressaram.

HIRAKAWA et al., em 2008, verificaram em cepas de *E. coli*, que a proteína ACRS, tem a capacidade de reprimir a expressão de AcrAB e aumentar a expressão de AcrEF. Isso poderia ser uma explicação ao que foi observado na Figura 5, com os genes relacionados a esses sistemas. Além disso, sabe-se que bactérias precisam de sistemas de efluxo ativado também para seu metabolismo geral (POOLE, 2005; PIDDOCK, 2006a; POOLE, 2007), então a expressão observada dos genes *emrA* e *emrB* (Figura 5), poderia estar contribuindo com esta função.

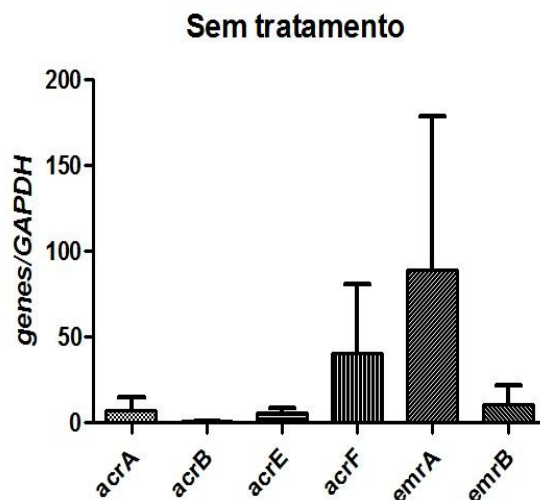


Figura 5- Expressão relativa dos genes *acrA*, *acrB*, *acrE*, *acrF*, *emrA* e *emrB* na ausência de tratamento.

Na presença de ampicilina, houve uma maior expressão relativa do gene *acrF* (803,438 vezes), seguido do *emrA* (319,754 vezes), *emrB* (168,102 vezes), *acrE* (42,286 vezes), *acrA* (4,738 vezes), e do gene *acrB* (1,779 vezes) (Figura 6A). Os sistemas de efluxo multidrogas AcrAB-TolC e AcrEF-TolC, expulsão ampicilina (PIDDOCK , 2006b; BAMBEKE et al., 2006; NIKAIDO e TAKATSUKA, 2009; TAKATSUKA et al., 2010). Devido a isto, além do gene *acrF*, esperava-se observar uma maior expressão de todos os genes que codificam esses sistemas de efluxo, entretanto não foi observado (Figura 6A). O gene *acrF* codifica a proteína transportadora, propriamente dita, a qual remove drogas do citoplasma para o periplasma (PIDDOCK et al., 2006b; BAMBEKE et al., 2006), infere-se que a maior expressão pode ser devido a sua importância no transporte de substâncias (ROSENBERG et al, 2003).

Pelo encontrado na literatura, a ampicilina e o sulfametoxazol/ trimetoprim não são substratos do sistema de efluxo multidrogas EmrAB-TolC (Quadro 1), mas pelo observado nas figuras 6A e 7A, estas drogas podem ser possíveis candidatos a substratos deste sistema. Entretanto, estudos utilizando testes mais sensíveis e específicos com esse propósito, devem ser realizados para confirmar esses dados. Com o desenvolvimento das pesquisas, diferentes drogas têm sido identificadas como substratos de diferentes sistemas de efluxo, por exemplo minociclina e nafcilina que eram substratos dos sistemas EmrKY e AcrEF-TolC, respectivamente, e atualmente são substratos do sistema de efluxo AcrAB (TAKATSUKA et al., 2010).

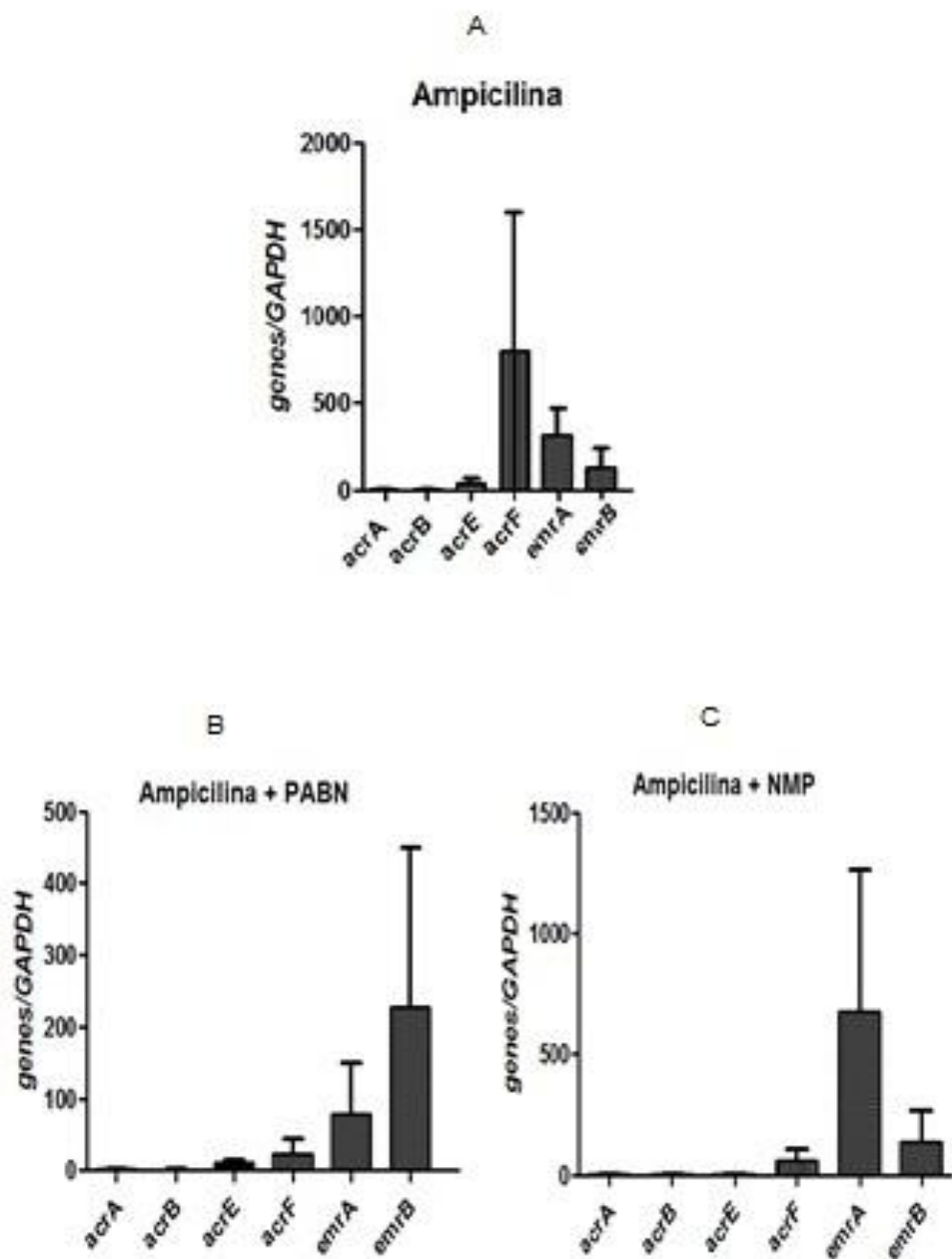


Figura 6- Expressão relativa dos genes *acrA*, *acrB*, *acrE*, *acrF*, *emrA* e *emrB* em relação aos tratamentos realizados: (A) Ampicilina; (B) Ampicilina mais PABN; (C) Ampicilina mais NMP.

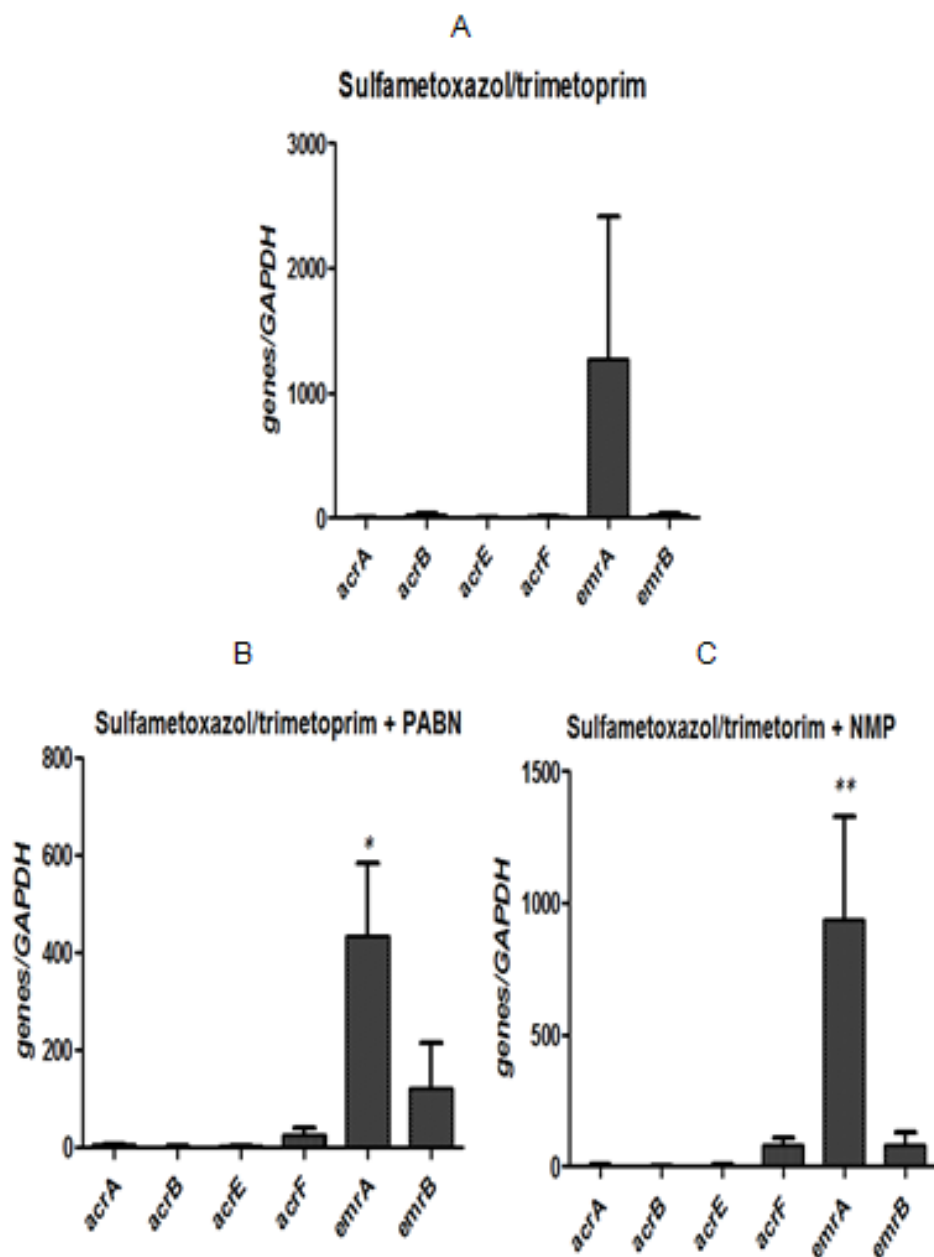


Figura 7- Expressão relativa dos genes *acrA*, *acrB*, *acrE*, *acrF*, *emrA* e *emrB* em relação aos tratamentos realizados: (A) Sulfametoxazol/trimetoprim; (B) Sulfametoxazol/ trimetoprim mais PABN; (C) Sulfametoxazol/trimetoprim mais NMP. (\*) Gene *emrA* apresentou diferença estatística significativa ( $P < 0.05$ ) em relação os genes *acrA*, *acrB*, *acrE*, *acrF* exceto ao *emrB*. (\*\*) Gene *emrA* apresentou diferença significativa ( $P < 0.05$ ) em relação a todos os demais genes analisados.

Com adição do inibidor PA $\beta$ N, o gene que mais se expressou foi o *emrB* (302,919 vezes), seguido do *emrA* (78,091 vezes) como observado na Figura 6B, enquanto na presença do inibidor NMP (Figura 6C), observou-se o contrario, gene *emrA* (679,349 vezes) e *emrB* (184,377 vezes). Em relação aos genes *acrA* e *acrB*, não houve grandes diferenças no comportamento de suas expressões e o gene *acrE* na presença de PA $\beta$ N teve um ligeiro aumento (10,562 vezes) em relação ao observado na presença de NMP (2,553 vezes).

Embora a literatura reporte que o PA $\beta$ N e NMP atuam por competição com os antimicrobianos (MURAKAMI et al., 2006) e o primeiro, além disso, aumenta a permeabilidade da membrana externa (MATSUMOTO et al., 2011), pelo observado nas Figuras 5 e 6 poderíamos inferir que esses inibidores contribuíram na diminuição da expressão do gene *acrF*, pois sua expressão foi menor na presença de PA $\beta$ N (7,581 vezes) e NMP (7,374 vezes), em relação à ausência de tratamento (40,619) e presença de ampicilina (803,438 vezes). Este gene codifica uma proteína componente do sistema de efluxo AcrEF, o qual é análogo de AcrAB, estes dois sistemas são considerados os mais importantes no aspecto clínico de resistência a antimicrobianos em *E. coli*, além disso, a homologia de suas sequências de aminoácidos e seus perfis de substratos são similares (NISHINO e YAMAGUCHI, 2004; NIKAIDO, 2009).

Quando as bactérias foram submetidas ao tratamento com sulfametoxazol/trimetoprim, observou-se uma maior expressão relativa do gene *emrA* (1270,996 vezes) em relação aos demais genes analisados (Figura 7A), seguido do *emrB* (36,793 vezes). Semelhante comportamento foi observado com adição dos dois inibidores, porém com uma maior expressão dos genes *emrB* (154,271 vezes), e *acrF* (24,518 vezes) na presença de PA $\beta$ N, enquanto os genes, *emrB* (99,631 vezes) e *acrF* (80,645 vezes), na presença de NMP (Figuras 7B e 7C).

A expressão relativa do gene *emrA* na presença de sulfametoxazol/ trimetoprim e PA $\beta$ N apresentou diferença estatística significativa em relação aos demais genes com exceção do *emrB* (Figura 7B) e com relação a todos os outros genes na presença de NMP (Figura 7C). Quanto aos genes *acrA*, *acrB*, *acrE* suas expressões foram mínimas variando de 0,977 vezes até 21,815 vezes (Figura 7).

Observou-se uma maior expressão relativa do gene *acrF*, na presença dos inibidores, PA $\beta$ N (24,518 vezes) e NMP (80,645 vezes), em relação ao tratamento com sulfametoxazol/trimetoprim (11,019 vezes) (Figura 7). Sugere-se que esses inibidores não atuam

em sinergismo com esse antimicrobiano, ao contrario do que foi observado previamente com ampicilina.

Segundo TAKATSUKA, (2010) e MATSUMOTO et al. (2011), os inibidores PAβN e NMP são substratos dos sistemas de efluxo AcrAB e AcrEF, mas em nossos isolados resistentes, como mostrado nas Figuras 6B, 6C, 7B e 7C, estes inibidores não se comportaram como tal frente aos genes relacionados a esses sistemas, mas se comportaram dessa maneira frente aos genes que codificam o sistema de efluxo EmrAB.

A literatura cita que o repressor local EmrR, membro da família de reguladores MarR, tem a função de controlar a indução da expressão de *emrAB*, e o repressor MarR também pertencente a essa família, reprime a síntese do regulador global MarA, encarregado da ativação da expressão de *mar*, *marAB*, *acrAB* e *TolC*. (ALEKSHUN et al., 1997; GRKOVIC et al., 2002). No trabalho realizado por LOMOVSKAYA et al. (1995) foi observada uma mutação no gene *emrR* a qual levou a uma super expressão do sistema de efluxo EmrAB em cepas de *E. coli*. Com base no relato previo, pode-se sugerir que os resultados obtidos para os genes *acrA*, *acrB*, *emrA* e *emrB* (Figuras 5, 6 e 7) frente a todos os tratamentos, poderiam ser consequência de uma mutação no repressor MarR.

ROSENBERG et al. (2003), verificaram que a super expressão de diversos sistemas de efluxo em *E. coli*, poderia resultar em efeitos tóxicos para a bactéria, pois esses sistemas, além de expulsar antimicrobianos, participam em seu metabolismo. Estes autores concluem que os sistemas de efluxo multidrogas estão sujeitos a diferentes níveis de regulação e consequentemente diferentes níveis de expressão. Isto foi observado em todos os genes estudados neste trabalho (Figuras 5, 6 e 7).

Com base nos resultados obtidos pode-se dizer que o inibidor PAβN apresentou melhores efeitos que o NMP, frente ampicilina e ao sulfametoxazol/trimetoprim nos isolados de *E. coli* obtidos de leite bovino com mastite. Diante o que foi discutido seria interessante testar as concentrações terapêuticas dos antimicrobianos e do inibidor, para este ultimo ser usado *in vivo* como adjuvante na terapia da mastite. Seguindo o mesmo raciocínio, também poderiam ser testados outros antimicrobianos com o intuito de obter um sinergismo mais efetivo destas drogas, verificando suas ações terapêuticas e toxicológicas. Deve-se resaltar que estes sistemas de efluxo além de ser um mecanismo de resistência às drogas nas bacterias, atuam também na eliminação

de compostos tóxicos gerado pelo metabolismo bacteriano e facilita a colonização das mucosas do hospedeiro, pois confere resistência a sais biliares, entre outras atividades fisiológicas (LEWINSON e BIBI, 2001). Assim a inibição dos sistemas de efluxo multidrogas levaria a um desequilíbrio homeostático nas bactérias e estas também perderiam a capacidade de colonizar as mucosas do hospedeiro o que induziria a uma morte celular, facilitando o tratamento e controle da mastite bovina. Este é o primeiro trabalho que visa a estudar *in vitro* inibidores de sistemas de efluxo multidrogas como adjuvantes na mastite bovina.

## 6. CONCLUSÃO

- Foi verificada baixas taxas de resistência entre os isolados analisados aos antimicrobianos testados.
- Os isolados exibiram diferentes perfis genotípicos relacionados à presença / ausência de genes que codificam sistemas de efluxo multidrogas.
- Os isolados apresentaram diferentes perfis fenotípicos de resistência aos antimicrobianos avaliados.
- Verificou-se redução das CIM de ampicilina e sulfametoxazol/trimetoprim, em todos os isolados na presença dos dois inibidores, exceto para sulfametoxazol/trimetoprim na presença de NMP nos isolados resistentes.
- Ampicilina apresentou melhores resultados de sinergismo com PA $\beta$ N e NMP em relação a sulfametoxazol/trimetoprim.
- PA $\beta$ N apresentou melhores resultados de sinergismo com ampicilina e sulfametoxazol/trimetoprim em relação a NMP.
- O melhor tratamento na inibição dos sistemas de efluxo multidrogas foi ampicilina adicionado de PA $\beta$ N.
- Os genes analisados apresentaram diferentes níveis de expressão relativa, em relação aos sete tratamentos realizados.
- Os inibidores avaliados contribuíram na diminuição da expressão relativa do gene *acrF*, no tratamento com ampicilina.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACAR, J. F., MOULIN, G. Antimicrobial resistance at farm level. *OIE Revue Scientifique et Technique*, v.25. p. 775-792, 2006.

ANDREWS, A. H.; BLOWEY, R. W.; BOYD, H.; EDDY, R. G. Medicina bovina: doenças e criação de bovinos. 2<sup>a</sup> ed. São Paulo: Roca, 2008. 1080 p.

ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J.D. Molecular biology of the cell. 3<sup>a</sup> ed New York; Garland Publishing, 1994. 1294 p.

ALEKSHUN, M.N.; LEVY, S.B.; Regulation of chromosomally mediated multiple antibiotic resistance: the mar regulon. *Antimicrobial Agents Chemother*, v.41, p 2067–2075, 1997.

ALTALHI, A.D.; HASSAN, S.A. Bacterial quality of raw milk investigated by *Escherichia coli* and isolates analysis for specific virulence-gene markers. *Food Control*, v.20, p.913-917, 2009.

APPLIED BIOSYSTEMS. Guide to performing relative quantitation of gene expression using Real-Time quantitative PCR. 2004

BAMBEKE, F.V.; PAGÉS, J.M.; LEE, V.J. Inhibitors of Bacterial Efflux Pumps as Adjuvants in Antibacterial Therapy and Diagnostic Tools for Detection of Resistance by Efflux. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov*, v.1, p. 157-175, 2006.

BARANOVA, N., NIKAIDO, H. The BaeSR two-component regulatory system activates transcription of the *yeg- MNOB (mdtABCD)* transporter gene cluster in *Escherichia coli* and increases its resistance to novobiocin and deoxycholate. *Journal of Bacteriology*, v.184, p. 4168–76, 2002.

BENTLEY, J., HYATT, L. S., AINLEY, K., PARISH, J. H., HERBERT, R. B., WHITE, G. R. Cloning and sequence analysis of an *Escherichia coli* gene conferring bicyclomycin resistance. *Gene*, v. 127, p.117–120, 1993.

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

BIGGS, A. Mastitis in cattle. Crowood Press Ltd. Ramsbury, Marlborough. ISBN 978 1 84797 071 8, 2009.

BOHNERT, J.A., SCHUSTER, S., FÄHNRIK, E., TRITTLER, R., KERN, W.V. Altered spectrum of multidrug resistance associated with a single point mutation in the *Escherichia coli* RND-type MDR efflux pump YhiV (MdtF). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 59, p. 1216–1222, 2007.

BLUM, B.; HELLER, E.D.; KRIFUCKS, O.; SELA, S.; HAMMER-MUNTZ, O., LEITNER, G. Identification of a bovine mastitis *Escherichia coli* subset. *Journal of Veterinary Microbiology*, v.132, p.135-148, 2008

BRADLEY, A.J.; GREEN, M.J. Factors affecting cure when treating bovine clinical mastitis with cephalosporin-based intramammary preparations. *Journal of Dairy Science*, v. 92, p. 1941-1953, 2009

BROWN, M.H., PAULSEN, I.T., SKURRAY, R.A. The multidrug efflux protein NorM is a prototype of a new family of transporters. *Molecular Microbiology*, v. 31, p. 393–395, 1999.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals; Approved Standard – Third Edition. CLSI document M31-A3. **CLSI, Wayne, PA, 2008.**

COSTA, E.O. Binômio: Saúde da glândula mamária e produção leiteira. Comunicações Científicas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, p. 1-20, 2009.

DANO, K. Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cell. *Biochemistry Biophys Acta*, v. 323, p. 466-483, 1973.

DENNY, B. J., NOVOTNY, L., WEST, P.W.J., BLESOVA, M., ZAMOCKA, J. Antimicrobial activity of a series of 1-alkyl-2-(4-pyridyl)pyridinium bromides against Grampositive and Gram-negative bacteria. *Medical Principles Practice*, v. 14, p. 377-81, 2005.

ELKINS, C.A., MULLIS, L.B. Substrate competition studies using whole-cell accumulation assays with the major tripartite multidrug efflux pumps of *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 51, p. 923-929, 2007

GERKEN, H.; MISRA, R. Genetic evidence for functional interactions between TolC and AcrA proteins of a major antibiotic efflux pump of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, v. 54, p. 620–631, 2004.

GERLACH, F.A., ÁLVAREZ, F.A., DENOGEAN, F.G., MEDINA, S.M., GERLACH, L.E. Incidencia y costo de la mastitis en un establo del municipio de Santa Ana, Sonora. *Revista Mexicana Agronegocios*, v. 24, 789-796, 2009.

GOTTESMAN, M.M., HRYCYNA, C.A., SHOENLEIN, P.V., GERMAN, U.A., PASTAN, I. Genetic analysis of the multidrug transporter. *Annual Review Genetic*, v. 29, p. 607- 649, 1995.

GRNOVIC, S., BROWN, M., SKURRAY, R. Regulation of bacterial drug export systems. *Microbiological and Molecular Reviews*, v. 66, p.671-701, 2002.

HAMELIN, K.; BRUANT, G.; EL-SHAARAWI, A.; HIL, S.; EDGE, T.A.; FAIRBROTHER, J.; HAREL, J. ; MAYNARD, C.; MASSON, L.; BROUSSEAU, R. Occurrence of virulence and antimicrobial resistance genes in *Escherichia coli* isolates from different aquatic ecosystems within the St. Clair River and Detroit River areas. *Applied and Environmental Microbiology*, v.73, p.477- 484, 2007.

HANNULA, M., HÄNNINEN, M.L. Effect of putative efflux pump inhibitors and inducers on the antimicrobial susceptibility of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Journal of Medical Microbiology*, v. 57 p. 851-855, 2008.

HIRAKAWA, H.; TAKUMI-KOBAYASHI, A., THEISEN, U., HIRATA, T., NISHINO, K., YAMAGUCHI, A. AcrS/EnvR Represses Expression of the *acrAB* Multidrug Efflux Genes in *Escherichia coli*. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, v. 190, p. 6276–6279, 2008

HUIJPS, K., HOGEVEEN, H., Preferences of cost factors for mastitis management among Dutch dairy farmers using adaptive conjoint analysis. *Preventive Veterinary Medicine*, v.92, p.351-359, 2009.

JACOBY, G. A.. AmpC beta-lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 22, p.161-82, 2009.

JELLEN-RITTER, A. S., KERN, W. V. Enhanced Expression of the Multidrug Efflux Pumps AcrAB and AcrEF Associated with Insertion Element Transposition in *Escherichia coli* Mutants Selected with a Fluoroquinolone. *Antimicrobial Agents and chemotherapy*, v. 45, p. 1467-1472, 2001.

JULIANO, R.L., LING, V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochemistry Biophysic Acta*, v. 455, p. 152- 162, 1976.

KAATZ, G.W., MOUDGAL, V.V., SEO, S.M., HANSEN, J.B., KRISTIANSEN, J.E. Phenylpiperidine selective serotonin reuptake inhibitors interfere with multidrug efflux pump activity in *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 22, p. 254-261, 2003.

KERN, W.; STEINKE, P.; SCHUMACHER, A.; SCHUSTER, S.; VON BAUM, H.; BOHNERT, J.A. Effect of 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine, a novel putative efflux inhibitor, on antimicrobial drug susceptibility in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 57, p. 339-43, 2006.

KOBAYASHI, N., NISHINO, K., YAMAGUCHI, A. Novel macrolide-specific ABC-type efflux transporter in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*; v. 183, p. 5639-5644, 2001

KORONAKIS, V., ESWARAN, J., HUGHE, C. Structure and Function of TolC: The Bacterial Exit Duct for Proteins and Drugs. *Annual Review Biochemistry*, v. 73, 467-489, 2004.

LEBLANC, S.J., LISSEMORE, K.D., KELTON, D.F., DUFFIELD, T.F., LESLIE, K.E. Major advances in disease prevention in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, v. 89, p. 1267-1279, 2006

LEE, A., MAO, W., WARREN, M.S., MISTRY, A., HOSHINO, K., OKUMURA, R., ISHIDA, H., LOMOVSKAYA, O. Interplay between efflux pumps may provide either additive or multiplicative effects on drug resistance. *Journal of Bacteriology*, v. 182, p. 3142-3150, 2000

LEWIS, K. Multidrug resistance pumps in bacteria: variations on a theme. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 19, p. 119-123, 1994.

LEWINSON, O., BIBI, E. Evidence for simultaneous binding of dissimilar substrates by the *Escherichia coli* multidrug transporter MdfA. *Biochemistry*, v. 40, p. 12612–12618, 2001

LI, X.Z.; NIKAIDO, H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs*, v. 64, p. 159-204, 2004.

LITTLEJHON, T.G., DIBERARDINO, D., MESSEROTTI, L.J., SPIERS, S.J., SKURRAY, R. Structure and evolution of family of genes encoding antiseptic and disinfectant resistance in *Staphylococcus aureus*. *Gene*, v. 101, p. 59- 66, 1991.

LITTLEJHON, T.G., PAULSEN, I.T., GILLESPIE, M.T., TENNENT, J.M., MIDGLEY, M., JONES, I.G., PUREWAL, A.S., SKURRAY, R.A Substrate specificity and energetics of antiseptic and disinfectant resistance in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology letters*, v. 95, p. 259- 266, 1992.

LOMOVSKAYA, O.; LEWIS, K., MATIN, A. EmrR is a negative regulator of the *Escherichia coli* multidrug resistance pump EmrAB. *Journal of Bacteriology*, v. 177 p.2328–2334, 1995

LOMOVSKAYA, O., WARREN, M.S., LEE, A., GALAZZO, J., FRONKO, R., LEE, M., BLAIS, J., CHO, D., CHAMBERLAND, S., RENAU, T., LEGER, R., HECKER, S., HECKER, S., WATKINS, W., HOSHINO, K., ISHIDA, H., LEE, V. J. Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: novel agents for combination therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 45, p. 105-116, 2001.

LOMOVSKAYA, O., BOSTIAN, K.A. Practical applications and feasibility of efflux pump inhibitors in the clinic - A vision for applied use. *Biochemical Pharmacology*, v. 71, p. 910-918, 2006

MAHAMOUD, A., CHEVALIER, J., ALIBERT-FRANCO, S., KERN, W.V., PAGÈS, J.M. Antibiotic efflux pumps in Gram-negative bacteria: the inhibitor response strategy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 59, p. 1223–1229, 2007.

MARKL, N., LEVY, S. B. Reversal of tetracycline resistance mediated by different bacterial tetracycline resistance determinants by an inhibitor of the Tet(B) antiport protein. *Journal of Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v. 43 p. 1719–1724, 1999.

MATSUMOTO, Y., HAYAMA, K., SAKAKIHARA, S., NISHINO, K., NOJI, H., LINO, R., YAMAGUCHI, A. Evaluation of Multidrug Efflux Pump Inhibitors by a New Method Using Microfluidic Channels. *PLoS One*, v. 6, 2011.

MOREIRA, M.A.S.; SOUZA, E. C.; MORAES, C.A. Multidrug efflux systems in Gram-negative bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.35, p.19-28, 2004.

MOREIRA, M.A.S.; OLIVEIRA, J.A.; TEIXEIRA, L.M.; MORAES, C.A. Detection of a chloramphenicol efflux system in *Escherichia coli* isolated from poultry carcass. *Veterinary Microbiology*, v. 109, p.75-81, 2005.

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

MOREIRA, M.A.S., RODRIGUES, P. C. F., TOMAZ, R. S., MORAES, C.A. Multidrug efflux systems in *Escherichia coli* and *Enterobacter cloacae* obtained from wholesome broiler carcasses. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 40, p. 241-247, 2009.

MURAKAMI, S., NAKASHIMA, R., YAMASHITA, E., MATSUMOTO, T., YAMAGUCHI, A. Crystal structures of a multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism. *Nature*, v.443, p.173-179, 2006.

NAGAKUBO, S., NISHINO, K., HIRATA, T., YAMAGUCHI, A. The putative response regulator BaeR stimulates multidrug resistance of *Escherichia coli* via a novel multidrug exporter system, MdtABC. *Journal of Bacteriology*, v.184, p. 4161-4167, 2002.

NIKAIDO, H. Multidrug efflux pumps of Gram negative bacteria. *Journal of Bacteriology*, v. 178, p. 5853-5859, 1996

NIKAIDO, H. Multidrug resistance in bacteria. *Annual Review of Biochemistry*, v.78, p. 119-146, 2009.

NIKAIDO, H.; TAKATSUKA, Y. Mechanisms of RND multidrug efflux pumps. *Biochimica Biophysica Acta*, v. 1794, p. 769-781, 2009

NISHINO, K., YAMAGUCHI, A. Role of histone-like protein H-NS in multidrug resistance of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, v.186, p. 1423-1429, 2004.

NISHINO, K., YAMADA, J., HIRAKAWA, H., HIRATA, T., YAMAGUCHI, A. Roles of TolC-dependent multidrug transporters of *Escherichia coli* in resistance to  $\beta$ -lactams. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 47, p. 3030–3033, 2003.

OLIVER, S.P.; PIGHETTI, G.M.; ALMEIDA, R.A. Mastitis Pathogens. Environmental Pathogens. 2<sup>a</sup> ed. Knoxville: Academic Press, 2011, 4170p.

PANNEK, S., HIGGINS, P. G., STEINKE, P., JONAS, D., AKOVA, M., BOHNERT, J. A., SEIFERT, H., KERN, W. V. Multidrug efflux inhibition in *Acinetobacter baumannii*: comparison between 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine and phenyl-arginine-beta-naphthylamide. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 57, p. 970-974, 2006.

PIDDOCK, L. J. V. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 19, p. 382-402, 2006 a.

PIDDOCK, L. J. V. Multidrug-resistance efflux pumps—not just for resistance. *Nature Reviews Microbiology*, v. 4, p. 629–636, 2006 b.

POOLE, K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 56, p. 20-51, 2005.

POOLE, K. Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Annals of Medicine*, v. 39, p. 162-176, 2007.

POS, K. M. Drug transport mechanism of the AcrB efflux pump. *Biochim Biophys Acta*, v. 1794, p. 782-793, 2009

PUTMAN, M., VEEN, H. W., KONINGS, W. N. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.64, p.672-693, 2000.

PYÖRÄLÄ, S., TAMPONEN, S. Coagulase-negative staphylococci-emerging mastitis pathogens. *Veterinary Microbiology*, v. 134, p. 3-8, 2009

RADOSTITS O.M., GAY C.C., HINCHCLIFF K.W. & CONSTABLE P.E. 2007. *Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. 10<sup>th</sup> ed. W.B. Saunders, London. 2065p.

RANGEL, P.M., MARIN, J.M. Antimicrobial resistance in Brazilian isolates of shiga toxin-encoding *Escherichia coli* from cows with mastitis. *Ars Veterinária*, v.25, p.18-23, 2009.

RIBEIRO, M. G., COSTA, E. O., LEITE, D.S., LANGONI, H., GARINO JUNIOR, F., VICTORIA, C., LISTONI, F. J. P. Fatores de virulência em linhagens de *Escherichia coli* isoladas de mastite bovina. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 58, p. 724-731, 2006.

RICCI, V., PIDDOCK, L. J. V. Only for substrate antibiotics is a functional AcrAB-TolC efflux pump and RamA required to select multidrug resistant *Salmonella Typhimurium*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 64, p. 654-657, 2009.

ROSENBERG, E., BERTENTHAL, D., NILLES, M. L., BERTRAND, K. P., NIKAIDO, H. Bile salts and fatty acids induce the expression of *Escherichia coli* AcrAB multidrug efflux pump through their interaction with Rob regulatory protein. *Molecular Microbiology*, v. 48, p. 1609-1619, 2003.

ROUCH, D. A., CRAM, D. S., DIBERARDINO, D., LITTLEJOHN, T. G., SKRURRAY, R.A. Efflux- mediated antiseptic resistance gene *qacA* from *Staphylococcus aureus* common ancestry with tetracycline- and sugar- transport proteins. *Molecular microbiology*, v. 12, p. 2051- 2062, 1990.

SÁNCHEZ-CÉSPEDES, J., VILA, J. “Partial characterisation of the *acrAB* locus in two *Citrobacter freundii* clinical isolates.” *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 30, p. 259-63, 2007.

SCHUMACHER, A., STEINKE, P., BOHNERT, J. A., AKOVA, M., JONAS, D., KERN, W. V. Effect of 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine, a novel putative efflux pump inhibitor, on antimicrobial drug susceptibility in clinical isolates of Enterobacteriaceae other than *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 57, p. 344-348, 2006.

STEENEVELD, W., VAN WERVEN, T., BARKEMA, H.W., HOGEVEEN, H. Cow-specific treatment of clinical mastitis: An economic approach. *Journal of Dairy Science*, v.94, p.174-188, 2011.

SCHWARZ, S., KEHRENBURG, C., DOUBLET, B., CLOECKAERT, A. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiology Reviews*, v.28, p. 519-542, 2004

SULAVIK, M., HOUSEWEART, C., CRAMER, C., JIWANI, N., MURGOLO, N., GREEN, J., DIDOMENICO, B., SHAW, K., MILLER, G. H., HARE, R., SHIMER, G. Antibiotic susceptibility profiles of *Escherichia coli* strains lacking multidrug efflux pump genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 45, p 1126-1136, 2001.

TAKATSUKA, Y., CHEN, C., NIKAIDO, H. Mechanism of recognition of compounds of diverse structures by the multidrug efflux pump AcrB of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America*, v.107, p. 6559-6565, 2010.

TENNET, J.M., LYON, B.R., MIDGLEY, M., JONES, I.G., PUREWAL, A.S., SKURRAY, R.A. Physical and biochemical characterization of the *qacA* gene encoding antiseptic and disinfectant resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of general Microbiology*, v. 135, p. 1-10, 1998.

THORARENSEN, A., PRESLEY-BODNAR, A. L., MAROTTI, K. R., BOYLE, T. P., HECKAMAN, C. L., BOHANON, M. J., TOMICH, P. K., ZURENKO, G. E., SWEENEY, M. T., YAGI, B. H. 3-Arylpiperidines as potentiators of existing antibacterial agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v.11, p. 1903–1906, 2001

VIVEROS, M., DUPONT, M., RODRIGUES, L., COUTO. I., DAVIN-REGLI. A., MARTINS,M., PAGÉS, J. M., AMARAL, L. Antibiotic stress, genetic response and altered permeability of *E. coli*. *PLoS One*, v 2, p365, 2007.

VIVEIROS, M., MARTINS, M., COUTO, I., RODRIGUES, L., SPENGLER, G., MARTINS, A., KRISTIANSEN, J. E., MOLNAR, J., AMARAL, L. New methods for the identification of efflux mediated MDR bacteria, genetic assessment of regulators and efflux pump constituents, characterization of efflux systems and screening for inhibitors of efflux pumps. *Current Drug Targets*, v. 9, p. 760–778, 2008 a.

VIVEIROS, M., MARTINS, A., PAIXÃO, L., RODRIGUES, L., MARTINS, M., COUTO, I., FÄHNRIK, E., KERN, W. V., AMARAL, L. Demonstration of intrinsic efflux activity of *Escherichia coli* K-12 AG100 by an automated ethidium bromide method. *International Journal Antimicrobial Agents*, v. 31, p. 458-462, 2008 b.

WEBBER, M. A., PIDDOCK, L. J. V. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.51, p. 9-11. 2003.

WHIST, A. C., OSTERAS, O., SOLVEROD, L. Clinical mastitis in norwegian herds after a combined selective dry-cow therapy and teat-dipping trial. *Journal Dairy Science*, v.89: 4649–59, 2006.