

IDENTIFICAÇÃO E PERFIL DE SENSIBILIDADE DE *Enterobacter* spp. ISOLADOS DE LEITE BOVINO CRU

Taila dos Santos Alves¹
Amanda Keller Siqueira²
Mirtis Maria Giaciani Ferraz³
Domingos da Silva Leite⁴

RESUMO

A produção e o consumo de leite e derivados vêm aumentando anualmente no Brasil. A emergência do consumo de leite cru está relacionada à busca por produtos que mantenham preservadas suas propriedades nutricionais. No entanto, este hábito aumenta os riscos do consumo de leite e derivados contaminados por micro-organismos patogênicos. As bactérias do gênero *Enterobacter* são amplamente distribuídas na natureza e fazem parte da microbiota do trato gastrointestinal humano e animal. *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Pantoea agglomerans* e *Cronobacter sakazakii* são considerados patógenos oportunistas. Nesse sentido, o presente estudo investigou a ocorrência e a diferenciação bioquímica de espécies de *Enterobacter* isolados de leite bovino cru, a caracterização do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos e a pesquisa de genes de resistência. Do total de 104 cepas de *Enterobacter* spp. foram identificadas *E. cloacae* (n=39), *Pantoea agglomerans* (n=23), *Cronobacter sakazakii* (n=18) e *E. aerogenes* (n=9). Destas, 26% apresentaram resistência a três ou mais antimicrobianos. O gene *bla*_{TEM} foi encontrado em 27% dos isolados. Este achado alerta quanto ao risco de infecções por micro-organismos ambientais resistentes, associados ao consumo de leite bovino cru.

Palavras-chave: Enterobacteriaceae, *Cronobacter sakazakii*, *Pantoea agglomerans*, resistência, rebanho leiteiro.

IDENTIFICATION AND SENSITIVITY PROFILE OF *Enterobacter* spp. ISOLATED FROM RAW COW MILK

ABSTRACT

The production and consumption of milk and dairy products is growing fast in Brazil. The increase consumption of raw milk is related to the interest for products that keep conserved their nutritional properties. However, this habit increases the risks of consumption of milk and dairy products contaminated with pathogenic microorganisms. *Enterobacter* spp. is widely distributed in nature and is part of the commensal microbiota of the intestinal tracts of humans and animal. *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Pantoea agglomerans* and *Cronobacter sakazakii* are recognized as opportunistic pathogens. The current study investigated the occurrence and the differentiation of *Enterobacter* species isolated from raw cow milk, the characterization of sensitivity profile to antimicrobials and presence of resistant genes. From a total of 104 strains of *Enterobacter* spp. were identified *E. cloacae* (n=39),

¹ Mestrando do Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, Instituto de Biologia (IB), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Contato principal para correspondência.

² Pós-doutorando do Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, Instituto de Biologia (IB), UNICAMP

³ Bióloga Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, Instituto de Biologia (IB), UNICAMP

⁴ Docente do Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, Instituto de Biologia (IB), UNICAMP

Pantoea agglomerans (n=23), *Cronobacter sakazakii* (n=18) and *E. aerogenes* (n=9). Among these, 26% were resistant to three or more antimicrobials. The *bla*_{TEM} gene was found in 27% of the isolates. Here, we highlighted the risk of infection by potential environmental microorganisms, resistant to some antimicrobials, associated with consumption of raw cow milk.

Keywords: Enterobacteriaceae, *Cronobacter sakazakii*, *Pantoea agglomerans*, resistance, dairy cattle.

IDENTIFICACIÓN Y PERFIL DE LA SENSIBILIDAD DE *Enterobacter* spp. AISLADOS DE LECHE CRUDA DE VACA

RESUMEN

La producción y el consumo de leche y productos lácteos está aumentando anualmente en Brasil. El surgimiento del consumo de leche cruda se relaciona con la búsqueda de productos que conservan sus propiedades nutricionales. Esta conducta aumenta riesgos del consumo de leche y productos lácteos contaminados con microorganismos patógenos. Las bacterias del género *Enterobacter* son ampliamente distribuidas en la naturaleza y forma parte de los microorganismos comensales del aparato gastrointestinal humano y animal. *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Pantoea agglomerans* y *Cronobacter sakazakii* son citadas como patógenos oportunistas. De esta manera, este estudio investigó la ocurrencia y diferenciación bioquímica de *Enterobacter* spp. aislados de leche cruda de ganado bobino, la caracterización del perfil de sensibilidad frente a los antimicrobianos y la detección de los genes de resistencia. Del total de 104 cepas de *Enterobacter* spp. se identificaron *E. cloacae* (n=39), *Pantoea agglomerans* (n=23), *Cronobacter sakazakii* (n=18), *E. aerogenes* (n=9). De estos, 26% mostraron resistencia a tres o más antimicrobianos. En 27% de las cepas el gen *bla*_{TEM} fue detectado. Por lo tanto, este hallazgo advierte sobre el riesgo de infecciones por microorganismos resistentes ambientales, asociados con el consumo de leche cruda de vaca.

Palabras clave: Enterobacteriaceae, *Cronobacter sakazakii*, *Pantoea agglomerans*, resistencia, vacas lecheras.

INTRODUÇÃO

O Brasil figura entre os maiores produtores mundiais de leite, atingindo aproximadamente 35 bilhões de litros anuais, e consumo *per capita* estimado em 172,6 L/ha/ano (1). Segundo Claeys et al. (2), existe crescente demanda para o consumo de leite cru apoiada na crença de que os processos de aquecimento podem reduzir a qualidade nutricional e os benefícios à saúde. Porém, o alimento *in natura* pode representar excelente meio de cultura para diversos micro-organismos devido ao conteúdo nutritivo, pH neutro e a alta atividade de água.

Os coliformes são os principais micro-organismos isolados de leite cru (3) incluindo as bactérias do gênero *Enterobacter*. Estes micro-organismos estão amplamente distribuídos na natureza e fazem parte da microbiota do trato gastrointestinal humano e animal (4), por vezes considerados patógenos oportunistas (5, 6, 7).

Cronobacter sakazakii (*Enterobacter sakazakii*), *Pantoea agglomerans* (*Enterobacter agglomerans*) e *Enterobacter cloacae* podem ser isolados de amostras clínicas e de alimentos, enquanto *Enterobacter aerogenes* e *Enterobacter cloacae* estão mais associados a casos de mastite bovina (8). Este grupo de micro-organismos é frequentemente isolado de afecções em

humanos, principalmente em recém-nascidos, incluindo casos de colite necrosante e meningite (8), bacteremia, infecções de tecidos moles, ossos e articulações (9).

Cetinkaya et al. (10) ressaltaram que muitos casos de infecção por *Cronobacter* em recém-nascidos estão associados à ingestão de fórmulas infantis em pó. No entanto, também são encontrados em outros alimentos e no ambiente (7, 11, 12). A contaminação das fórmulas infantis em pó por *Cronobacter sakazakii* pode estar relacionada à adição de nutrientes sensíveis ao calor após a pasteurização, a ingredientes derivados de vegetais, como também na preparação final para consumo (7, 11), o que é favorecido pela capacidade do micro-organismo em sobreviver em ambiente com baixa umidade (13).

O uso indiscriminado de antimicrobianos em medicina veterinária e humana aumenta a pressão de seleção para micro-organismos resistentes, que podem ser veiculados por alimentos de origem animal contaminados (14). Entre os mecanismos de resistência, merece destaque a produção de β -lactamases, das quais as β -lactamases de espectro estendido (ESBL) têm sido crescentemente estudadas (14, 15, 16).

Em razão da importância das bactérias entéricas como contaminantes do leite, incluindo *Cronobacter sakazakii*, *Pantoea agglomerans*, *Enterobacter cloacae* e *Enterobacter aerogenes* e suas implicações para a saúde pública, foi investigada a ocorrência destes micro-organismos, e a caracterização do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos destas espécies em isolados de leite bovino cru.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 104 isolados de *Enterobacter* spp. provenientes de leite bovino cru, obtidos de 89 tanques coletivos e 102 tanques individuais de propriedades convencionais, 124 amostras de leite convencional informal e 67 de leite orgânico, estocados na bacterioteca do Laboratório de Antígenos Bacterianos, do Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, do Instituto de Biologia, da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Destes, 51 % (53/104) foram isolados de leite informal, 30 % (31/104) de tanques coletivos, 12 % (12/104) de leite orgânico e 7 % (8/104) de tanques individuais.

A identificação bioquímica das espécies *C. sakazakii*, *P. agglomerans*, *E. cloacae* e *E. aerogenes* foi realizada a partir das provas bioquímicas de lisina e ornitina descarboxilase, arginina dihidrolase, urease, fermentação de adonitol, *myo*- Inositol e D- Sorbitol, bem como a presença de colônias com produção de pigmento amarelo Holt et al. (5), conforme descrito na Tabela 1. As reações de descarboxilação e dihidrolase foram obtidas a partir do método descrito por Fay e Barry (17), modificado por Brooks e Sodeman (18). O teste de urease foi realizado com o método de Rustigian e Stuart's. Para a fermentação foi preparado meio base, adicionado do carboidrato (19). Para a observação da produção de pigmento amarelo as cepas foram cultivadas em placas contendo ágar tripton de soja (TSA), em temperatura de 25°C, por 2 a 5 dias (20). A linhagem ATCC 13048 (*Enterobacter aerogenes*) foi utilizada como controle das reações bioquímicas.

O perfil de sensibilidade microbiana foi realizado mediante a técnica de difusão com discos (21) frente aos seguintes antimicrobianos: ampicilina (10 μ g), amoxicilina/ácido clavulânico (30 μ g), cefalexina (30 μ g), cefoperazona sódica (75 μ g), ceftiofur (30 μ g), ceftriaxona (30 μ g), cloranfenicol (30 μ g), enrofloxacin (5 μ g), gentamicina (10 μ g), sulfametoxazole/trimetoprim (25 μ g) e tetraciclina (30 μ g) [22, 23]. A interpretação dos resultados seguiram as recomendações do CLSI (21).

O diagnóstico de produção de ESBL foi obtido pelos métodos de disco aproximação (24) e epsilométrico para as cepas que exibiram resistência as cefalosporinas de terceira geração. No primeiro foram utilizados discos de aztreonam (30 μ g), ceftriaxona (30 μ g), cefotaxima (30 μ g) e ceftazidima (30 μ g) dispostos a uma distância de 20 mm do disco de

amoxicilina/ácido clavulânico (30µg). Para o teste epsilométrico foram utilizadas fitas de E-Test® (Biomérieux) contendo os antimicrobianos cefepima/ácido clavulânico (0,25-16/0,064-4 µg/mL) e ceftazidima/ácido clavulânico (0,5-32/0,064-4 µg/mL). As leituras foram realizadas de acordo com as recomendações do fabricante.

Tabela 1. Diferenciação bioquímica de espécies de *Enterobacter* spp.

Teste	<i>E. aerogenes</i>	<i>E. agglomerans</i> *	<i>E. cloacae</i>	<i>E. sakazakii</i> **
Hidrólise de ureia	-	[-]	d	-
Lisina descarboxilase	+	-	-	-
Arginina dihidrolase	-	-	+	+
Ornitina descarboxilase	+	-	+	+
Produção de ácido a partir:				
Adonitol	+	-	[-]	-
myo- Inositol	+	[-]	[-]	[+]
D-Sorbitol	+	d	+	-
Pigmento amarelo	-	[+]	-	+

Fonte: Adaptado de Holt et al. (1994)

* *Pantoea agglomerans*; ** *Cronobacter sakazakii*; d: 11-89% positivas; [-]: tardio

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi empregada para a pesquisa dos genes de resistência *ampC*, *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}* e *bla_{CTX-M}*, de acordo com a Tabela 2. Para cada reação foi adicionado 1,5 U *Taq* polimerase, 3µL de Tampão 10X para PCR, 400µM de dNTP, 2,5mM de MgCl₂, 7µL de DNA obtido por fervura e iniciadores em concentrações ótimas, em volume final de 30 µL. O volume de 10µL (8 µL do produto da PCR adicionados de 2 µL de tampão de amostra) de cada reação foram submetidos à eletroforese, em gel de agarose a 1,2%, e corado em solução de Brometo de Etídeo a 1µg/ml, por 10 min, e visualizado em transiluminador de luz U.V. Como marcador de peso molecular foi utilizado o padrão de 1Kb. A análise estatística descritiva dos resultados foi realizada pelo cálculo da frequência relativa.

Tabela 2. Iniciadores utilizados para a pesquisa de genes de resistência e parâmetros das reações de PCR.

Iniciador	Sequência (5'-3')	T°	pb	Ref.
<i>ampC</i>	CCCCGCTTATAGAGCAACAA	61°C	634	Féria et al. (25)
	TCAATGGTCGACTTCACACC			
<i>bla_{TEM}</i>	TCGGGAAATGTGCGG	61°C	972	
	TGCTTAATCAGTGAGGCACC			
<i>bla_{SHV}</i>	TTATCTCCCTGTTTAGCCACC	61°C	795	Cao et al. (26)
	GATTTGCTGATTTGCTCGG			
<i>bla_{CTX-M}</i>	CGATGTGCAGTACCAGTAA	60°C	585	Batchelor et al. (27)
	TTAGTGACCAGAATCAGCGG			

* T°: temperatura de anelamento; pb: tamanho do produto da PCR; Ref.: referência.

RESULTADOS

Com base nos testes bioquímicos, foi possível identificar 39 cepas de *Enterobacter cloacae* (37,5%), 23 *Pantoea agglomerans* (22,1%), 18 *Cronobacter sakazakii* (17,3%) e 9 *Enterobacter aerogenes* (8,7%). Outras espécies do gênero compreenderam 7 *Enterobacter taylorae* (6,7%) e 4 *Enterobacter amnigenus* (3,8%). Quatro (3,8%) isolados não foram identificados com os métodos utilizados.

A maior frequência de resistência aos antimicrobianos foi observada para a ampicilina em 87 cepas (83,7%), seguido de cefalexina em 48 (46,2%) e amoxicilina/ácido clavulânico em 34 (32,7%). Foi observada menor frequência de cepas resistentes para: cloranfenicol 3 (2,9%), cefoperazona sódica 3 (2,9%), ceftriaxona 2 (1,9%), enrofloxacin 1 (0,96%) e ceftiofur 1 (0,96%). Não foram encontradas cepas resistentes para gentamicina, sulfametoxazole/trimetoprim e tetraciclina. A Tabela 3 mostra o número de cepas resistentes, de cada espécie identificada, para cada um dos antimicrobianos avaliados.

A multirresistência a três ou mais antimicrobianos foi observada em 27 cepas (26%), das quais uma (*P. agglomerans*) apresentou resistência a cinco antimicrobianos (ampicilina, cefalexina, ceftriaxona, ceftiofur e cefoperazona sódica). Todos os isolados resistentes apresentaram resistência para ao menos um antimicrobiano do grupo dos β -lactâmicos, sendo que 4 (3,8%) foram resistentes para as cefalosporinas de terceira geração testadas. No entanto, as mesmas cepas não foram positivas para os testes de disco aproximação e epsilométrico.

Tabela 3. Frequência relativa de resistência frente aos antimicrobianos testados entre as espécies de *Enterobacter* spp. isolados de leite bovino cru.

ATB	<i>E. cloacae</i>	<i>P. agglomerans</i>	<i>C. sakazakii</i>	<i>E. aerogenes</i>	Outros	NI	Total
	n° (%)						
AMC	22 (21,2)	1 (0,96)	0	9 (8,7)	1 (0,96)	1 (0,96)	34 (32,7)
AMP	33 (31,7)	15 (14,4)	17 (16,3)	9 (8,7)	9 (8,7)	4 (3,8)	87 (83,7)
CFE	17 (16,3)	9 (8,7)	7 (6,7)	9 (8,7)	5 (4,8)	1 (0,96)	48 (46,2)
CFP	0	1 (0,96)	2 (1,9)	0	0	0	3 (2,9)
CEF	0	1 (0,96)	0	0	0	0	1 (0,96)
CRO	0	1 (0,96)	0	1 (0,96)	0	0	2 (1,9)
CLO	2 (1,9)	0	0	1 (0,96)	0	0	3 (2,9)
ENO	1 (0,96)	0	0	0	0	0	1 (0,96)
Total	75 (72,1)	28 (27)	26 (25)	29 (27,9)	15 (14,4)	6 (5,8)	-

Outros: outras espécies de *Enterobacter* (*E. taylorae*, e *E. amnigenus*); NI: não identificados; ATB: antimicrobianos; n°: número de cepas resistentes; AMC: amoxicilina/ácido clavulânico; AMP: ampicilina; CFE: cefalexina; CFP: cefoperazona sódica; CEF: ceftiofur; CRO: ceftriaxona; CLO: cloranfenicol; ENO: enrofloxacin

Dos genes investigados, 28/104 (27%) cepas foram positivas para *bla*_{TEM}, das quais 12/28 (43%) foram caracterizadas como *E. cloacae* (Figura 1). Os genes *amp*_C, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M} não foram detectados entre as cepas estudadas.

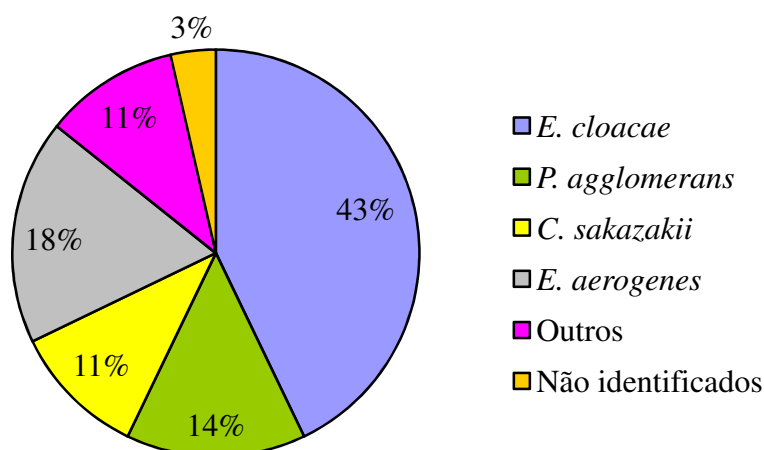


Figura 1. Frequência de cepas positivas para o gene *bla*_{TEM} entre as espécies de *Enterobacter*, *Cronobacter* e *Pantoea* isoladas de leite bovino cru.

DISCUSSÃO

Os isolados de *Enterobacter* spp. foram obtidos de amostras de leite bovino cru. Este resultado merece atenção especial, uma vez que a produção e comercialização de leite bovino cru no mercado informal correspondem cerca de 30% da produção brasileira de leite (28). O consumo de leite cru pela população humana pode significar riscos desnecessários para a saúde, já que os tratamentos térmicos não alteram as propriedades nutritivas do leite (2). As bactérias do gênero *Enterobacter* não são termotolerantes e, apesar de alguns estudos sugerirem que *C. sakazakii* apresenta maior tolerância a temperaturas elevadas do que outras enterobactérias, esses micro-organismos não sobrevivem à pasteurização (7, 13, 29).

As espécies *E. cloacae*, *P. agglomerans* e *C. sakazakii* podem ser frequentemente isoladas de alimentos, assumindo grande importância a associação dessas bactérias com casos de infecções, principalmente em recém-nascidos (8,11). Analogamente, estas espécies foram as mais encontradas entre os isolados estudados.

Os resultados obtidos quanto à identificação de *C. sakazakii* corroboram com Wahyuni e Budiarmo (8), e Kandhai et al. (11), que referiram este micro-organismo como possível contaminante, pois não foi encontrado em amostras de leite bovino cru colhido diretamente do úbere, mas esteve presente em ampla variedade de alimentos e em diferentes ambientes como as fábricas de laticínios e o doméstico.

A presença de cepas de *C. sakazakii* resistentes aos antimicrobianos do grupo dos β -lactâmicos e portadores do gene *bla*_{TEM} sugere que pode ocorrer risco de infecções por estes agentes, além de indicar associação de leite cru com a disseminação destas bactérias.

A frequência de cepas resistentes aos antimicrobianos testados e a presença do gene *bla*_{TEM} em *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *P. agglomerans* e *C. sakazakii* pode estar relacionada à práticas adotadas nos sistemas de produção que promovem pressão seletiva sobre estes micro-organismos, como o uso de antimicrobianos no tratamento de infecções como a mastite (30), na profilaxia da vaca seca (31) e como promotores de crescimento (32). No entanto, Call et al. (30) sugeriram que outros fatores podem estar envolvidos com a ocorrência de bactérias resistentes, uma vez que há a persistência dessas cepas em fazendas de produção orgânica, mesmo após longo tempo de manejo livre de antimicrobianos. Nesse sentido, a aquisição e a disseminação de bactérias resistentes por alimentos representam riscos à saúde humana (14, 15, 33).

Assim, os cuidados com a produção e com a saúde animal devem visar minimizar contaminações do produto da ordenha e evitar a seleção de micro-organismos resistentes gerada pelo uso indiscriminado de antimicrobianos, dado o risco de infecções aos consumidores e aos trabalhadores envolvidos na cadeia do leite.

CONCLUSÃO

A identificação bioquímica de espécies de *Enterobacter*, *Cronobacter* e *Pantoea* é laboriosa e sujeita a variações individuais, além de não permitir a diferenciação de todas as cepas analisadas.

A resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos, largamente utilizados em medicina humana e veterinária, encontrada na pesquisa de genes e nos testes fenotípicos, assinalam notáveis riscos para a saúde pública, devido à possibilidade de infecções, sendo a educação dos consumidores e produtores ponto fundamental para a promoção da saúde pública.

Em pesquisas futuras estes testes devem ser acompanhados de técnicas de biologia molecular para fins de comparação entre os métodos, e para diagnosticar as espécies não determinadas pelos testes bioquímicos convencionais.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela bolsa PIBIC n° 129037/2013-3 e à FAPESP pela bolsa processo n° 2011/17957-0 e auxílio n° 2012/03128-5.

REFERÊNCIAS

1. MilkPoint. Produção de leite no Brasil deve ser de 37 bilhões de litros em 2014. 2014 [cited 2014 out 10]. Available from: <http://www.milkpoint.com.br/cadeia-do-leite/giro-lacteo/>
2. Claeys WL, Cardoen S, Daube G, Block J, Dewettinck K, Dierick K, et al. Raw or heated cow milk consumption: Review of risks and benefits. *Food Control*. 2013;31:251-62.
3. Salman AMA, Hamad IM. Enumeration and identification of coliform bacteria from raw milk in Khartoum State, Sudan. *J Cell Anim Biol*. 2011;5:121-8.
4. Mezzatesta ML, Gona F, Stefani S. *Enterobacter cloacae* complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. *Future Microbiol*. 2012;7:887-902.
5. Holt JG, Krieg NK, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9a ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1994.
6. Nazarowec-White M, Farber JM. *Enterobacter sakazakii*: a review. *Int J Food Microbiol*. 1997;34:103-13.
7. Healy B, Cooney S, O'Brien S, Iversen C, Whyte P, Nally J, et al. *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*): An opportunistic foodborne pathogen. *Foodborne Pathog Dis*. 2010;7:339-50.

8. Wahyuni AETH, Budiarmo TY. Detection of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacter* sp from dairy cow's milk in Boyolali and Sleman. In: The 1st International Seminar on Animal Industry; 2009; Bogor. Bogor: Faculty of Animal Science, Bogor Agricultural University; 2009. P.74-7.
9. Cruz AT, Cazacu AC, Allen CH. *Pantoea agglomerans*, a plant pathogen causing human disease. *J Clin Microbiol.* 2007;45:1989-92.
10. Cetinkaya E, Joseph S, Ayhan K, Forsythe SJ. Comparison of methods for the microbiological identification and profiling of *Cronobacter* species from ingredients used in the preparation of infant formula. *Mol Cell Probes.* 2013;27:60-4.
11. Kandhai MC, Reij MW, Gorris LG, Guillaume-Gentil O, van Scothorst M. Occurrence of *Enterobacter sakazakii* in food production environments and households. *Lancet.* 2004;363:39-40.
12. Yan QQ, Condell O, Power K, Butler F, Tall BD, Fanning S. *Cronobacter* species (formerly known as *Enterobacter sakazakii*) in powdered infant formula: a review of our current understanding of the biology of this bacterium. *J Appl Microbiol.* 2012;113:1-15.
13. Al-Holy MA, Lin M, Abu-Ghoush MM, Al-Qadiri HM, Rasco BA. Thermal resistance, survival and inactivation of *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) in powdered and reconstituted infant formula. *J Food Safety.* 2009;29:287-301.
14. Njage PMK, Dolci S, Jans C, Wangoh J, Lacroix C, Meile L. Ampicillin resistance and extended spectrum β -lactamases in *Enterobacteriaceae* isolated from raw and spontaneously fermented camel milk. *Afr J Microbiol Res.* 2012;6:1446-52.
15. Geser N, Stephan R, Hächler H. Occurrence and characteristics of extended spectrum β -lactamase (ESBL) producing *Enterobacteriaceae* in food producing animals, minced meat and raw milk. *BMC Vet Res.* 2012;8:21.
16. Pereira AS, Carmo Filho JR, Tognim MCB, Sader HS. Avaliação da acurácia de testes laboratoriais para detecção de amostras de *Klebsiella pneumoniae* produtora de β -lactamase de espectro estendido. *J Bras Patol Med Lab.* 2003;39:301-8.
17. Fay GD, Barry AL. Rapid ornithine decarboxylase test for the identification of *Enterobacteriaceae*. *Appl Microbiol.* 1972;23:710-3.
18. Brooks K, Sodeman T. A rapid method for determining decarboxylase and dihydrolase activity. *J Clin Pathol.* 1974;27:148-52.
19. Mc Faddin JF. Biochemical tests for identification of medical bacteria. Baltimore: William & Wilkins; 1980.
20. Farmer JJ, Davis BR, Hickman-Brenner FW, McWhorter A, Huntley-Carter GP, Asbury MA. Biochemical identification of new species and biogroups of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 1985;21:46-76.

21. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard. 8th ed. CLSI document M2-A9. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2006.
22. Ribeiro MG. Princípios terapêuticos na mastite em animais de produção e de companhia. In: Andrade SF. Manual de Terapêutica Veterinária. 3a ed. São Paulo: Roca; 2008. p.759-71.
23. Winn Jr WC, Allen SD, Janda WM, Koneman EW, Procop G, Schreckenberger PC, et al. Diagnóstico Microbiológico. Texto e Atlas Colorido. 6a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.
24. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard. 8th ed. CLSI document M2-A8. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2003.
25. Féria C, Ferreira E, Correia JD, Gonçalves J, Caniça M. Patterns and mechanisms of resistance to β -lactams and β -lactamase inhibitors in uropathogenic *Escherichia coli* isolated from dogs in Portugal. *J Antimicrob Chemother.* 2002;49:77-85.
26. Cao V, Lambert T, Nhu DQ, Loan HK, Nguyen KH, Arlet G, et al. Distribution of extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of Enterobacteriaceae in Vietnam. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46:3739-43.
27. Batchelor M, Hopkins K, Threlfall EJ, Clifton-Hadley FA, Stallwood AD, Davies RH, et al. blaCTX-M genes in clinical *Salmonella* isolates recovered from humans in England and Wales from 1992 to 2003. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49:1319-22.
28. Castro KNC, Comunello E. Associativismo entre vendedores de leite em MS: melhor para o bolso do produtor e para a saúde do consumidor. 2010 [cited 2010 abr 16]. Available from: www.infobibos.com/artigos/2010_2
29. Drudy D, Mullane NR, Quinn T, Wall PG., Fanning S. *Enterobacter sakazakii*: An emerging pathogen in powdered infant formula. *Clin Infect Dis.* 2006;42:996-1002.
30. Call DR, Davis MA, Sawant AA. Antimicrobial resistance in beef and dairy cattle production. *Anim Health Res Rev.* 2008;9:159-67.
31. Oliver SP, Murinda SE. Antimicrobial resistance of mastitis pathogens. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2012;28:165-85.
32. Van den Bogard AE, Stobberingh EE. Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. *Int J Antimicrob Agents.* 2000;14:327-35.
33. McEwen SA, Fedorka-Cray PJ. Antimicrobial use and resistance in animals. *Clin Infect Dis.* 2002;34:93-106.

Recebido em: 25/07/2014

Aceito em: 20/02/2015