



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

MÁRCIA KARINA GUEDES

**BROMETO DE ETÍDIO NA IDENTIFICAÇÃO DE BOMBAS DE EFLUXO EM
BACTÉRIAS PARA CONTROLE DE MASTITE BOVINA: REVISÃO INTEGRATIVA**

AREIA

2021

MÁRCIA KARINA GUEDES

**BROMETO DE ETÍDIO NA IDENTIFICAÇÃO DE BOMBAS DE EFLUXO EM
BACTÉRIAS PARA CONTROLE DE MASTITE BOVINA: REVISÃO INTEGRATIVA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito parcial à
obtenção do título de Bacharel em
Medicina Veterinária pela Universidade
Federal da Paraíba.

Orientador: Prof. Dr. Artur Cezar de
Carvalho Fernandes.

AREIA

2021

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

G924b Guedes, Márcia Karina.

Brometo de etídio na identificação de bombas de efluxo em bactérias para controle de mastite bovina: revisão integrativa / Márcia Karina Guedes. - Areia: UFPB/CCA, 2021.
44 f. : il.

Orientação: Artur Cezar de Carvalho.
TCC (Graduação) - UFPB/CCA.

1. Medicina veterinária. 2. Mastite. 3. Saúde única. 4. Resistência bacteriana. 5. Antimicrobiano. I. Fernandes, Artur Cezar de Carvalho. II. Título.

UFPB/CCA-AREIA

CDU 636.09(02)

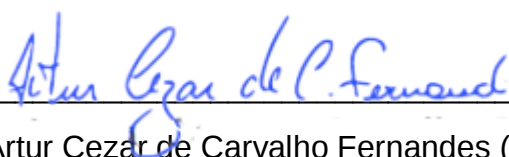
MÁRCIA KARINA GUEDES

BROMETO DE ETÍDIO NA IDENTIFICAÇÃO DE BOMBAS DE EFLUXO EM
BACTÉRIAS PARA CONTROLE DE MASTITE BOVINA: REVISÃO INTEGRATIVA

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito parcial à
obtenção do título de Bacharel em
Medicina Veterinária pela Universidade
Federal da Paraíba.

Aprovado em: 06 / 12 / 2021.

BANCA EXAMINADORA



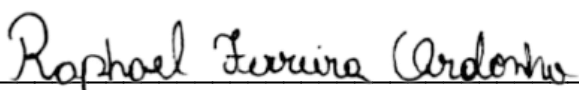
Prof. Dr. Artur Cezar de Carvalho Fernandes (Orientador)

Universidade Federal da Paraíba (UFPB)



M.V. Ewerton de Souza Lima

Universidade Federal da Paraíba (UFPB)



M.V. Raphael Ferreira Ordonho

Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

A minha mãe, pela vida. E a minha tia (*in
memoriam*), pelo suporte à vida. DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Embora esse espaço seja minúsculo e as palavras não alcancem o real sentido do seu amor, preciso iniciar meus agradecimentos voltados à pessoa mais importante da minha vida e sem a qual eu não seria e nem teria chegado onde hoje estou. Ela que nunca, em nenhuma fração de segundos, mediu esforços para me ajudar, fazendo até o impossível e superando seus limites. Meu suporte emocional e financeiro incondicionais, e meu modelo de mãe. A melhor mãe do mundo, com certeza! Mãe, a você dedico todas as minhas conquistas já alcançadas e as que busco alcançar.

Igualmente agradeço à existência da minha companheira de vida, Lucia. Agradeço ao destino que cruzou nossas linhas soltas num laço. Sua presença incondicional ao meu lado me dá forças para enfrentar as adversidades dessa vida e, se estou aqui hoje, também devo muito a você. Te amo.

Também agradeço e dedico essa conquista à minha tia (*in memoriam*). Em vida, também não media esforços para me ajudar, financeira e emocionalmente. Em memória, ainda é parte do que me faz forte e me sustenta. Muito obrigada, tia.

Obrigada, Matheus, meu irmão de sangue. Obrigada, Anderson, nosso irmão de alma. Agradeço todo o apoio de sempre, os favores, as conversas, os 'rolês'. A existência de vocês me faz uma pessoa mais feliz. Amo vocês.

Agradeço aos amigos e colegas que a UFPB me deu. Obrigada Gisele e Maria Clara pelo companheirismo, pelos momentos de descontração, fofocas e risadas, pelo suporte que nos demos mutuamente estando longe de casa. Obrigada Juliana ('Juber'), pelas inúmeras caronas em Areia/CCA. Sem você essa jornada teria sido, literalmente, muito mais cansativa. Para além da UFPB, agradeço também à vida, por ter me presenteado com um super amigo. Muito obrigada, Gabriel, por ter me ensinado muito sobre paciência, empatia, amizade e companheirismo. Sou uma pessoa melhor depois que te conheci, saiba disso. Sou muito feliz em poder te chamar de meu amigo.

À banca, que representa parcela significativa de como me formo, hoje, como profissional. Agradeço ao professor Artur que me acolheu como orientanda. Desde que assisti a primeira aula com o senhor sou encantada com a maestria com a qual conduz seu trabalho, com o afeto para com o próximo, com a didática na ponta da língua, com a sabedoria e a certeza de quem sabe o que faz. Obrigada, Ewerton,

pelos inúmeros ensinamentos, com extrema generosidade e empenho. Me acolheu como colega junto ao PROBEX/PIBIC e, desde então, só me ajuda. Muito obrigada, Raphael, por ter aceitado meu convite e pelos ensinamentos ao longo do pouco tempo que convivemos. Vocês são profissionais incríveis e vão longe na Microbiologia Veterinária.

Muito obrigada, Luiz Henrique, também, pelo acolhimento por meio dos estágios finais. Mesmo que essa aproximação tenha sido no final da graduação, parece que te conheço há muito tempo. Muito do que sei hoje em Patologia Clínica (muito mesmo), devo a você, que me ensinou, humildemente, e nutriu mais ainda meu amor por essa área. Aprender com quem ama o que faz, faz toda diferença. E vocês, definitivamente, fizeram toda diferença na minha vida.

Meus agradecimentos se estendem aos professores, funcionários e técnicos que sustentam a graduação de Medicina Veterinária e o Hospital Veterinário. Em especial a professora Sara Vilar, peça fundamental durante minha graduação, minha eterna professora-orientadora. À residente Andriele, obrigada por todo apoio. E a todos que de alguma forma, contribuíram para eu estar aqui, hoje.

Obrigada Tob, Xanis, Chaplin, Ayala e Lessie (*in memoriam*). Cada um, à sua maneira e na sua medida, me ensina ou me ensinou. No fim, tudo isso é por vocês.

Muito obrigada!

“O universo é um mutante de erros dos
quais a vida apareceu”. Charles Darwin.

RESUMO

Cada vez mais a problemática da resistência antimicrobiana vem tomando espaço no âmbito da saúde pública mundial, incluindo a Medicina Veterinária. Diante desse panorama, é essencial buscar novas estratégias de combate aos microrganismos causadores e mastite bovina para além do emprego de antibióticos. Nesse sentido, a identificação de bombas de efluxo através de metodologias utilizando Brometo de Etídio se insere como possibilidade no meio científico. O presente trabalho apresenta uma revisão sistemática do tipo integrativa a partir da literatura já existente acerca dessa temática. Para tanto, foram selecionados 28 artigos, publicados e disponibilizados online, que abordam a identificação de sistemas de efluxo utilizando brometo de Etídio e sua relação com resistência bacteriana. A partir dos estudos, constatamos que existem diversas aplicabilidades metodológicas para o brometo de Etídio no processo de identificação qualitativa e quantitativa dos sistemas de efluxo. A aplicação dessas metodologias dentro da microbiologia veterinária, a depender do objetivo do estudo, pode fornecer informações importantes sobre o papel desses sistemas para a resistência de diversas espécies bacterianas e, portanto, traz implicações clínicas para o combate desses patógenos na mastite bovina. Ademais, é possível e essencial explorar mais estudos acerca dessa temática em busca de aplicações eficazes, sobretudo em diferentes partes geográficas das que já emitiram algum estudo a respeito, utilizando amostras experimentais locais, haja visto que a epidemiologia da resistência bacteriana pode mudar de acordo com o local e conhecer essas realidades é essencial para um combate eficaz, independente da estratégia utilizada.

Palavras-Chave: mastite; saúde única; resistência bacteriana; microbiologia veterinária; antimicrobiano.

ABSTRACT

The issue of antimicrobial resistance is increasingly taking place in the world public health, including Veterinary Medicine. Given this scenario, it is essential to seek new strategies to combat the causative microorganisms and bovine mastitis, in addition to the use of antibiotics. In this sense, the identification of efflux pumps through methodologies using Ethidium Bromide is inserted as a possibility in the scientific community. This paper presents a systematic integrative review based on the existing literature on this topic. Therefore, 28 articles were selected, published and made available online, which address the identification of efflux systems using Ethidium bromide and its relationship with bacterial resistance. Based on the studies, we found that there are several methodological applicability for Ethidium bromide in the qualitative and quantitative identification process of efflux systems. The application of these methodologies within veterinary microbiology, depending on the objective of the study, can provide important information about the role of these systems for the resistance of several bacterial species and, therefore, has clinical implications for combating these pathogens in bovine mastitis. Furthermore, it is possible and essential to explore more studies on this topic in search of effective applications, especially in different geographic parts of those that have already issued a study on the subject, using local experimental samples, given that the epidemiology of bacterial resistance may change according to the location and knowing these realities is essential for effective combat, regardless of the strategy used.

Keywords: mastitis; unique health; bacterial resistance; veterinary microbiology; antimicrobial.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Efluxo de EtBr ao longo do tempo por *Salmonella* Typhimurium SL1344 e um conjunto isogênico de mutantes.....27

Figura 2 – Medição de acumulação de corante Hoechst H33342 em *Salmonella* Typhimurium SL1344 (azul) e um *acrB* isogênico mutante (vermelho)..... 28

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Protocolo de revisão integrativa através do método PICOD.....	18
Quadro 2 – Resistência antimicrobiana associada em isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> (2000-2004), na ausência e presença de resistência a outro medicamento e o risco relativo (RR) de resistência em organismos suscetíveis vs. Resistentes.....	23
Quadro 3 – Lista de estudos baseados em fluorescência em bactérias para entender bombas de efluxo ativo.....	26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	ATP binding cassette
ATP	Adenosina trifosfato
BDTD	Biblioteca Digital Brasileira de Teses e Dissertações
CAZ	Ceftazidima
CCCP	Carbonil cianida m-clorofenil-hidrazona
CIM	Concentração inibitória mínima
EtBr	Brometo de Etídio
FAO	Organização para a Alimentação e a Agricultura
IMP	Imipenem
LABMAA	Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Ambiental
MALDI-TOF	Matrix Associated Laser Desorption-Ionization – Time of Flight
MATE	Multidrug and toxic compound extrusion
MDROs	Multidrug-resistant organisms (organismos multirresistentes)
MFS	Major facilitator superfamily
MRSA	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilina)
ODS	Objetivos de Desenvolvimento Sustentável
OIE	Organização Internacional de Epizootias
OMS	Organização Mundial de Saúde
ONU	Organização das Nações Unidas
PBE	Prática Baseada em Evidências
PCR	Polymerase chain reaction (reação em cadeia da polimerase)
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

RND	Resistance-Nodulation-Division
SciELO	Scientific Electronic Library Online
SCNRO	Staphylococcus Coagulase-Negativa Resistente a Oxacilina
SMR	Small Multidrug Resistance
TSA	Tryptic Soy Agar
UFRB	Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 METODOLOGIA	19
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
3.1 MASTITE BOVINA E RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA	23
3.2 O PAPEL DOS SISTEMAS DE EFLUXO PARA RESISTÊNCIA BACTERIANA	26
3.3 BROMETO DE ETÍDIO NA IDENTIFICAÇÃO DE SISTEMAS DE EFLUXO	27
3.3.1 Medição direta e indireta do sistema de efluxo	28
3.4 APLICAÇÕES METODOLÓGICAS DO EtBr	31
4 CONCLUSÃO	35
REFERÊNCIAS	36

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, uma das principais discussões presentes no âmbito da saúde mundial diz respeito ao crescimento da resistência antimicrobiana, que promove a seleção de microrganismos multirresistentes. Em Conferência Mundial realizada em 2012, a Organização das Nações Unidas (ONU) anunciou uma ação que conta com 17 Objetivos de Desenvolvimento Sustentável a serem atingidos até o ano de 2030, voltados para desenvolvimento político, econômico, social e ambiental. Dentre eles, alguns ligados diretamente ao combate contra a resistência antimicrobiana, tais como ações ‘Contra a Mudança Global do Clima’ e ‘Consumo e Produção Responsáveis’. Isso reflete o quanto é desafiador o enfrentamento a essa questão.

A correlação entre esses objetivos envolve uma visão integral entre saúde humana, ambiental e animal, conhecida como ‘Saúde Única’ (One Health). Termo que representa a condição indissociável entre esses elos, evidenciando ações eficazes e necessárias voltadas ao bem estar e conservação global. Esse conceito foi institucionalizado e difundido, também, pela FAO¹, OIE² e OMS³ (MENIN,2018). Assim, as ações (danosas ou benéficas) de qualquer dos elos envolvidos, afetam diretamente os demais. Nesse sentido, o aumento acelerado na resistência bacteriana e a ineficácia de muitos antimicrobianos frente a essa situação, interfere diretamente no bem estar de todos os indivíduos, e, portanto, deve ser uma questão discutida e enfrentada também por todos.

Anualmente a Organização Mundial de Saúde (OMS) promove a Semana Mundial de Conscientização sobre o Uso de Antimicrobianos, a fim de conscientizar todos os países acerca da importância na implementação e manutenção de práticas que visem combater essa resistência microbiana, bem como discutir sobre seus efeitos destrutivos na saúde mundial. Em 2020, com o tema “Unidos para preservar os antimicrobianos”, a organização propôs uma discussão mais ampliada, envolvendo não só antibióticos como também antivirais, antifúngicos, antiparasitários e até quimioterápicos, haja vista a gravidade da situação mundial (OMS, 2020).

¹ Organização para a Alimentação e a Agricultura.

² Organização Internacional de Epizootias.

³ Organização Mundial da saúde.

Gradativamente os estudos nessa área de pesquisa vêm aumentando e definindo parâmetros que nos servem como instrumentos de combate a todas as formas, já conhecidas, de defesa e resistência que esses microrganismos já desenvolveram.

Ao longo do tempo, alguns mecanismos foram desenvolvidos pelas bactérias para sua sobrevivência, promovendo resistência contra substâncias danosas que possam comprometer sua colonização. De acordo com Loureiro *et. al.* (2016), os seus principais mecanismos de resistência são 4, quais sejam: 1) destruição ou modificação do fármaco por via enzimática; 2) controle da acumulação no interior da célula (diminuindo a permeabilidade celular ao fármaco ou por meio dos sistemas de efluxo); 3) modificações das moléculas alvo desses antibióticos; e 4) através da fabricação de moléculas alvo alternativas, não afetadas pelo fármaco, simultaneamente à produção das moléculas originais (objetivo do fármaco), o que acaba driblando a ação do antibiótico. As bombas de efluxo inserem-se, portanto, no segundo mecanismo descrito, na medida em que evitam a acumulação intracelular do fármaco.

Bombas de efluxo, genericamente, são proteínas transmembranas de células eucariotas e procariotas que atuam fisiologicamente transportando moléculas para fora das células (WALMSLEY *et al.*, 2003), mantendo a homeostase celular e retirando substâncias tóxicas à sua sobrevivência (NEVES *et al.*, 2011).

Existem bombas de efluxo que carregam diversas substâncias, definidas como bombas de efluxo de resistência a múltiplas drogas (multiple drug resistance – MDR) e existem as que transportam substratos específicos (WEBBER & PIDDOCK, 2003), o que confere uma resistência específica. Podem ser divididas em 5 famílias e caracterizadas com base na sua fonte de energia, sendo primária quando da utilização de ATP (PIDDOCK, 2006) ou secundária quando a fonte energética advém do movimento de íons (força próton motora) (MOREIRA, 2008). Portanto, a classificação das bombas de efluxo se apresenta da seguinte maneira:

1. ABC (“ATP binding cassette”) – transporte primário;
2. MFS (“major facilitator superfamily”) – transporte secundário;
3. SMR (“small multidrug resistance”) – transporte secundário;
4. RND (“resistance-nodulation-division”) – transporte secundário;

5. MATE (“multidrug and toxic compound extrusion”) – transporte secundário.

De acordo com Sun et al., (2014), os sistemas de efluxo da família RND encontram-se apenas em bactérias Gram-negativas, ao passo que as demais famílias são responsáveis por sistemas de efluxo em Gram-negativas e Gram-positivas. Bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. possuem sistemas de efluxo pertencentes a mais de uma família, dentre os quais, temos a bomba de efluxo NorA da família MFS, sintetizada pela expressão do gene *norA*, e que protege a bactéria, dentre outras substâncias, contra substâncias lipófilas e monocatiônicas, como é o caso do o Brometo de Etídio (TINTINO, 2018) e concede resistência contra o cloranfenicol e às fluoroquinolonas (PIDDOCK, 2006).

Ainda em relação a essa questão, essa resistência ao cloranfenicol e às fluoroquinolonas possui importância expressiva para a medicina humana e pecuária leiteira, haja visto que encontramos o cloranfenicol e representantes da classe das fluoroquinolonas sendo prescritos pela prática clínica (humana e veterinária), com frequência, para o controle de diversas infecções, incluindo a mastite bovina de forma indiscriminada. São fármacos de amplo espectro e, com isso, utilizados em larga escala a nível mundial e para inúmeras infecções (SILVA E HOLLENBACH, 2010). Contudo, essa versatilidade encontra limites diante do *Staphylococcus* spp. e seus mecanismos de resistência, também versáteis.

Staphylococcus spp. são cocos gram-positivos pertencentes à Família *Micrococcaceae*, anaeróbicos facultativos, não produtores de esporos e catalase positiva. Encontrados nos mais diversos ambientes, organismos e espécies (MCVEY et. al., 2017). Dentre as espécies que esse gênero abarca, ressalta-se o *Staphylococcus aureus*, comumente citado por sua patogenicidade para infecções clínicas/hospitalares em humanos, mas também é patógeno presente na área da veterinária, notadamente na bovinocultura de leite como importante causador de mastite contagiosa de difícil controle (SANTOS et. al., 2019). É considerada uma das espécies mais habilidosas para desenvolvimento de estratégias de resistência aos antibióticos (CUSSOLIM et. al., 2021), tornando-se indispensável seu estudo dentro do contexto integrado da saúde única. Ainda, o uso demasiado e inadequado de antibióticos é realizado majoritariamente em animais, notadamente na agropecuária,

o que contribui diretamente para seleção desses microrganismos (O'NEILL, 2015; LOUREIRO *et. al.*, 2016).

Mastite bovina é a inflamação da glândula desencadeada por microrganismos, majoritariamente por bactérias (SANTOS & FONSECA, 2019). Embora seja um problema conhecido e, há tempos, estudado, segue sendo uma preocupação constante na bovinocultura de leite e causador de prejuízos consideráveis aos produtores. O controle da mastite bovina se baseia, em regra, unicamente na utilização de antibióticos e, muitas vezes, sem critério ou controle microbiológico dos animais, para identificação do perfil causador da mastite naquele rebanho específico. Essa prática comum acaba auxiliando na pressão seletiva desses microrganismos e, por fim, no aumento de resistência bacteriana.

Sendo assim, é fundamental conhecer a dinâmica dessas estratégias de resistência bacteriana para seu combate eficaz, o que inclui identificar a presença das bombas de efluxo e seus genes carreadores nas cepas comumente encontradas em isolados de mastite bovina.

A identificação fenotípica das bombas de efluxo é possível através de algumas metodologias, uma delas é realização de testes de inibição na presença e ausência de um desacoplador de força próton motiva: carbonil cianida m-clorofenil-hidrazona (CCCP). Esse desacoplador inibe a fonte de energia utilizada pelo sistema de efluxo - nas famílias MATE, RND e SMR (ZHANG, 2010) – e, na sua presença, a redução da CIM em no mínimo duas vezes já indica presença de bomba de efluxo. Além dessa, é possível também sua identificação fenotípica através da metodologia referenciada em 1992 por Sundheim *et. al.* (discutida mais adiante), utilizando Brometo de Etídio (EtBr) e Ágar TSA (Tryptic Soy Agar), meio de cultura enriquecido e não seletivo, utilizado para o cultivo de microrganismos fastidiosos e não fastidiosos. Não obstante essas formas, gradativamente pesquisas vêm sendo desenvolvidas no intuito de melhor utilizar o EtBr mediante outras possibilidades, discutidas adiante.

Tendo estes pontos em vista, o presente trabalho propôs uma revisão bibliográfica acerca de estudos, pesquisas e metodologias desenvolvidas na utilização do EtBr para identificação de bombas de efluxo em bactérias, bem como identificar possíveis aplicações práticas dessa metodologia dentro da microbiologia veterinária e, mais especificamente, voltadas para controle da mastite bovina.

2 METODOLOGIA

Esse trabalho propôs uma revisão bibliográfica sistemática do tipo integrativa, que se caracteriza como uma forma de pesquisa utilizando a literatura do tema escolhido como fonte de estudo, de forma metódica, sistematizada (SAMPAIO & MANCINI, 2007) e apresentada por meio de uma análise narrativa. É um estudo, portanto, retrospectivo e secundário às publicações primárias⁴.

A revisão sistemática se apresenta como uma estratégia eficaz frente à crescente evolução científica, com produção acentuada e veloz de informações. Isso porque busca sintetizar muito da produção que compõe a literatura de determinado tema, abarcando suas atualizações (BOTELHO *et. al.*, 2011). Contudo, é importante destacar que este trabalho não pretende esgotar as fontes e produções bibliográficas da temática, mas tão somente revisar as produções consideradas mais relevantes, pelo autor, dentro da pesquisa realizada.

A seleção e análise dos trabalhos foi realizada seguindo seis etapas, as quais compõem o processo para uma revisão sistemática do tipo integrativa, fundamentando-se na Prática Baseada em Evidências - PBE (GALVÃO *et. al.*, 2003 e POMPEO *et. al.*, 2009). A PBE iniciou-se na conjuntura da clínica médica, em 1980, no Canadá, mas seu modelo, utilizado hoje em todas as subáreas da saúde, foi desenvolvido por Melnyk e Fineout-Overholt (2002) e se caracteriza como:

“uma abordagem de resolução de problemas que incorpora as melhores evidências científicas disponíveis, experiência médica e preferências e valores dos pacientes” (MELNYK & FINEOUT-OVERHOLT, 2004).

O desenvolvimento de uma revisão sistemática fundamentada na PBE perpassa 6 etapas:

1. Identificação do tema e seleção da questão de pesquisa.

⁴ Entende-se por estudos primários aqueles obtidos a partir de investigações com dados originais, como Relato de caso, Estudo de casos e Estudo de casos e controles, Detecção de casos (“screening”), Estudo de coorte e Ensaio clínico controlado randomizado. Já os estudos secundários surgem a partir dos primários e definem-se como análises/revisões teórico-metodológicas destes. Temos como principais exemplos de estudos secundários as Revisões (sistemáticas/não sistemáticas/metanálise/qualitativa/integrativa), Guias (“Guidelines”), Análises de decisão e Análises econômicas (CAMPANA, 1999).

2. Estabelecimento dos critérios de inclusão e exclusão.
3. Identificação dos estudos pré-selecionados e selecionados.
4. Categorização dos estudos selecionados.
5. Análise e interpretação dos resultados.
6. Apresentação da revisão/síntese do conhecimento.

Primeira e segunda etapas - A partir da definição do tema ‘uso do EtBr para identificação dos sistemas de efluxo em bactérias’ e da seleção da questão de pesquisa ‘quais as possibilidades metodológicas para o uso do EtBr na identificação dos sistemas de efluxo em bactérias’, a primeira etapa foi orientada pelo método PICOD (STILLWELL *et. al.*, 2010b e RAMALHO, 2005), direcionando as buscas a partir dos critérios de inclusão e exclusão escolhidos:

Quadro 1 - Protocolo de revisão integrativa através do método PICOD

P	População (participantes)	Quem foi estudado?	I. Bactérias; II. Bactérias resistentes; III. Bactérias sensíveis;	Palavras-chave: “bombas de efluxo” (efflux pumps); “bactérias” (bacteria); “brometo de Etídio” (ethidium bromide); “resistência bacteriana/antimicrobiana” (bacterial/antimicrobial resistance).
I	Intervenção	O que foi feito?	I. Testes/triagens com EtBr; II. Utilização de corantes fluorescentes	
C	Comparação das intervenções	Comparação entre os resultados		
O	Resultados	Quais os resultados ou efeitos	I. Identificação das bombas de efluxo; II. Mensuração do efluxo; III. Identificação de substratos alvo; IV. Associação do efluxo à mecanismos de resistência ou não; V. Aplicação clínica.	
D	Desenho do Estudo	Como é?	Estudos do tipo qualitativo, quantitativo ou mistos.	

Fonte 1 - elaborada pelo autor a partir de modelo apresentado em Ramalho (2005).

As pesquisas foram realizadas nas seguintes bases de dados eletrônicas: SciELO, ScienceDirect, Periódico CAPES, Springer, Google acadêmico e BDTD. Os termos e palavras-chave utilizados nas buscas foram os descritos no Quadro 1. Essa escolha foi realizada considerando que para uma procura satisfatória é necessário que haja termos de busca adequados em bases de dados eficientes, com filtros específicos voltados para o tema (SAMPAIO & MANCINI, 2007). Os descritores booleanos utilizados foram “AND” e “OR”⁵ :

(Bombas de efluxo) AND bactéria AND (brometo de Etídio) AND (resistência bacteriana OR antimicrobiana).

(Efflux pumps) AND bacteria AND (ethidium bromide) AND (bacterial OR antimicrobial resistance).

Terceira etapa - Para pré-seleção, os artigos recuperados precisavam atender, cumulativamente, aos seguintes critérios: conter os termos buscados no título, resumo ou palavras chave, possuir dados primários, apresentar textos na íntegra e disponibilizados online. Não foram definidos limites temporais para recuperação dos artigos indexados nas bases pesquisadas⁶.

Quarta etapa - Esses estudos pré-selecionados de forma mais ampla foram categorizados e submetidos a mais uma análise do resumo, metodologia e resultados. Foram excluídos os trabalhos que não se adequaram ao tema e/ou à pergunta norteadora, trabalhos secundários (como artigos de revisão), abordagens irrelevantes ao contexto desse trabalho ou que de alguma forma não atendia a algum dos requisitos estabelecidos metodologicamente, relacionando bombas de efluxo e resistência antimicrobiana.

Quinta etapa - Os artigos classificados e aptos a serem incluídos foram organizados em uma planilha de banco de dados, com descrição de título, autor(es), ano, idioma, instituição, periódico, país e DOI/ISSN. Foram avaliados detalhadamente e serviram como base para elaboração da revisão integrativa que se segue (**sexta etapa**), especialmente no que tange às metodologias e resultados obtidos em cada estudo. Nesse último momento não foram categorizados ou elencados a partir de

⁵ O operador AND busca e seleciona estudos que possuam todos os descritores.

⁶ Essa decisão foi tomada considerando que estudos utilizando EtBr para identificação de bombas de efluxo são relativamente recentes, não sendo necessário definir um intervalo fixo. Contudo, para registro, os artigos incluídos datam dos anos de 1977 à 2020.

nenhum método específico. São apresentados no decorrer da discussão através do método narrativo por escolha do autor, de acordo com o desenvolvimento dos tópicos e subtópicos.

Dessa forma, o objetivo desta revisão foi atualizar a discussão acerca do uso do EtBr para identificação dos sistemas de efluxo em bactérias, diante das evidências colecionadas nos artigos analisados, bem como a aplicabilidade dessas metodologias para controle da mastite bovina.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram recuperados 1660 artigos a partir da terceira etapa metodológica. Após análise do resumo, metodologia e resultados, foram excluídos 1635 por estarem repetidos em alguma das bases de dados ou por não se adequarem ao tema estabelecido para discussão. Logo, foram selecionados 25 artigos, os quais foram lidos, analisados sob o ponto de vista metodológico e de resultados e utilizados para elaboração da presente discussão. Além desses, mais 3 revisões narrativas foram inclusas, pois reuniam discussões acerca de abordagens metodológicas pertinentes à essa discussão.

3.1 MASTITE BOVINA E RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

Como já mencionado, a mastite bovina segue sendo um dos principais problemas da bovinocultura leiteira. Alguns dos patógenos bacterianos mais encontrados (entre contagiosos e ambientais), estão: *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium bovis*, *Mycoplasma spp.*, Coliformes, *Streptococcus* ambientais e *Enterococcus spp.* (SANTOS & FONSECA, 2019). Juntos, formam o perfil de microrganismos causadores dos principais quadros de mastites clínicas e subclínicas.

Dentre os patógenos predominantemente infecciosos, *Staphylococcus aureus* possui alta prevalência mundial (SANTOS *et. al.*, 2019; KEEFE, 2012; BOTARO *et. al.*, 2015), fato que por si justifica a necessidade de mais estudos voltados para essa espécie e, de forma específica, para soluções do seu controle na bovinocultura de leite. Ademais, o gênero *Staphylococcus spp.*, como já mencionado, é responsável por recorrentes casos de infecções na medicina humana e veterinária. Bactérias pertencentes a esse gênero causam desde simples infecções de pele e outros órgãos até casos mais danosos, como infecção generalizada e morte, principalmente quando a cepa infectante pertence a algum perfil de resistência, como os *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), quando antibióticos existentes podem não mais serem eficazes (STEGMANN *et. al.*, 2010).

Tratar de resistência em espécies do gênero *Staphylococcus spp.* é, cada vez mais, lugar comum. Gradativamente esses patógenos vêm desenvolvendo mais

mecanismos intrínsecos e extrínsecos de resistência aos antimicrobianos e faz-se necessário, com urgência, frear esse movimento e, ao mesmo tempo, contornar os mecanismos de resistência já existentes. Em trabalho realizado com amostras de leite mastítico de animais oriundos do Brejo paraibano, Ordonho (2021) constatou a frequência predominante do *S. aureus*, seguida de outras espécies de *Staphylococcus* spp. Ainda, sugere que, fenotipicamente, poderia haver genes associados a multirresistência, quando identificou a presença de quatro cepas de MRSA e duas de *Staphylococcus* Coagulase-Negativa Resistente a Oxacilina (SCNRO).

Dentro desse gênero, as cepas pertencentes ao grupo definido como MRSA são, notadamente, as mais preocupantes no âmbito da saúde pública. A primeira menção de MSRA em animais data da década de 70 (AIRES DE SOUZA, 2017). Gradativamente esse perfil de resistência, não só dentro da medicina veterinária, vem aumentando. Um dos meios que favorecem esse aumento é o uso indiscriminado de antibióticos em animais de produção, o que aumenta a pressão de seleção sobre a microbiota (SANTOS & FONSECA, 2019), selecionando os patógenos resistentes. Outrossim, é valioso considerar que esse uso de antibióticos é consideravelmente maior em animais, notadamente na agropecuária, do que em humanos (O'NEILL, 2015), o que faz dessa atividade um meio para o qual deve-se ater atenção e controle. Apesar do processo de seleção e resistência ser um fenômeno natural da evolução desses microrganismos, a rapidez com a qual está acontecendo é preocupante no contexto da saúde pública e se tornou uma questão emergente.

Alguns estudos sobre resistência antimicrobiana associada citam que há maior probabilidade de pacientes infectados por *S. aureus* resistente à metilina (MRSA) serem infectados por outros organismos multirresistentes (MDROs) (ROBICSEK *et. al.*, 2008). Wimmerstedt e Kahlmeter (2008), avaliando resistência associada em cepas de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus*, *Streptococcus pneumoniae* e *Streptococcus pyogenes*, constataram que, apesar de haver alta proporção de susceptibilidade dessas espécies submetidas aos fármacos utilizados no estudo (76,5-88,9%), os isolados que se apresentaram resistentes a uma droga específica também apresentavam mais propensão de resistência à outras quando comparadas com isolados que eram susceptíveis a qualquer dos fármacos, como exposto no quadro 2 (dados do estudo referentes apenas ao *S. aureus*).

Isso implica em uma resistência associada significativa para o contexto clínico, no momento em que interfere proporcionalmente com a disponibilidade na rotina clínica de medicamentos eficazes contra esses patógenos. Ou seja, com o crescimento da resistência associada, há a diminuição no número de fármacos alternativos de sucesso para controle de infecções (WIMMERSTEDT E KAHLMETER, 2008).

Quadro 2 - Resistência antimicrobiana associada em isolados de *Staphylococcus aureus* (2000-2004), na ausência e presença de resistência a outro medicamento e o risco relativo (RR) de resistência em organismos Suscetíveis vs. Resistentes. NA = Não se aplica.

Agente e nº de isolados susceptíveis e resistentes desse agente	Meticilina		Clindamicina		Eritromicina		Sulfametoxazol + Trimetropima		Ácido fusídico	
	%	RR	%	RR	%	RR	%	RR	%	RR
Meticilina										
S (n = 7480)	00	NA	2.4	6.7	3.9	6.7	0.3	16.1	13.6	0.4
R (n = 9)	100		11.1		22.2		0.0		0.0	
Clindamicina										
S (n = 7312)	0.1	7.3	0	NA	1.7	57.5	0.3	6.7	13.1	2.6
R (n = 177)	0.6		100		97.2		1.7		34.5	
Eritromicina										
S (n = 7194)	0.1	8.1	0.1	763.6	0	NA	0.3	2.7	12.8	2.6
R (n = 295)	0.7		58.3		100		0.7		33.2	
Sulfametoxazol + Trimetoprima										
S (n = 7465)	0.1	16.0	2.3	6.1	3.9	2.6	0	NA	13.6	1.1
R (n = 24)	0.0		12.5		8.3		100		12.5	
Ácido Fusídico										
S (n = 6471)	0.1	0.3	1.8	3.4	3.0	3.2	0.3	1.0	0	NA
R (n = 1018)	0.0		6.0		9.6		0.3		100	

Taxa de resistência geral (n = 7489)	0.1	2.4	3.9	0.3	13.6
---	-----	-----	-----	-----	------

Fonte 2 - Adaptado pelo autor de Wimmerstedt e Kahlmeter (2008).

Silva (2016), avaliando o perfil de sensibilidade de *S. aureus* em isolados clínicos e de alimentos, oriundos do LABMAA da UFRB, verificou uma taxa de 89% de resistência aos antimicrobianos testados no experimento por meio da técnica de difusão em disco (CLSI, 2013). Dos fármacos avaliados, as cepas apresentaram resistência à Amoxicilina, Ampicilina, Azitromicina e Eritromicina, sensibilidade à Ciprofloxacina, Vancomicina e Tetraciclina, e por fim, susceptibilidade intermediária à Ceftriaxona e Cefepime.

Diante desse panorama, é possível supor que, talvez, a estratégia de utilizar apenas antimicrobianos no combate a infecções estafilocócicas não seja a mais adequada, principalmente quando não se atenta à dose e tempo de administração da droga. Berger-Bachi & McCallum (2006) observaram a transferência de material genético relacionado à resistência estimulada por concentrações subinibitórias de antibióticos. Logo, é essencial lançar mão de outros mecanismos de controle, sejam medicamentosos ou não.

3.2 O PAPEL DOS SISTEMAS DE EFLUXO PARA RESISTÊNCIA BACTERIANA

De acordo com Ball *et. al.*, (1977), a detecção de bactérias utilizando seus sistemas de efluxo para extrusão de antibióticos data do final da década de 70 e, conforme McMurry *et. al.*, (1980), início de 80. A partir de então, constatou-se a possibilidade de explorar estudos voltados a analisar o papel dessas bombas de efluxo para fisiologia e sobrevivência de bactérias, bem como seus níveis de atuação na extrusão desses medicamentos.

Nesse sentido, Santos (2016) apresentou um estudo na área da medicina humana para caracterizar o perfil de resistência de isolados de *Pseudomonas* spp. (n=60) aos antibióticos Ceftazidima (CAZ) e Imipenem (IMP), oriundos de efluentes

hospitalares. Na avaliação fenotípica dos sistemas de efluxo na presença do CCCP, a CIM do IMP foi reduzida por 10 isolados e a CIM da CAZ por 6, indicando que, nestes isolados, essa resistência pode ser atribuída às bombas de efluxo.

Tintino (2018) avaliou a ação biológica de compostos naturais atuando como inibidores de bombas de efluxo e, portanto, impedindo seu mecanismo de defesa. Neste mesmo estudo, constatou-se, por conseguinte que vitaminas lipossolúveis e ácido tânico foram capazes de, em diferentes graus, reduzir o sistema de efluxo das cepas analisadas. Foram utilizados individualmente antibióticos, compostos naturais e brometo de Etídio como inibidores de forma comparativa.

Brown *et. al.* (2021) também indicaram a eficácia de 9 extratos vegetais, oriundos de algumas plantas, para inibição de bombas de efluxo em possíveis cepas de *S. aureus* que utilizam esse mecanismo como resistência. Sugeriu então que essas substâncias podem ser usadas com aplicação tópica em algumas infecções ou, até, em associação com antimicrobianos já existentes, aumentando sua eficácia.

Nesse contexto de estudos e pesquisas no tocante a esse controle, testes rápidos para identificação de bombas de efluxo podem ser utilizados como triagem para avaliação de perfis de resistência antimicrobiana, juntamente com demais marcadores fenotípicos e genotípicos.

3.3 BROMETO DE ETÍDIO NA IDENTIFICAÇÃO DE SISTEMAS DE EFLUXO

O Brometo de Etídio é um composto químico marcador de ácidos nucleicos e com atividade fluorescente, intensificada quando em sua intercalação com alguma cadeia de DNA celular. Com isso, como já explicitado, atua nessa metodologia se associando ao DNA dos patógenos a ele expostos e emitindo luminescência. Do contrário, sua atividade é inibida quando na presença de sistemas de efluxo, não emitindo luminescência.

A depender da metodologia utilizada, talvez não seja possível determinar qual o tipo de sistema de efluxo está presente em cada cepa, como também qual seu gene regulador e a que superfamília pertence. Todavia, testes para identificação de bombas de efluxo podem ser utilizados como triagem para avaliação de perfis de resistência antimicrobiana. Juntamente com demais marcadores fenotípicos e genotípicos, como

em associação com ensaios de concentração inibitória mínima (CIM) e/ou técnicas de PCR quantitativo e MALDI-TOF, podem caracterizar um perfil de resistência presente nas cepas analisadas.

3.3.1 Medição direta e indireta do sistema de efluxo

De acordo com Blair e Piddock (2016), os testes para identificação da atividade de efluxo podem ser divididos em dois grupos: os que medem diretamente o sistema de efluxo e aqueles que aferem a concentração do substrato no interior da célula, inferindo por consequência essa atividade de extrusão. Ambos utilizam substâncias-corantes com ação intra e extracelular (alguns citados no Quadro 3), escolhidos de acordo com o objetivo do experimento.

Quadro 3 - Lista de estudos baseados em fluorescência em bactérias para entender bombas de efluxo ativo. Todos os corantes citados atuam por atividade quimioluminescente, independente de interação molecular (requerida ou não), emitindo fluorescência para interpretação dos resultados.

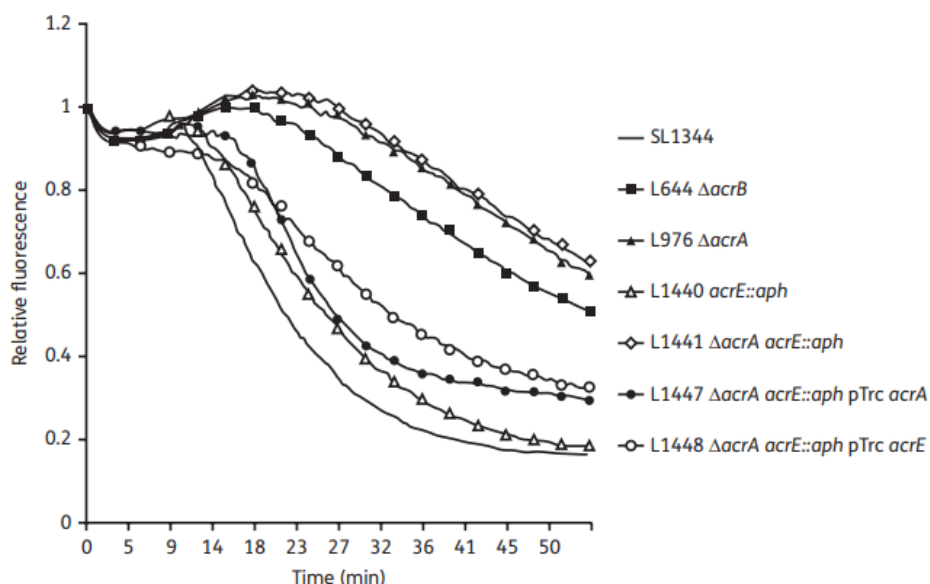
ORGANISMO	CLASSIFICAÇÃO	ALVO DA BOMBA DE EFLUXO E FAMÍLIA	CORANTES UTILIZADOS	INTERAÇÃO MOLECULAR PARA FLUORESCÊNCIA	REFERÊNCIA
<i>Escherichia coli</i>	Gram -	AcrAB-TolC, RND	EtBr	Sim (DNA)	Paixao <i>et. al.</i> (2009)
<i>E. coli</i>	Gram -	Não específico	EtBr	Sim (DNA)	Viveiros <i>et. al.</i> (2008)
<i>E. coli</i>	Gram -	AcrAB-TolC, RND	EtBr	Sim (DNA)	Martins <i>et. al.</i> (2011)
<i>Chromohalobacter sp.</i>	Gram -	HrdC (homólogo ao TolC)	EtBr	Sim (DNA)	Tokunaga <i>et. al.</i> (2004)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram +	NorA, MFS	EtBr	Sim (DNA)	Mullin <i>et. al.</i> (2004)
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	Gram +	LfrA, MFS	EtBr	Sim (DNA)	Rodrigues <i>et. al.</i> (2011)
<i>S. aureus</i>	Gram +	LmrS, MFS	EtBr	Sim (DNA)	Floyd <i>et. al.</i> (2010)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Gram +	MDR	EtBr	Sim (DNA)	Machado <i>et. al.</i> (2018)
<i>E. coli</i> , <i>Salmonella enterica</i> serotype e <i>Typhimurium</i>	Gram -	TolC, AcrB and AcrF, RND	Hoechst 33342, EtBr	Sim (DNA)	Coldham <i>et. al.</i> (2010)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Gram -	AdeABC, RND	Hoechst 33342, EtBr	Sim (DNA)	Richmond <i>et. al.</i> (2013)
<i>S. enterica</i>	Gram -	AdeABC, RND	Hoechst 33342, EtBr, vermelho do Nilo	Sim (DNA e membrana)	Reens <i>et. al.</i> (2018)
<i>E. coli</i>	Gram -	AdeABC, RND	1,20-dinaphthylamine	Sim (DNA e membrana)	Bohnert <i>et. al.</i> (2011)
<i>E. coli</i>	Gram -	AdeABC, RND	Vermelho do Nilo	Sim (DNA e membrana)	Bohnert <i>et. al.</i> (2010)
<i>E. coli</i> , <i>S. enterica</i> serotype, <i>Typhimurium</i>	Gram -	AdeABC, RND	Doxorrubicina	Não	Blair <i>et. al.</i> (2015)

<i>E. coli</i>	Gram -	EmrAB, RND	Doxorrubicina	Não	Nishino and Yamaguchi (2001)
<i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i>	Gram -/+	Não específica	Fluoroquinolona	Não	Piddock <i>et. al.</i> (1999)
<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i>	Gram -/+	Não específica	Fluoroquinolona, radiomarcador	Não	Mortimer and Piddock (1991)
<i>E. coli</i>	Gram -	TolC, RND	Trimetoprim	Não	Phetsang <i>et. al.</i> (2016)
<i>E. coli</i> (proteoliposomes)	Gram -	AcrAB, RND	1-amino-naftaleno-3,6, 8 trissulfonato	Não	Zgurskaya and Nikaido
<i>P. aeruginosa</i>	Gram -	MexAB-OprM	Vermelho do Nilo	Sim (membrana)	Iyer and Erwin (2015)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Gram -	Não específica	1,20- dinaftilamina	Sim (membrana)	Brunel <i>et. al.</i> (2013)

Fonte 3 - Adaptado pelo autor de Pal *et. al.*, 2020.

A medição direta da atividade de efluxo perpassa basicamente quatro fases. Inicialmente as células são suplementadas com grande concentração do substrato avaliado associado a algum inibidor da energia celular, que inibe por consequência o sistema de efluxo (a exemplo do CCCP, utilizado em um dos estudos já citados). A escolha desse inibidor de energia deve basear-se na fonte de energia utilizada pela bomba de efluxo (se ATP ou força próton motora). A partir daí, com todo o substrato acumulado em seu interior, as células são lavadas para remover tanto algum substrato exterior como moléculas do inibidor de energia. Faz-se a primeira medição a partir da fluorescência emitida. É adicionada nova fonte de energia para reenergizar as células (como glicose), para que reiniciem o sistema de efluxo e possam expulsar o corante, momento em que esse sistema é novamente aferido, em tempo real, a partir da fluorescência ao longo do tempo (BLAIR E PIDDOCK, 2016) (Figura 1).

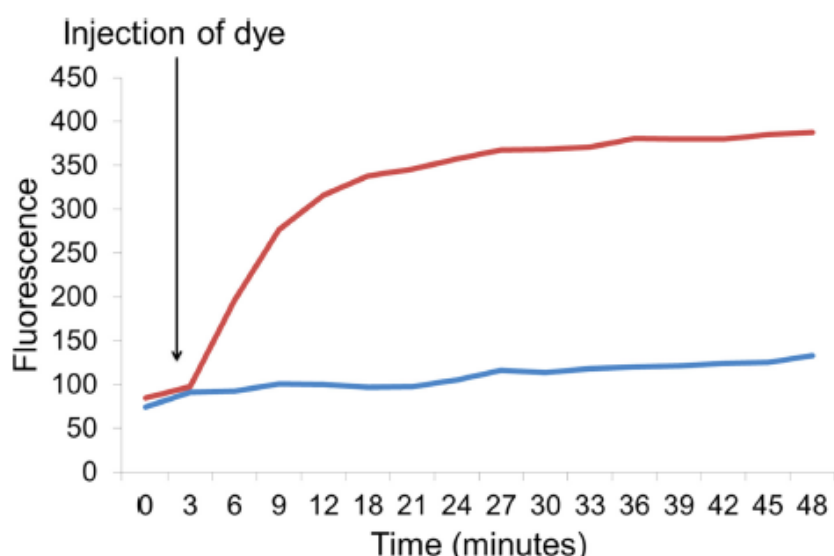
Imagem 1 - Efluxo de EtBr ao longo do tempo por *Salmonella Typhimurium* SL1344 e um conjunto isogênico de mutantes.



Observa-se queda mais acentuada da relação fluorescência vs tempo na cepa SL1344 em contraposição às mutantes, indicando que, nestas, o efluxo possui menor atividade, o que requer mais tempo para extrusão das moléculas. As bactérias foram tratadas com EtBr e CCCP por 60 min, antes a primeira aferição. Depois foram reenergizadas com glicose e realizada a segunda aferição.

Já a medição considerada indireta baseia-se na aferição do acúmulo de determinada substância dependente de efluxo dentro da célula. A partir daí infere-se o nível de efluxo. Sem adição de nenhuma substância é realizada uma leitura inicial da fluorescência das células avaliadas (servindo como ponto de partida). É adicionado corante, espera-se o período estacionário e é avaliado novamente a fluorescência, verificando o nível de acumulação intracelular e comparando as cepas avaliadas, como no exemplo abaixo (Figura 2).

Figura 2 - Medição de acumulação de corante Hoechst H33342 em *Salmonella Typhimurium* SL1344 (azul) e um *acrB* isogênico mutante (vermelho).



Fonte 5 - SMITH e BLAIR, 2014

Após adição do corante, observa-se estacionamento no nível de fluorescência em ambas as cepas e, portanto, infere-se que o nível de efluxo é maior na cepa SL1344, apresentando baixa fluorescência em comparação com a mutante. Resultado encontrado nessas duas metodologias apresentadas.

Além dessas, ainda é possível encontrar outras metodologias descritas na literatura, porém, todas se adequam a essas duas formas de avaliação: qualitativa ou quantitativamente. Sundheim et. al (1992) descreve a utilização do EtBr para avaliação qualitativa de bombas de efluxo, ou seja, sendo possível apenas verificar a presença ou ausência desse sistema nas cepas analisadas.

Segundo a metodologia, o patógeno é semeado, a partir do ágar TSA, em uma placa contendo ágar Mueller Hinton suplementada com 0.5 µg/ml de EtBr e, após 24 horas de incubação a 37°C, é realizada a leitura da placa, com o fundo para cima e sob luz ultravioleta em transluminador. As colônias que não emitem luminescência são consideradas positivas para presença do sistema de efluxo, ao passo que quando emitem luminescência são consideradas negativas. Isso, ocorre porque quando o EtBr penetra na célula, por difusão passiva, as bombas de efluxo são responsáveis por sua extrusão. Portanto, quanto maior a concentração de EtBr intracelular, maior será sua luminescência e menor é a atividade do sistema de efluxo, sendo o contrário também verdadeiro (BLAIR E PIDDOCK, 2016), podendo inclusive ser nula.

Essa metodologia se evidencia por sua praticidade na elaboração e leitura dos resultados, bem como na maior acessibilidade financeira que possui quando comparada às demais metodologias já citadas, contudo, pode encontrar limitações a depender do objetivo do experimento, já que apresenta tão somente uma informação qualitativa a respeito da presença de efluxo.

3.4 APLICAÇÕES METODOLÓGICAS DO EtBr

Recentemente, Pal et. al. (2020) realizou ensaios de fluorescência utilizando EtBr para identificar bombas de efluxo em culturas puras e mistas de bactérias Gram negativas e positivas. E, mais especificamente, seus níveis de atuação na resistência contra tetraciclina, metais pesados (cromo), sal e líquido iônico (1-etil-3- cloreto de

metilimidazólio). Esses substratos atuaram 'acionando' as bombas de efluxo. Comparando suas atividades frente a essas diferentes substâncias, constatou-se que amostras de drenos hospitalares contaminados com antibióticos apresentaram atividade de efluxo 1,3 maior quando em comparação com amostras do solo adjacente. Ainda, que em sedimentos que possuíam salinidade mais alta (7%) os sistemas de efluxo apresentaram-se 1,7 vezes maiores que aqueles com salinidade menor (3%). Além disso, o ensaio também serviu para comprovar a efetividade do uso do EtBr para culturas mistas oriundas de ambientes adversos.

Os resultados alcançados por Pal *et. al.* (2020) baseiam-se no segundo grupo metodológico descrito acima, no qual a atividade de efluxo é relativamente proporcional à concentração do EtBr no interior da célula.

Além do EtBr outras substâncias vêm sendo utilizadas como corantes fluorescentes para monitoramento dessas atividades de efluxo (Quadro 2). Não obstante, o EtBr é frequente, incluindo sua aplicação para as bombas multirresistentes AcrAB-TolC (da família RDN em Gram negativas) e outras pertencentes às famílias ABC e MFS (em Gram positivas).

Diversas bombas já foram identificadas em algumas cepas de *S. aureus*, pertencentes a diversas famílias: NorA (família MFS), Tet(K) (família MFS) e MrsA (família ABC). Conferem resistência, respectivamente, à quinolonas e cloranfenicol, tetraciclina e, por fim, alguns macrolídeos, incluindo a tetraciclina (TINTINO, 2018). Antibióticos largamente utilizados na pecuária leiteira no controle da mastite bovina. O conhecimento dos genes que regulam a expressão dessas bombas traz a possibilidade de articular uma deleção específica desses genes, comprometendo sua resistência (POOLE, 1993).

Apesar dessa ação contundente de efluxo voltada para os antimicrobianos, é sabido que esses sistemas de efluxo se desenvolveram para homeostase celular de maneira geral, atuando contra quaisquer substâncias tóxicas à célula, incluindo antissépticos (CHUANCHUEN *et al.*, 2001) e detergentes (ZGURSKAYA & NIKAIIDO, 2000). O que pode ser um problema no controle da mastite, haja visto que alguns desinfetantes de teto são formulados a base de clorexidina. Isso implicaria também, que, talvez, germicidas oxidativos, como iodo e hipoclorito de sódio possam ser, de fato, mais eficazes e menos resistentes para esses microrganismos. Nesse sentido,

cabem algumas possibilidades de mais estudos no tocante a utilização e eficácia dessas substâncias frente a ação de sistemas de efluxo.

Bjorland *et. al.* (2005), buscando identificar a prevalência de genes mediadores de resistência baseada em efluxo, em *Staphylococcus* spp., contra compostos de amônio quaternário (muito utilizado em produtos de limpeza e desinfecção), utilizaram EtBr como marcador fluorescente. As amostras foram isoladas de leite não pasteurizado de rebanhos bovinos e caprinos e o EtBr foi utilizado seguindo metodologia descrita em Sundheim *et. al.*, (1992).

Através de experimento para determinar o perfil de resistência em *Staphylococcus* spp., oriundos de mastite subclínica em pequenos ruminantes, dos estados de Pernambuco e Bahia, França (2010) utilizou o teste de bomba de efluxo como triagem seguindo, também, a metodologia de Bjorland *et. al.* (2005) e Sundheim *et. al.* (1992). Dos 210 isolados (171 caprinos e 39 ovinos), apenas 41 foram negativos para bombas de efluxo. Esse resultado foi interpretado em associação com os demais resultados obtidos, no tocante à produção de biofilme (determinado pelo teste do Vermelho Congo), à detecção dos padrões e resistência (teste de difusão em disco) e à presença de genes de resistência - *mecA*, *ermC*, *ermA*, *blaZ*, *ermB* e *msrA* (através de PCR). E nos resultados obtidos, o percentual de resistência mais significativo encontrado foi em relação à Amoxicilina 57,3% (caprino) e 18,0% (ovino) e ao Ácido nalidíxico, com 59,1% (caprino) e 56,4% (ovino). Contudo, o autor não estabelece correlação específica entre as amostras positivas para bombas de efluxo e demais resultados encontrados.

Estes estudos apontam as margens científicas que ainda podem ser percorridas utilizando ensaios de fluorescência com EtBr para monitoramento de bombas de efluxo, principalmente se associados a técnicas de identificação para outros mecanismos de resistência bacteriana, tendo em vista que esses patógenos, por vezes, possuem muito mais do que bombas de efluxo específicas e inespecíficas, apresentando resistências também através de outras estratégias: formação de biofilmes, duplicação/replicação de genes de resistência, transferência horizontal desses genes (comumente via plasmídeos, como foi o caso de *S. aureus* em relação à penicilina e meticilina – desenvolvendo os MSRA) e essa lista tende a se tornar cada vez maior com o tempo.

Para além do papel relevante de sistemas de efluxo contra antibióticos, estudos apontam sua capacidade de atuar, também, conferindo resistência à substâncias naturais do próprio hospedeiro (como bile, hormônios, moléculas de defesa, etc.), auxiliando na colonização e manutenção de algumas bactérias nesse hospedeiro (algumas bombas da família RDN) (PIDDOCK, 2006), ou seja, são responsáveis diretamente pela patogenicidade dessas cepas, sendo isto uma informação de extrema relevância clínica no contexto da saúde única - intersecção entre a medicina humana, veterinária e ambiental.

Destaca-se, desse modo, a necessidade de delinear estudos com isolados de animais locais com mastite bovina, colhendo informações que podem definir o perfil de resistência das cepas baseado em bombas de efluxo. Ademais, esses dados podem ser cruzados e/ou associados com outras informações, como testes de antibiograma dessas mesmas bactérias e com os antibióticos comumente utilizados em animais dessa região, mensurando a atuação do sistema de efluxo para essa resistência.

Segundo Piddock (2006), é possível que a atividade de efluxo entre em ação quando uma bactéria mutante passa a ter aumento simultâneo de CIM para três ou mais antibióticos, quando comparada com suas cepas originais. Esse aumento pode chegar de 2 a 8 vezes maiores. Fenômeno encontrado, mais frequentemente, para fluoroquinolonas. É essencial conhecer a epidemiologia local para, a partir daí, estabelecer protocolos de direcionamento e tratamento contra infecções bacterianas, evitando o uso indiscriminado de antibióticos nas propriedades.

4 CONCLUSÃO

A literatura acerca de sistemas de efluxo é vasta e relativamente nova, quando comparada com estudos sobre outros temas, mesmo relacionados à resistência bacteriana. Nessa literatura, diversas metodologias são descritas em artigos a fim de identificar, quantitativa e qualitativamente, a presença de sistemas de efluxo. Contudo, é essencial definir qual informação se busca obter para, então, escolher a metodologia mais adequada. Esses estudos/experimentos utilizando sistemas de efluxo podem significar estratégia valiosa ante esse panorama de crescente resistência antimicrobiana, tanto na medicina humana como na área veterinária.

Destarte, é necessário e possível explorar, cada vez mais, esse que é um dos mecanismos mais primitivos e atuantes nas inúmeras espécies de bactérias para sua sobrevivência. Identificar sistemas de efluxo, quais seus substratos alvo e elaborar maneiras de bloquear ou minimizar esse mecanismo, podem facilitar o controle sobre a ação desses patógenos. Controle esse que já vêm defasado com a crescente resistência bacteriana, a despeito dos esforços da Ciência mundial.

REFERÊNCIAS

- AIRES-DE-SOUSA, M. **Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among animals: current overview.** *Clinical Microbiology and Infection* 23: 373-380, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1198743X16305572>. Acesso em 29 de Novembro de 2021.
- ARIAS, M. V. B.; DE MAIO CARRILHO, Cláudia Maria Dantas. **Resistência antimicrobiana nos animais e no ser humano. Há motivo para preocupação?** *Semina: Ciências Agrárias*, v. 33, n. 2, p. 775-790, 2012. Disponível em: <https://www.redalyc.org/pdf/4457/445744112039.pdf>. Acesso em 29 de Novembro de 2021.
- BALL, P. R. et al. **Accumulation of tetracyclines by *Escherichia coli* K-12.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.77, p.1500-1507, 1977. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X77801484>. Acesso em 29 de Novembro de 2021.
- BERGER-BACHI, B.; McCALLUM, N. **State of the knowledge of bacterial resistance.** *International Journal of the Care of the Injured*, v.37, p.20-25, 2006.
- BJORLAND, Jostein et al. **Widespread distribution of disinfectant resistance genes among staphylococci of bovine and caprine origin in Norway.** *Journal of clinical microbiology*, v. 43, n. 9, p. 4363-4368, 2005. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/JCM.43.9.4363-4368.2005>. Acesso em 29 de Novembro de 2021.
- BLAIR, Jessica MA et al. **AcrB drug-binding pocket substitution confers clinically relevant resistance and altered substrate specificity.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 112, n. 11, p. 3511-3516, 2015. Disponível em: <https://www.pnas.org/content/112/11/3511.short>. Acesso em 07 de Dezembro de 2021.
- BLAIR, Jessica MA; PIDDOCK, Laura JV. **How to measure export via bacterial multidrug resistance efflux pumps.** *MBio*, v. 7, n. 4, p. e00840-16, 2016. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/mBio.00840-16>. Acesso em 29 de Novembro de 2021.
- BOHNERT, Jürgen A.; KARAMIAN, Brian; NIKAIDO, Hiroshi. **Optimized Nile Red efflux assay of AcrAB-TolC multidrug efflux system shows competition between substrates.** *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 54, n. 9, p. 3770-3775, 2010. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/AAC.00620-10>. Acesso em 07 de Dezembro de 2021.
- BOHNERT, Jürgen A. et al. **Determination of real-time efflux phenotypes in *Escherichia coli* AcrB binding pocket phenylalanine mutants using a 1, 2'-dinaphthylamine efflux assay.** *PloS one*, v. 6, n. 6, p. e21196, 2011. Disponível

em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0021196>. Acesso em 07 de Dezembro de 2021.

BORGES-WALMSLEY, M. Ines; MCKEEGAN, Kenneth S.; WALMSLEY, Adrian R. **Structure and function of efflux pumps that confer resistance to drugs**. Biochemical Journal, v. 376, n. 2, p. 313-338, 2003. 376 (2): 313–338. doi: <https://doi.org/10.1042/bj20020957>. Disponível em: <https://portlandpress.com/biochemj/article-abstract/376/2/313/40851/Structure-and-function-of-efflux-pumps-that-confer?redirectedFrom=fulltext>. Acesso em 29 de Novembro de 2021.

BOTARO, Bruno Garcia et al. **Staphylococcus aureus intramammary infection affects milk yield and SCC of dairy cows**. Tropical animal health and production, v. 47, n. 1, p. 61-66, 2015. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11250-014-0683-5>. Acesso em 29 de Novembro de 2021.

BOTELHO, Louise Lira Roedel; CUNHA, Cristiano Castro de Almeida; · MACEDO, Marcelo. **O método da revisão integrativa nos estudos organizacionais. Gestão e Sociedade**. Belo Horizonte, v.5, n. 11, p. 121-136 · maio-ago. 2011 · ISSN 1980-5756. Disponível em: <http://www.gestoesociedade.org/gestoesociedade/article/view/1220/906>. Acesso em 29 de novembro de 2021.

BROWN, Adam R. et al. **Bacterial efflux inhibitors are widely distributed in land plants**. Journal of Ethnopharmacology, v. 267, p. 113533, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874120334218>. Acesso em 29 de Novembro de 2021.

BRUNEL, Jean Michel et al. **Polyamino geranic derivatives as new chemosensitizers to combat antibiotic resistant Gram-negative bacteria**. Bioorganic & medicinal chemistry, v. 21, n. 5, p. 1174-1179, 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968089612010036>. Acesso em 07 de Dezembro de 2021.

CAMPANA, Álvaro Oscar et al. **Metodologia da investigação científica aplicada à área biomédica-1**. O método científico. J Pneumol, v. 25, n. 1, p. 25, 1999. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/jpneu/a/bXPWKsKL5Qzf4KLFDvbmtGj/> Acesso em 29 de novembro de 2021.

CHUANCHUEN, R. et al. **Cross-Resistance between Triclosan and Antibiotics in Pseudomonas aeruginosa Is Mediated by Multidrug Efflux Pumps: Exposure of a Susceptible Mutant Strain to Triclosan Selects nfxB Mutants Overexpressing MexCD-OprJ**. Antimicrobial agents and chemotherapy, 45,428-432, 2001. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/AAC.45.2.428-432.2001>. Acesso em 07 de dezembro de 2021.

COLDHAM, Nick G. et al. **A 96-well plate fluorescence assay for assessment of cellular permeability and active efflux in Salmonella enterica serovar Typhimurium and Escherichia coli**. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 65,

n. 8, p. 1655-1663, 2010. Disponível em:
<https://academic.oup.com/jac/article/65/8/1655/736755?login=true>. Acesso em 07 de dezembro de 2021.

CUSSOLIM, Phylipe Adrian et al. **Mecanismos de resistência do *Staphylococcus aureus* à antibióticos**. Revista Faculdades do Saber, v. 6, n. 12, p. 831-843, 2021. Disponível em: <https://rfs.emnuvens.com.br/rfs/article/view/120>. Acesso em 29 de Novembro de 2021.

FINEOUT-OVERHOLT, Ellen; LEVIN, Rona F.; MELNYK, Bernadette Mazurek. **Strategies for advancing evidence-based practice in clinical settings**. JNY State Nurses Assoc, v. 35, n. 2, p. 28-32, 2004. Disponível em:
https://www.researchgate.net/profile/Ellen-Fineout-Overholt/publication/7857609_Strategies_for_advancing_evidence-based_practice_in_clinical_settings/links/02e7e523080557ce2d000000/Strategies-for-advancing-evidence-based-practice-in-clinical-settings.pdf

FLOYD, Jody L. *et al.* **LmrS is a multidrug efflux pump of the major facilitator superfamily from *Staphylococcus aureus***. Antimicrobial agents and chemotherapy, v. 54, n. 12, p. 5406-5412, 2010. Disponível em:
<https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/AAC.00580-10>. Acesso em 07 de dezembro de 2021.

GALVÃO, Cristina Maria; SAWADA, Namie Okino; MENDES, Isabel Amélia Costa. **A busca das melhores evidências**. Revista da Escola de Enfermagem da USP, v. 37, p. 43-50, 2003. Disponível em:
<https://www.scielo.br/j/reeusp/a/cfryP6YKfwDY8FgtCVgRN7d/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em 29 de novembro de 2021.

GOULD, I. M. **The epidemiology of antibiotic resistance**. International journal of antimicrobial agents, v. 32, p. S2-S9, 2008. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924857908002653>. Acesso em 29 de Novembro de 2021.

IYER, R.; ERWIN, A. L. **Direct measurement of efflux in *Pseudomonas aeruginosa* using an environment-sensitive fluorescent dye**. Research in microbiology, v. 166, n. 6, p. 516-524, 2015. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0923250815001035>. Acesso em 07 de dezembro de 2021.

LOUREIRO, Rui João et al. **O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução**. Revista Portuguesa de saúde pública, v. 34, n. 1, p. 77-84, 2016. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S087090251500067X>. Acesso em 29 de Novembro de 2021.

KEEFE, Greg. **Update on control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for management of mastitis**. Veterinary Clinics: Food Animal Practice, v. 28, n. 2, p. 203-216, 2012. Disponível em:

[https://www.vetfood.theclinics.com/article/S0749-0720\(12\)00027-8/fulltext](https://www.vetfood.theclinics.com/article/S0749-0720(12)00027-8/fulltext). Acesso em 29 de Novembro de 2021.

MACHADO, Diana *et al.* **Efflux activity differentially modulates the levels of isoniazid and rifampicin resistance among multidrug resistant and monoresistant *Mycobacterium tuberculosis* strains**. *Antibiotics*, v. 7, n. 1, p. 18, 2018. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2079-6382/7/1/18>. Acesso em 07 de dezembro de 2021.

MARTINS, Ana *et al.* **Role of calcium in the efflux system of *Escherichia coli***. *International journal of antimicrobial agents*, v. 37, n. 5, p. 410-414, 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924857911000598>. Acesso em 07 de dezembro de 2021.

MELNYK, B. M.; FINEOUT-OVERHOLT, E. **Key steps in implementing evidence-based practice: Asking compelling, searchable questions and searching for the best evidence**. *Pediatric nursing*, v. 28, n. 3, p. 262, 2002. Disponível em: <https://www.proquest.com/openview/69eea015f96925dd4c725d4d75a1c9c9/1?pq-origsite=gscholar&cbl=47659>. Acesso em 07 de dezembro de 2021.

MENIN, Álvaro. **Saúde única: uma reflexão**. *Encuentro de Salud Animal*, v. 4, 2018. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Alvaro-Menin/publication/343239282_saude_unica_uma_reflexao_reflexion_sobre_el_concepto_de_una_salud/links/60c94e8e92851c8e6399a8c5 Acesso em 07 de dezembro de 2021.

McMURRY, L. *et al.* **Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli***. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.77, p.3974-3977, 1980. Disponível em: <https://www.pnas.org/content/77/7/3974.short>. Acesso em 29 de Novembro de 2021.

MOREIRA, M. A. S. *et al.* **Resistência a antimicrobianos dependente do sistema de efluxo multidrogas em *Escherichia coli* isoladas de leite mastítico**. *Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.60, n.6, p.1307-1314, dez. 2008. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abmvz/a/bz4ZkNbdQfbnzYNWG8RwphF/abstract/?format=html&lang=pt>. Acesso em 29 de Novembro de 2021.

MORTIMER, P. G. S.; PIDDOCK, L. J. V. **A comparison of methods used for measuring the accumulation of quinolones by *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus***. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 28, n. 5, p. 639-653, 1991. Disponível em: <https://academic.oup.com/jac/article-abstract/28/5/639/757210>. Acesso em 07 de dezembro de 2021.

MULLIN, Steve *et al.* **Inhibition of antibiotic efflux in bacteria by the novel multidrug resistance inhibitors biricodar (VX-710) and timcodar (VX-853)**. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 48, n. 11, p. 4171-4176, 2004. Disponível

em: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/AAC.48.11.4171-4176.2004>. Acesso em 07 de dezembro de 2021.

NEVES, P. R. *et al.* **Pseudomonas aeruginosa multirresistente: um problema endêmico no Brasil.** Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, v. 47. n. 4. p. 409-420, ago., 2011. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/jbpm/a/kwn5RVkLXyYLzpQf5mbwCTt/?format=html>. Acesso em 29 de Novembro de 2021.

NISHINO, K.; YAMAGUCHI, A. **Overexpression of the response regulator evgA of the two-component signal transduction system modulates multidrug resistance conferred by multidrug resistance transporters.** Journal of bacteriology, v. 183, n. 4, p. 1455-1458, 2001. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/JB.183.4.1455-1458.2001>. Acesso em 07 de dezembro de 2021.

O'NEILL, J. **Antimicrobials in agriculture and the environment: reducing unnecessary use and waste: the review on antimicrobial resistance.** London: Wellcome Trust, HM Government, Dec. 2015.

Ordonho, R. F. **Identificação do perfil de resistência antimicrobiana de cepas do gênero Staphylococcus SPP. oriundas de casos de mastite em rebanhos leiteiros do agreste paraibano** / Raphael Ferreira Ordonho. Areia: UFPB/CCA, 2021. Disponível em: <https://repositorio.ufpb.br/jspui/handle/123456789/21043>. Acesso em 07 de dezembro de 2021.

Organização das Nações Unidas. **Objetivos de Desenvolvimento Sustentável no Brasil**, 2012. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/sdgs>. Acesso em 16/10/2021.

Organização Mundial de saúde (OMS). **World Antimicrobial Awareness Week**, 2020. Disponível em: <https://www.who.int/campaigns/world-antimicrobial-awareness-week/2020>. Acesso em 16/10/2021.

PAIXÃO, Laura *et al.* **Fluorometric determination of ethidium bromide efflux kinetics in Escherichia coli.** Journal of biological engineering, v. 3, n. 1, p. 1-13, 2009. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/1754-1611-3-18>. Acesso em 07 de dezembro de 2021.

PAL, Srikantha *et al.* **Adaptation of ethidium bromide fluorescence assay to monitor activity of efflux pumps in bacterial pure cultures or mixed population from environmental samples.** Journal of King Saud University-Science, v. 32, n. 1, p. 939-945, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S101836471930504X>. Acesso em 29 de Novembro de 2021.

PHETSANG, Wanida *et al.* **Fluorescent trimethoprim conjugate probes to assess drug accumulation in wild type and mutant Escherichia coli.** ACS infectious diseases, v. 2, n. 10, p. 688-701, 2016. Disponível em:

<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acsinfecdis.6b00080>. Acesso em 07 de dezembro de 2021.

PIDDOCK, Laura JV et al. **Quinolone accumulation by *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli***. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 43, n. 1, p. 61-70, 1999. Disponível em: <https://academic.oup.com/jac/article/43/1/61/749956?login=true>. Acesso em 07 de dezembro de 2021.

PIDDOCK, L. J. **Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria**. *Clinical Microbiology Reviews*, v.19, p.319-402, abr. 2006. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/CMR.19.2.382-402.2006>. Acesso em 29 de Novembro de 2021.

PIDDOCK, Laura JV. **Multidrug-resistance efflux pumps? not just for resistance**. *Nature Reviews Microbiology*, v. 4, n. 8, p. 629-636, 2006a. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrmicro1464>. Acesso em 29 de Novembro de 2021.

POMPEO, Daniele Alcalá; ROSSI, Lúcia Aparecida; GALVÃO, Cristina Maria. **Revisão integrativa: etapa inicial do processo de validação de diagnóstico de enfermagem**. *Acta paulista de enfermagem*, v. 22, p. 434-438, 2009. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/apel/a/KCrFs8Mz9wG59KtQ5cKbGgK/abstract/?lang=pt&format=html>. Acesso em 29 de novembro de 2021.

POOLE, Keith et al. Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. *Journal of bacteriology*, v. 175, n. 22, p. 7363-7372, 1993. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/epdf/10.1128/jb.175.22.7363-7372.1993>. Acesso em 07 de dezembro de 2021.

RAMALHO, Anabela. **Manual para redacção de estudos e projectos de revisão sistemática com e sem metanálise**. Estrutura funções e utilização na investigação em enfermagem. Coimbra: Formasau - Formação e Saúde, D.L. - 110 p. 2005 - ISBN 972-8485-54-9. Disponível em: <https://porbase.bnportugal.gov.pt/ipac20/ipac.jsp?&profile=porbase&uri=full=3100024~!2253013~!0>. Acesso em 29 de novembro de 2021.

REENS, Abigail L. et al. **A cell-based infection assay identifies efflux pump modulators that reduce bacterial intracellular load**. *PLoS pathogens*, v. 14, n. 6, p. e1007115, 2018. Disponível em: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1007115>. Acesso em 07 de dezembro de 2021.

RICHMOND, G. E.; CHUA, Kim Lee; PIDDOCK, L. J. V. **Efflux in *Acinetobacter baumannii* can be determined by measuring accumulation of H33342 (bis-benzamide)**. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 68, n. 7, p. 1594-1600, 2013. Disponível em: <https://academic.oup.com/jac/article/68/7/1594/888137?login=true>. Acesso em 07 de dezembro de 2021.

ROBICSEK, Ari et al. **Prediction of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* involvement in disease sites by concomitant nasal sampling.** Journal of Clinical Microbiology, v. 46, n. 2, p. 588-592, 2008. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/JCM.01746-07>. Acesso em 29 de Novembro de 2021.

RODRIGUES, Liliana et al. **Ethidium bromide transport across *Mycobacterium smegmatis* cell-wall: correlation with antibiotic resistance.** BMC microbiology, v. 11, n. 1, p. 1-10, 2011. Disponível em: <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2180-11-35>. Acesso em 07 de dezembro de 2021.

SANTOS, Joice Maliuk dos. **Presença de bombas de efluxo em *Pseudomonas* sp. isoladas de efluente hospitalar não tratado.** 2016. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/151313>. Acesso em 29 de Novembro de 2021.

SAMPAIO, Rosana Ferreira; MANCINI, Marisa Cotta. **Estudos de revisão sistemática: um guia para síntese criteriosa da evidência científica.** Brazilian Journal of Physical Therapy, v. 11, p. 83-89, 2007. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbfis/a/79nG9Vk3syHhnSgY7VsB6jG/?lang=pt&format=html>. Acesso em 29 de Novembro de 2021.

SANTOS, M. V. **Controle de mastite e qualidade do leite – Desafio e Soluções /** Marcos Veiga dos Santos e Luis Fernando Laranja da Fonseca. Pirassununga-SP: Edição dos Autores, 2019. 301p.

MCVEY, Scott; KENNEDY, Melissa; CHENGAPPA, M. M. **Microbiologia veterinária.** 3. ed. tradução José Jurandir Fagliari. - [Reimpr.] - Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2017. p. 298-299.

SILVA, Robecia Costa da. **Resistência antibacteriana de *Staphylococcus aureus* em amostras clínicas e de alimentos.** 2016. Disponível em: <http://131.0.244.66:8082/jspui/handle/123456789/283> . Acesso em 29 de Novembro de 2021.

DA SILVA, J. M. B.; HOLLENBACH, C. B. **Fluoroquinolonas x Resistência bacteriana na medicina veterinária.** Arquivos do Instituto Biológico, v. 77, p. 363-369, 2020. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/aib/a/LNydDRjGGBC5sC5mC8ntp9Q/abstract/?lang=pt>. Acesso em 07 de dezembro de 2021.

SMITH, Helen E.; BLAIR, Jessica MA. **Redundancy in the periplasmic adaptor proteins AcrA and AcrE provides resilience and an ability to export substrates of multidrug efflux.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 69, n. 4, p. 982-987, 2014. Disponível em: <https://academic.oup.com/jac/article/69/4/982/706081?login=true>. Acesso em 29 de Novembro de 2021.

STEGMANN, Ramona et al. **Human infection associated with methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* ST71**. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 65, n. 9, p. 2047-2048, 2010. Disponível em: <https://academic.oup.com/jac/article/65/9/2047/721852?login=true>. Acesso em 29 de Novembro de 2021.

STILLWELL, Susan B.; FINEOUT-OVERHOLT, Ellen; MELNYK, Bernadette Mazurek; WILLIAMSON, Kathleen M. **Searching for the Evidence: Strategies to help you conduct a successful search**. American Journal of Nursing (AJN), jan.2010, v. 110, n.1. p. 51-53. Disponível em: https://journals.lww.com/ajnonline/fulltext/2010/05000/EvidenceBased_Practice,_Step_by_Step___Searching.24.aspx. Acesso em 29 de novembro de 2021.

SUN, J.; DENG, Z.; YAN, A. **Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations**. Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 453, n.2, p. 253-267, out. 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X14009711>. Acesso em 29 de Novembro de 2021.

SUNDHEIM, G.; HAGTVEDT, T.; DAINITY, R. **Resistance of meat associated staphylococci to a quarternary ammonium compound**. Food Microbiology, v. 9, n. 2, p. 161-167, 1992. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/074000209280023W>. Acesso em 29 de Novembro de 2021.

TINTINO, Saulo Relison. **Avaliação da inibição de bombas de efluxos em linhagens de *Staphylococcus aureus* por substâncias sintéticas de origem natural**. 2018. Disponível em: <https://attenua.ufpe.br/handle/123456789/32280>. Acesso em 29 de Novembro de 2021.

TOKUNAGA, Hiroko et al. **Salt-inducible multidrug efflux pump protein in the moderately halophilic bacterium *Chromohalobacter* sp.** Applied and environmental microbiology, v. 70, n. 8, p. 4424-4431, 2004. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/AEM.70.8.4424-4431.2004>. Acesso em 07 de dezembro de 2021.

VIVEIROS, Miguel et al. **Demonstration of intrinsic efflux activity of *Escherichia coli* K-12 AG100 by an automated ethidium bromide method**. International journal of antimicrobial agents, v. 31, n. 5, p. 458-462, 2008. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924857908000320>. Acesso em 07 de dezembro de 2021.

WEBBER, M. A.; PIDDOCK, L. J. V. **The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance**. Journal of antimicrobial chemotherapy, v. 51, n. 1, p. 9-11, 2003. Disponível em: <https://academic.oup.com/jac/article/51/1/9/771243?login=true>. Acesso em 07 de dezembro de 2021.

WIMMERSTEDT, A.; KAHLMETER, Gunnar. **Associated antimicrobial resistance in *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes***. Clinical Microbiology

and Infection, v. 14, n. 4, p. 315-321, 2008. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1198743X14628020>. Acesso em 29 de Novembro de 2021.

ZGURSKAYA, H. I.; NIKAIDO, H. **Bypassing the periplasm: reconstitution of the AcrAB multidrug efflux pump of Escherichia coli. Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 13, p. 7190-7195, 1999. Disponível em: <https://www.pnas.org/content/96/13/7190.short>, Acesso em 07 de dezembro de 2021.

ZGURSKAYA, H. I.; NIKAIDO, H. **Multidrug resistance mechanisms: drug efflux across two membranes. Molecular microbiology**, 37, 219–225, 2000. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1046/j.1365-2958.2000.01926.x>. Acesso em 07 de dezembro de 2021.

ZHANG, Z. LIU, Z.; ZHENG, P.; TANG, F.; YANG, P. **Influence of efflux pump inhibitors on the multidrug resistance of Helicobacter pylori**. World Journal of Gastroenterology. v. 16, n.10, p. 1279-1284, mar. 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2839183/>. Acesso em 29 de Novembro de 2021.