

CAROLINE LOPES MARTINI

**CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA FENOTÍPICA E
MOLECULAR À PENICILINA E TETRACICLINA EM
AMOSTRAS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ISOLADAS DE
MASTITE BOVINA**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências
Agroveterinárias da Universidade do Estado de
Santa Catarina, como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre em Ciência
Animal.

Orientadora: Dra. Eliana Knackfuss Vaz
Co-Orientadora: Dra. Carla Christine Lange

**LAGES
2015**

Martini, Caroline Lopes

Caracterização da resistência fenotípica e molecular à penicilina e tetraciclina em amostras de *staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina / Caroline Lopes Martini - Lages, 2015.
92p. : il.; 21 cm

Orientadora: Eliana Knackfuss Vaz

Co-orientadora: Carla Christine Lange

Inclui Bibliografia.

Dissertação Mestrado - Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2015.

1. Mastite bovina. 2. *Staphylococcus aureus*. 3. Antimicrobianos. 4. Resistência aos antimicrobianos 5. Genes de resistência. I. Martini, Caroline Lopes. II. Vaz, Eliana Knackfuss. III. Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. IV. Título

Ficha catalográfica elaborada pelo aluno.

CAROLINE LOPES MARTINI

**CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA FENOTÍPICA E
MOLECULAR À PENICILINA E TETRACICLINA EM
AMOSTRAS DE *Staphylococcus aureus* ISOLADAS DE MASTITE
BOVINA**

Dissertação como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em
Ciência Animal do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal do
Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de
Santa Catarina.

Banca Examinadora:

Orientador:

Prof. Dra. Eliana Knackfuss Vaz
Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC

Membro:



Prof. Dra. Lillian Kolling Girardini
Universidade do Oeste de Santa Catarina - UNOESC

Membro:

Prof. Dra. Maria de Lourdes Borda Magalhães
Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC

Lages, 13/07/2015.

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.”
- Leonardo da Vinci

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente, ao destino e a Deus por me conceder a oportunidade de estudar e trabalhar com o assunto que mais me interessei na faculdade e pretendo seguir na minha vida.

Aos meus pais, meu irmão e minha cunhada pelo apoio em tudo que eu faço. Pelo objetivo de continuar estudando e conseguir me inserir no mercado de trabalho com maior segurança e oportunidade. Obrigada por tudo, obrigada pelas broncas, pelas liberdades que tenho com vocês, pelos momentos de prazer em família e por saber que vocês são meu porto seguro. Espero um dia retribuir tudo isso.

Obrigada também minha irmã de coração, minha prima Yasmin Müller, que apesar de ser mais nova que eu, sempre se mostrou tão madura e articulada. Tantas vezes já me aconselhei e a aconselhei que não sei o quanto somos indispensáveis uma para outra.

À minha orientadora por todo profissionalismo, paciência e cumplicidade comigo nestes últimos seis anos. Obrigada por tudo. Meus primeiros passos como profissional foram assistido por você e não posso nunca esquecer isso.

À minha co-orientadora que foi desde 2013 uma mentora profissional. Admiro-a por todo conhecimento, profissionalismo e pelo exemplo pessoa. Também pela paciência e persistência que teve comigo neste ultimo ano. Foi um enorme prazer e oportunidade realizar o experimento sob vossa supervisão. Aprendi muito como profissional e como pessoa. Espero continuar esta parceria.

Obrigada aos inúmeros contribuintes desta fase, aos amigos de Lages: Fernanda Melo, Flavia Yamakawa, Sandro Jorge Junior, Renan Bagio, Juliana Lazaroto, Gabriela Barreto,

Giane Pontarolo, Alais Dall Agnol, Cláudia Appio Duarte, Karine Dalmina, Sara Zarth, Marcela Pereira, Paula Wildemann, Stéfano Caon, Thais Nihues, Lucas Koerich, Eloiza Zoboli, Marilise Mibach por todo apoio no laboratório e companheirismo nos “chimas” e bares...

Aos amigos de Juiz de Fora não tenho como agradecer apenas em palavras, mas em saudades imensas que tenho dentro de mim: Fabiana Silva, Regiane Bittencourt, Helena Müller e família, Alessandra Salimena e família, Aline Vianna Tomé, Marcos Aurélio Silva, Maria Aparecida Brito, Joel Vianello, Letícia Mendonça, Érica Bravo, Juliana França, Alessandro Guimarães, João Batista, Fernanda Fernandes, Jasmin, Fernanda Gonçalves, Nara Reis. Deividy Kellvy Barreto obrigada por toda ajuda durante todo o projeto, foi muito importante ter a sua parceria. Selda Loase, você foi outra pessoa importantíssima, profissionalmente e como amiga.

Às minhas amigas de longa data, Leila Netto e Dayane Karine, não sei como agradecer por me ouvirem em todos os momentos de indecisão.

Enfim, à todos que contribuíram de alguma forma, mas não pude lembrar aqui, meu obrigado de coração.

RESUMO

MARTINI, Caroline Lopes. Caracterização da resistência fenotípica e molecular à penicilina e tetraciclina em amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina. 2015. 70f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal – Área: Saúde Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2015.

Staphylococcus aureus é o principal agente causador de mastite bovina, principal doença que acomete bovinos leiteiros. O uso de antimicrobianos é de grande relevância para o controle dos casos de mastite nas propriedades, e os antimicrobianos betalactâmicos (principalmente penicilina) e tetraciclina são comumente usados em saúde animal e humana. Dessa forma, o estudo da resistência a esses princípios ativos é de grande importância. Neste trabalho, para caracterizar a resistência à ampicilina, penicilina e tetraciclina foram selecionadas através do teste de disco-difusão 90 amostras de *S. aureus* isoladas de mastite subclínica resistentes à penicilina ou/e ampicilina ou/e tetraciclina. A caracterização fenotípica aos três antimicrobianos foi determinada pela concentração inibitória mínima - método de E-TEST® - e produção de betalactamase através de discos de cefinase. Foram pesquisadas em todas as amostras cinco genes de resistência, *blaZ*, *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)* e *tet(O)*. Os produtos de PCR foram sequenciados para confirmação dos resultados. Foi observada a resistência em 71 %, 77 % e 72 % das amostras à ampicilina, penicilina e tetraciclina, respectivamente. A MIC₉₀ dos três antimicrobianos

foram 2 µg/mL (ampicilina), 1 µg/mL (penicilina), 64 µg/mL (tetraciclina). Foram identificadas 86 % de amostras produto de betalactamase. Do total, 97 % amplificaram *blaZ*, 84 % *tet(K)*, 9 % *tet(L)*, 2 % *tet(M)*, 1 % *tet(O)*. Quatro amostras apresentaram conjuntamente *tet(K)* e *tet(L)*, uma amostra apresentou *tet(K)*, *tet(M)* e *tet(O)* e 80 amostras apresentaram *blaZ* juntamente com pelo menos um dos genes *tet* estudados. Os resultados da CIM apontam para um alto índice de resistência dos isolados de *S. aureus* para os três antimicrobianos e altos valores de CIM₅₀ e CIM₉₀. Os genes *blaZ* e *tet(K)* encontram-se amplamente disseminados nos rebanhos estudados. Mais estudos sobre o caráter fenotípico e molecular da resistência aos antimicrobianos em *S. aureus* devem ser realizados para estabelecer medidas de controle e terapêuticas adequadas.

Palavras-chave: antimicrobianos, genes de resistência, CIM.

ABSTRACT

MARTINI, Caroline Lopes. Phenotypic and molecular resistance characterization to penicillin and tetracyclin in *Staphylococcus aureus* sample isolated from bovine mastitis.. 2015. __f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal – Área: Saúde Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2015.

Staphylococcus aureus is the major causative agent of bovine mastitis, the main disease affecting dairy cattle. The use of antibiotics is highly relevant for the control of mastitis cases in the properties, and the beta-lactam antibiotics (especially penicillin) and tetracycline are commonly used in animal and human health. Therefore, study of resistance is very important. For this test were selected 90 *S. aureus* isolated from subclinical mastitis to the characterization of ampicillin, penicillin and tetracycline through the disk diffusion test. Phenotypic characterization of the three antibiotics was determined by the minimum inhibitory concentration using the E-Test® and production of beta-lactamase by cefinase discs. Five resistance genes, *blaZ*, *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)*, *tet(O)* were investigated in all samples. PCR products were sequenced to confirm the results. The resistance was observed in 71%, 77% and 72% of the samples to ampicillin, penicillin and tetracycline, respectively. The MIC₉₀ of the three antibiotics were 2 µg/mL (ampicillin), 1 µg/mL (penicillin), 64 µg/mL (tetracycline). Eighty six percent of beta-lactamase producing samples were identified. Of the 90 samples investigated, 97% amplified *blaZ*, 84% *tet(K)*, 9% *tet(L)* and 2% *tet(O)* 1%

tet(M). Four samples showed together *tet(L)* and *tet(K)*, one sample showed *tet(K)*, *tet(M)* and *tet(O)* and 80 samples showed *blaZ* together with at least one *tet* gene. The results suggest high resistance rate for the three antimicrobials in the *S. aureus* samples and high values of MIC₅₀ and MIC₉₀. The *blaZ* and *tet(K)* genes investigated were widespread in the herds studied. More studies about phenotypic and molecular character of antimicrobial resistance in *S. aureus* should be done to provide appropriated control and therapeutic measures.

Key-words: antimicrobials, resistance genes, MIC.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Estrutura molecular da penicilina.....	21
Figura 2 –	Ação da betalactamase.....	24
Figura 3 –	Estrutura molecular da tetraciclina.....	27
Figura 4 –	Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação do gene <i>blaZ</i>	46
Figura 5 –	Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação dos genes <i>tet(K)</i> , <i>tet(L)</i> , <i>tet(M)</i> e <i>tet(O)</i>	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Origem das amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> isoladas de mastite bovina na Zona da Mata de Minas Gerais e utilizadas neste estudo.....	41
Tabela 2 -	Análise da concentração inibitória mínima dos antimicrobianos estudados para 90 amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> isoladas de mastite bovina.....	50
Tabela 3 -	Resultados do sequenciamento parcial dos genes <i>blaZ</i> , <i>tet(K)</i> , <i>tet(L)</i> , <i>tet(M)</i> e <i>tet(O)</i>	53
Tabela 4 -	Resultados dos testes fenotípicos e moleculares de 90 amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> isoladas de leite de vacas de fazendas leiteiras do Estado de Minas Gerais.....	54
Tabela 5 -	Resultado dos testes fenotípicos em amostras positivas para o gene <i>blaZ</i>	55
Tabela 6 -	Resultados dos testes fenotípicos e moleculares para caracterização da susceptibilidade ou resistência à tetraciclina.....	56

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ATCC- *American Type Culture Collection*
BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*
CAV – Centro de Ciências Agroveterinárias
CIM – Concentração inibitória mínima
CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*
DNA – Ácido desoxirribonucleico
dNTP – Desoxirribonucleotídeo trifosfatado
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
CFMV – Conselho Federal de Medicina Veterinária
EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
NMC – National Mastitis Council
SC – Santa Catarina
pb – pares de base
RPP – Proteínas de Proteção Ribossomal
PBP- Proteína Ligadora de Penicilina
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
TBE – Tampão Tris Borato – EDTA
TE – Tampão Tris - EDTA
UDESC – Universidade do Estado de Santa Catarina
VP – Voges-Proskauer

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	23
2.1	MASTITE EM BOVINOS.....	23
2.2	RESISTÊNCIA DE <i>Staphylococcus</i> sp. AOS ANTIMICROBIANOS.....	25
2.2.1	Mecanismo de ação da penicilina.....	26
2.2.2	Mecanismo de resistência à penicilina.....	27
2.2.3	Mecanismo de ação da tetraciclina.....	31
2.2.4	Mecanismo de resistência às tetraciclinas.....	32
2.2.4.1	<i>Genes de resistência às tetraciclinas</i>	34
2.3	TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE E RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS.....	37
2.4	TESTE DE DETECÇÃO DA BETALACTAMASE.....	39
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	40
3.1	AMOSTRAS BACTERIANAS.....	40
3.2	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA PELO MÉTODO DE E- TEST [®]	42
3.3	DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DE β - LACTAMASE.....	43
3.4	EXTRAÇÃO DE DNA BACTERIANO.....	43
3.5	IDENTIFICAÇÃO DE <i>Staphylococcus aureus</i> POR PCR.....	45
3.6	AMPLIFICAÇÃO DE GENE DE RESISTÊNCIA À PENICILINA.....	45
3.7	AMPLIFICAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA À TETRACICLINA.....	46
3.8	ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE.....	47
3.9	SEQUENCIAMENTO DOS GENES <i>bla_Z</i> ,	

	<i>tet(K)</i> , <i>tet(L)</i> , <i>tet(M)</i> e <i>tet(O)</i>	48
4	RESULTADOS	49
4.1	TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE PELO MÉTODO DE DISCO-DIFUSÃO EM ÁGAR GEL.....	49
4.2	CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE AMPICILINA, PENICILINA E TETRACICLINA.....	49
4.3	DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DA ENZIMA β - LACTAMASE PELO MÉTODO DOS DISCOS DE CEFINASE™.....	50
4.4	AMPLIFICAÇÃO DO GENE DE RESISTÊNCIA À PENICILINA.....	51
4.5	AMPLIFICAÇÃO DOS GENES DE RESISTÊNCIA À TETRACICLINA.....	53
4.6	SEQUENCIAMENTO PARCIAL DOS GENES <i>blaZ</i> , <i>tet(K)</i> , <i>tet(L)</i> , <i>tet(M)</i> e <i>tet(O)</i> AMPLIFICADOS.....	53
4.7	COMPARAÇÃO ENTRE OS TESTES FENOTÍPICOS E MOLECULARES.....	54
5	DISCUSSÃO	57
6	CONCLUSÃO	62
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
	ANEXO A - RESULTADO DO TESTE DE DISCO DIFUSÃO EM ÁGAR GEL DE 90 AMOSTRAS DE <i>Staphylococcus aureus</i>	77
	ANEXO B – PRIMERS UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE PCR, TAMANHO DOS FRAGMENTOS ESPERADOS, POSIÇÃO DE PAREAMENTO	86
	ANEXO C - RESULTADOS DOS TESTES FENOTÍPICOS E MOLECULARES REALIZADOS NAS 90 AMOSTRAS DE <i>S.</i> <i>aureus</i> COM FENÓTIPO DE RESISTÊNCIA À PENICILINA E/OU TETRACICLINA	87

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento dos antimicrobianos representou um grande passo na clínica médica humana e na veterinária. Entretanto, a seleção de micro-organismos resistentes a partir do uso desses princípios ativos gera grande preocupação na comunidade médica e científica. Estudar a distribuição dos genes de resistência e a suas formas de manifestação fenotípica *in vitro* é importante para estabelecer medidas terapêuticas e de controle necessárias para sucesso clínico (MOELLERING, 1998; WENDLANDT; SCHWARZ; SILLEY, 2013).

A mastite é a doença mais frequente em animais de produção de leite. É a infecção da glândula mamária causada principalmente por micro-organismos. Acomete animais em plena fase de produção e idade reprodutiva, gerando grande parte dos prejuízos nas fazendas leiteiras devido aos gastos com medicamentos, descarte do leite e perda de animais (DEMEU, 2009; RIBEIRO et al., 2014).

Staphylococcus aureus é a principal bactéria responsável pela mastite subclínica e clínica em todo o mundo. Sua importância como agente patogênico da mastite é ainda mais relevante devido à facilidade com que se torna resistente à ampla variedade de antimicrobianos. O primeiro antimicrobiano desenvolvido foi a penicilina e já no ano de 1942 foram relatados *S. aureus* resistentes ao princípio ativo (LUNDBERG et al., 2014; LIVERMORE, 2000; LOWY, 2003). As tetraciclinas compreendem uma classe de antimicrobianos de amplo espectro de ação. Seu uso foi amplamente disseminado nos últimos 60 anos, inclusive como promotor de crescimento em animais de produção (ROBERTS, 2005).

O objetivo geral do trabalho foi realizar a caracterização fenotípica e molecular da resistência aos antimicrobianos ampicilina, penicilina e tetraciclina em amostras de *S. aureus* isolados de mastite bovina. O trabalho também teve como objetivos específicos a determinação da concentração inibitória mínima dos antimicrobianos penicilina, ampicilina e tetraciclina frente a amostras de *S. aureus* isoladas de mastite bovina. Verificar a existência de genes de resistência à penicilina (*blaZ*) e tetraciclina – *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)*, *tet(O)* e a co-existência dos mesmos nas amostras de *S. aureus* isoladas de mastite bovina.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Mastite em bovinos

A produção nacional de leite tem mostrado grande crescimento, representando nas últimas décadas um setor em constante expansão e tecnificação (WAGNER, GEHLEN, WIEST, 2004). Em 2012, a produção foi de 32.304.402 toneladas de leite, representando um crescimento de 208.206 toneladas na produção de leite em relação ao ano de 2011 (FAO, 2013). Concomitantemente ao aumento da produtividade, transtornos na saúde animal são intensificados. Neste aspecto, doenças infecciosas que acometem o gado leiteiro podem gerar grandes prejuízos e interferir no aumento da produção.

A mastite é responsável por grande perda econômica nos rebanhos. Trata-se da inflamação da glândula mamária. A forma clínica leva a alterações evidentes tanto no órgão (edema, aumento da sensibilidade e rubor) quanto no leite (aparecimento de grumos) e perda das características do produto. A mastite clínica é de fácil detecção e provoca prejuízos devido ao descarte de leite, gastos com antibioticoterapia e descarte precoce dos animais. A forma subclínica não leva a manifestações de sinais clínicos. São necessários outros métodos diagnósticos para sua detecção, como a contagem de células somáticas (CCS), que representa as células de defesa do sistema imune (leucócitos) que migram para a glândula mamária para combater a infecção. É a forma de mastite que mais gera prejuízos devido ao decréscimo da produção ao longo das lactações, pois a lesão no tecido glandular torna as células secretoras menos eficientes. Dessa forma, é considerado um mal invisível dentro do rebanho leiteiro (TRONCO, 2003).

Os agentes etiológicos da mastite podem ser divididos em patógenos principais e secundários. *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, coliformes, outros *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pseudomonas* sp., *Trueperella pyogenes* e *Serratia* sp. são considerados patógenos principais, por provocarem uma grande alteração na CCS e na composição do leite. *Staphylococcus* spp. coagulase negativos e *Corynebacterium bovis* geram poucas alterações na CCS e na glândula mamária, sendo considerados patógenos secundários. Os patógenos podem ser classificados também segundo a forma de transmissão. Micro-organismos contagiosos são aqueles transmitidos durante a ordenha, neste grupo incluem-se *Streptococcus agalactiae*, *S. aureus*, *Corynebacterium bovis*, *Mycoplasma* sp. e *Staphylococcus* spp. coagulase negativos. Micro-organismos ambientais fazem parte da microbiota ambiental, como pasto, locais alagados e instalações, são exemplos *Escherichia coli*, outros coliformes, *Streptococcus uberis*, *Enterococcus* sp., *Streptococcus equinus* e outros *Streptococcus* do ambiente (BRITO et al.,1999; MÜLLER et al., 2002).

Dentre os patógenos da casuística desta enfermidade, *Staphylococcus aureus* destaca-se por ser o patógeno mais estudado. É o principal agente etiológico da mastite, e seu principal sítio de localização é o úbere. Por se tratar de um patógeno contagioso, sua transmissão ocorre entre vacas durante a ordenha (ZAFALON et al., 2008). A infecção intramamária por este agente pode levar a alterações visíveis no leite e no úbere, além de estar associada ao aumento de células somáticas (BRADLEY et al., 2007). Este micro-organismo ataca rapidamente vários tipos de células na glândula mamária e seu controle é um grande desafio, pois está associado a casos crônicos, que possuem baixa resposta à terapia com antimicrobianos. A baixa resposta à terapêutica tem várias causas, como a localização intracelular do patógeno nas células epiteliais da glândula mamária, resposta imunitária

do hospedeiro e vários fatores bacterianos envolvidos, como por exemplo, a produção de biofilme (OVIEDO-BOYSO et al., 2007).

2.2 Resistência de *Staphylococcus* spp. aos antimicrobianos

Bactérias pertencentes ao gênero *Staphylococcus* são de extrema importância para a saúde pública, não só por sua patogenicidade, mas também por apresentar grande facilidade de aquisição de resistência por meio de mutações ou transferência de DNA. A resistência ocorre devido à aquisição de genes de resistência em populações de bactérias inicialmente sensíveis ao antimicrobiano, originando cepas resistentes emergentes. Dessa forma, ela pode ser influenciada pelos genes já existentes na cepa bacteriana e pela transferência de material genético entre cepas. Os genes de resistência estão presentes nos micro-organismos produtores de substâncias antimicrobianas como uma forma de se defender do próprio metabólito sintetizado. É possível a transmissão horizontal desses genes para outras bactérias ao integrar elementos genéticos móveis como plasmídeos, transposons e cassetes, levando à sua rápida propagação (LIVERMORE, 2000). Este fenômeno ocorre principalmente quando há pressão seletiva determinada pelo uso dessas drogas em humanos e animais (CHOPRA, HAWKEY, HINTON, 1992).

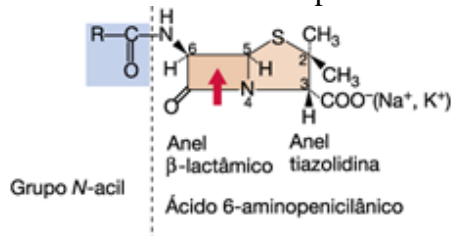
A partir do desenvolvimento dos primeiros antimicrobianos como a penicilina, *S. aureus* era sensível a todos os antibióticos posteriormente desenvolvidos. Entretanto, a resistência surgiu rapidamente em algumas cepas, e nos anos de 1950 a bactéria já havia desenvolvido resistência tanto aos antimicrobianos betalactâmicos como às tetraciclina (CHAMBERS, 1988; CHOPRA, HAWKEY, HINTON 1992). A resistência de *S.aureus* aos antimicrobianos é um assunto de grande relevância por se tratar de um patógeno primário da

mastite bovina, de relevância para a saúde pública e por estar associados à multirresistência (SCHWARZ et al., 1998).

2.2.1 Mecanismo de resistência à penicilina

A penicilina é um antimicrobiano da classe dos betalactâmicos que possui ação bactericida, desenvolvida no ano de 1928 por Alexandre Fleming a partir de um extrato produzido por fungos do gênero *Penicillium*. Sua molécula apresenta um anel de tiazolidina ligado a um anel betalactâmico, onde há uma cadeia lateral. A penicilina é padronizada em unidades internacionais (UI), onde uma UI representa a atividade específica de penicilina contida em 0,6 µg do sal sódico cristalino da penicilina (GOODMAN, 2005).

Figura 1 - Estrutura molecular da penicilina



Fonte: Madigan et al., 2010

Seu mecanismo de ação envolve a síntese da parede celular bacteriana na composição da estrutura denominada peptidoglicano. O peptidoglicano é um polímero constituído por açúcares e aminoácidos, responsável por proporcionar rigidez e estabilidade mecânica à célula bacteriana. É composto por cadeias de glicano com ligações cruzadas estabelecidas por ligações peptídicas (GOODMAN, 2005). Dessa forma, a penicilina é capaz de inibir a proteína ligante de penicilina

(PBP), essencial para a formação do peptidoglicano, impedindo a formação das ligações cruzadas das cadeias deste polímero (QUINN et al., 2005).

Dentre as PBPs presentes nas células bacterianas, a D-alanina-carboxipeptidase e a transpeptidase são responsáveis pela formação das ligações cruzadas entre as camadas do peptidoglicano. Dessa forma, a molécula da penicilina possui uma região em sua estrutura que lembra uma ligação peptídica semelhante à presente no D-alanil-D-alanina do pentapetídeo da fração básica da parede celular. Desse modo as enzimas se ligam irreversivelmente ao anel betalactâmico, formando um complexo peniciloil-enzima inativo com o anel betalactâmico aberto. Consequentemente, não há a formação das cadeias cruzadas entre as camadas de peptidoglicano, gerando uma parede celular enfraquecida (VERMELHO; BASTOS; BRANQUINHA, 2008). Além disso, a penicilina possui habilidade de acionar enzimas autolíticas associadas à membrana que são capazes de destruir a parede celular e inibir as enzimas endopeptidase e glicosidase associadas ao crescimento celular. É também atribuída à penicilina a inibição da síntese de RNA em algumas bactérias, causando a morte sem lise celular (YAO, MOELLERING, 2011).

2.2.2 Mecanismos de resistência à penicilina

Com o uso terapêutico das penicilinas houve concomitantemente a seleção de micro-organismos resistentes à droga. Há três mecanismos estabelecidos que conferem resistência às penicilinas, a produção de betalactamase, alterações nas PBPs e a impossibilidade da droga alcançar seu sítio alvo, pois alguns micro-organismos podem ser naturalmente resistentes devido a sua característica estrutural (LI et al., 2007). É o caso das bactérias Gram negativas, que possuem a camada de lipopolissacarídeo e a cápsula

(GOODMAN, 2005). Em *S. aureus*, são observados os dois primeiros mecanismos citados (ROBLES et al., 2014).

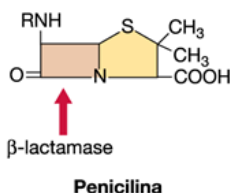
A resistência mediada por alterações nas PBPs em bactérias normalmente susceptíveis pode ser devido à superprodução de PBP, à aquisição de PBP com baixa afinidade, à recombinação de PBP com variedades mais resistentes e à mutações pontuais que geram baixa afinidade. Alterações em PBPs é um tipo de resistência encontrada principalmente em bactérias Gram positivas, mas também pode ser encontrada em bactérias Gram negativas (YAO; MOELLERING, 2011).

O mecanismo através da alta expressão de PBP geralmente é incomum. Além disso, a sensibilidade ou a resistência depende do número de moléculas do betalactâmico relativo ao número de sítios alvos. A aquisição de PBP é bem exemplificada pela expressão de resistência à metilicina em *S. aureus*. Algumas cepas expressam a PBP2a, que apresenta baixa afinidade ao betalactâmico (RICE, BONOMO, 2011). Dessa forma, a PBP2a não se liga à droga e continua a executar a reação de transpeptidação para a biossíntese da parede celular. O micro-organismo que apresenta resistência através desse mecanismo é resistente a toda a classe de betalactâmicos. A PBP2a difere das outras proteínas devido ao seu sítio ativo bloquear a ligação de todas as drogas betalactâmicas, embora permita a transpeptidação (VERMELHO; BASTOS; BRANQUINHA, 2008). Resistência através de recombinação entre PBPs susceptíveis e espécies resistentes é restrita a espécies capazes de transformação. Importantes entre essas espécies são *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae* e *Neisseria meningitidis*. Mutações pontuais dentro do gene *pbp* (gene codificador da proteína ligante de penicilina) também resulta em baixa afinidade para betalactâmicos (YAO; MOELLERING, 2011).

As enzimas betalactamases fazem parte da família de peptidases dentro das PBPs. Elas interagem com moléculas

betalactâmicas cataliticamente rompendo o anel betalactâmico, resultando em um composto peniciloil- β -lactamase, que é hidrolisado formando antibiótico inativo com o anel betalactâmico aberto e betalactamase (VERMELHO; BASTOS; BRANQUINHA, 2008).

Figura 2 – Ação da betalactamase



Fonte: Madigan et al. (2010)

A enzima betalactamase representa uma família que possui elevada diversidade estrutural e também de substratos. Podem ser classificadas através do sistema de Amber, de acordo com a sequência de seus aminoácidos, em quatro classes: A, B, C, D. As classes A, C, D são do tipo serina, pois apresentam resíduo deste aminoácido no centro ativo da molécula. As enzimas pertencentes à classe B são metalo- β -lactamases, visto que requerem zinco para serem tornarem efetivas. Outra classificação é através do sistema de Bush-Jacoby, que classifica as betalactamases de acordo com similaridades funcionais (substrato e perfil inibitório) e possui quatro grupos com diversos subgrupos (1, 2a, 2b, 2c...) (STRATTON, 1996; VERMELHO; BASTOS; BRANQUINHA, 2008).

As betalactamases que inibem penicilina e cefalosporinas, conhecidas como penicilinasas e cefalosporinasas, são pertencentes à classe A (do tipo serina). Em bactérias Gram positivas essas enzimas são secretadas no

meio de cultura, em Gram negativas as mesmas são secretadas no espaço periplasmático (VERMELHO; BASTOS; BRANQUINHA, 2008). As enzimas pertencentes à classe A possuem resíduos de serina, lisina e arginina. Os tipos de resíduos são críticos para ligação ao anel betalactâmico e hidrogênio. As betalactamases da classe B (metalo- β -lactamases) possuem zinco ou outro metal pesado necessário para a reação de catálise. O átomo de zinco é mantido por três histadinas e uma molécula de água. Esta classe é responsável por gerar resistência a uma ampla variedade de betalactâmicos, incluindo cefamicina e carbapenemas. E são resistentes à inativação por clavulanato, sulbactam e tazobactam.

As betalactamases da classe C são produzidas em maior ou menor grau em todas as bactérias Gram negativas. Hidrolisam cefalosporinas, incluindo as de amplo espectro, e são resistentes à inibição por clavulanato, sulbactam, tazobactam. A classe D envolve as enzimas hidrolizadoras de oxacilina (OXA-type), que são comumente descritas em *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter* sp. e *Pseudomonas aeruginosa*. Confere resistência a ampla variedade de penicilinas e são pouco inibidas por clavulanato. Seus genes codificadores são localizados frequentemente em elementos genéticos móveis, além de estarem comumente associadas ao fenótipo de betalactamase de espectro ampliado (ESBL-Extended spectrum betalactamases) (YAO; MOELLERING, 2011).

O gene responsável pela codificação de betalactamases em *S. aureus* é o *blaZ*, para expressão são organizados em um grupo *blaZ-blaR1-blaI*, que codifica respectivamente *blaZ* (betalactamase), *blaI* repressor e *blaR1* anti-repressor, tal gene pode estar presente no cromossomo, em plasmídeos ou em transposons (LI et al., 2007). Integrons também são importantes para a disseminação do gene *bla*, pois são elementos genéticos que têm capacidade de coletar e expressar genes carregados em segmentos móveis de DNA, denominados cassetes. Estes

capturam genes de resistência usando um mecanismo de recombinação sítio-específico e possuem a enzima integrase responsável pela inserção dos cassetes no integron. Quando inseridos, os genes capturados podem ser expressos pelo promotor presente no integron. Os integrons salientam a rápida evolução de múltipla resistência bacteriana entre diversas espécies bacterianas, pois podem carrear múltiplos genes de resistência, possuem mobilidade, capacidade de captura e disseminação de genes de resistência. (YAO; MOELLERING, 2011).

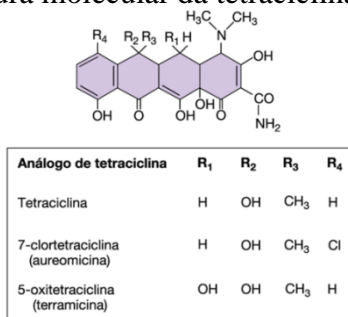
2.2.3 Mecanismo de ação das tetraciclinas

As tetraciclinas são drogas bacteriostáticas de amplo espectro de ação. Estas drogas foram desenvolvidas nos anos de 1940 a partir de metabólitos produzidos por bactérias do gênero *Streptomyces*. As primeiras tetraciclinas descritas foram clortetraciclina e oxitetraciclina. A molécula compreende um tetraciclo fundido linearmente onde os grupos funcionais são ligados (CHOPRA, ROBERTS, 2001). Seu mecanismo de ação é através da inibição da síntese de proteínas, se ligando reversivelmente na subunidade 30S dos ribossomos bacterianos. Ocorre então o bloqueio do sítio A, inibindo a entrada de aminoacil-tRNA (AA-tRNA) nos ribossomos. Portanto, essas proteínas impedem a adição de novos aminoácidos na cadeia peptídica, interrompendo a produção de polipeptídios, o que resulta na inibição do crescimento bacteriano (VERMELHO; BASTOS; BRANQUINHA, 2008).

Este antimicrobiano é ativo contra bactérias Gram negativas e Gram positivas, além de ter ação em *Mycoplasma* sp., *Chlamydia* sp., *Rickettsiae* sp. e protozoários. Além disso, as tetraciclinas são usadas como promotores de crescimento em animais de produção, por melhorar o desempenho dos mesmos e pelo seu custo-benefício. Por consequência, esta droga é a segunda mais utilizada, após os betalactâmicos (LEVY, 1992).

Em medicina veterinária as tetraciclinas são usadas desde 1950, sendo as famílias mais utilizadas a oxitetraciclina, clortetraciclina e doxicilina. Um estudo realizado em 2010 sobre o uso de antimicrobianos na produção leiteira em um município de Santa Catarina demonstrou que as tetraciclinas representaram 36% de todos os antibióticos utilizados (KORB et al., 2011). Entretanto, seu amplo uso clínico tanto em medicina humana como em veterinária proporcionou a seleção de micro-organismos resistentes.

Figura 3 – Estrutura molecular da tetraciclina



Fonte: Madigan et al. (2010)

2.2.4 Mecanismo de resistência às tetraciclinas

Inicialmente todas as bactérias, comensais e patogênicas, foram suscetíveis à tetraciclina. Em 1953, a primeira bactéria resistente à tetraciclina isolada foi da espécie *Shigella dysenteriae*. Em 1969, 38% dos *S. aureus* isolados de um hospital da cidade de Boston (EUA) foram resistentes à tetraciclina (SABBATH, 1969). Consequentemente, seu uso foi se tornando limitado à medida que bactérias resistentes foram aparecendo (FALKOW et al., 1975; LEVY, 1992).

O gene *tet* é responsável por determinar a condição de resistência à tetraciclina. Esses genes estão em sua maioria

associados a plasmídeos, transposons e integrons. Por estarem ligados a elementos móveis, esses genes estão amplamente disseminados em várias espécies bacterianas. O gene *tet* foi identificado em mais de 32 bactérias Gram negativas e 22 bactérias Gram positivas. Além disso, são frequentemente associados com multirresistência bacteriana. A resistência pode ocorrer por três mecanismos codificados pelos genes *tet*, através de bombas de efluxo da droga, alteração do sítio de ação ribossomal e produção de enzimas inativadoras da droga (SCHWARZ et al., 1998; VRIES et al., 2009).

O mecanismo de resistência através de bombas de efluxo está relacionado com proteínas de membrana que por transporte ativo exportam a droga para fora da célula bacteriana. Dessa forma, ocorre a redução da concentração intracelular de tetraciclina, impedindo sua ação nos ribossomos. As proteínas de efluxo existem na forma de um multímero na membrana e efetuam a troca de um próton para um complexo cátion-tetraciclina contra o gradiente de concentração (YAMAGUCHI et al. 1990). Cada gene codifica para uma proteína de efluxo de 46 kDa ligada à membrana com 12 (Gram positiva) ou 14 (Gram negativa) regiões que atravessam a membrana hidrofóbica, separadas por uma pequena região hidrofílica de aminoácidos (CHOPRA, ROBERTS, 2001).

As bombas de efluxo de tetraciclina possuem proteínas estruturais semelhantes a outras proteínas de bombeamento ativo associadas à multirresistência aos antimicrobianos. Em Gram negativas, seus genes codificadores são amplamente disseminados e normalmente associados aos plasmídeos conjugativos. Esses plasmídeos podem carrear outros genes de resistência, conseqüentemente, a seleção de resistência à tetraciclina pode selecionar para isolados multirresistentes a outros antimicrobianos (ROBERTS, 1996).

Proteínas de proteção ribossomal (RPP- *Ribosomal protection proteins*) geram resistência à tetraciclina por se

ligarem aos ribossomos provocando uma mudança de conformação dependente da hidrólise de GTP (guanosina trifosfato), impedindo a ligação das tetraciclinas em seu sítio alvo. Dessa forma, a síntese de proteínas bacterianas importantes para seu metabolismo não é interrompida por ação da droga (VERMELHO; BASTOS, BRANQUINHA, 2008). As RPPs não produzem alto nível de resistência se comparada ao mecanismo de efluxo (LEVY et al., 1989).

Outro mecanismo de resistência é através da alteração química da droga, tornando a mesma inativa como inibidor da síntese proteica. A enzima monoxigenase flavina dependente cataliza a hidroxilação de tetraciclina em 11a-hidroxitetraciclina. Consequentemente, a tetraciclina hidroxilada perde sua propriedade antimicrobiana. Tal reação ocorre na presença de fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADPH) e oxigênio (VOLKERS et al., 2011).

2.2.4.1 Genes de resistência às tetraciclinas

É relatada a existência de 16 tipos de genes *tet*. Os relacionados ao mecanismo de efluxo são *tet(A)*, (B), (C), (D), (E), (G), (I), (K) e (M). Os genes de resistência associados à proteção ribossomal e também ao mecanismo de efluxo são *tet(B)*, (C), (D), (H), (K), (L), (M), (O), (P), (Q) e (S). Referente à alteração enzimática da droga, há somente um gene, o *tet(X)* (ROBERTS, 1996). Em bactérias Gram positivas, os genes que codificam para bombas de efluxo são *tet(K)*, (L) e (A), em Gram negativas, são *tet(A)*, (C), (D), (E), G e H. As proteínas de proteção ribossomal são codificadas pelos genes *tet(K)*, (L), (M), (O), (S), (P), (Q), (B), (D) e (H) (CHOPRA, HAWKEY, HINTON, 1992). O mecanismo de alteração da droga é codificado pelo gene *tet(X)*, encontrado em transposons ligado ao gene *erm(F)*, que codifica a enzima flavina monoxigenase (VOLKERS et al., 2011).

Dos 16 genes de resistência à tetraciclina, 13 são frequentemente associados a plasmídeos, são eles: *tet(A)*, (B), (C), (D), (E), (G), (H), (K), (L), (M), (O), (P), (S) e (X). Os outros genes, localizados no cromossomo, são *tet(B)*, (K), (L), (M), (O) e (Q). Contudo, *tet(B)* e *tet(L)* raramente são encontrados no cromossomo e *tet(K)* pode estar associado com plasmídeos integrativos (ROBERTS, 1994). É relatada grande variação na distribuição dos genes *tet* em função de sua localização. Dentre eles, considera-se *tet(M)* amplamente distribuído entre os diferentes gêneros e espécies bacterianas, pois frequentemente está associado a transposons conjugativos (MORSE et al., 1986; LEVY, 1992).

Tanto a expressão de proteínas envolvidas no mecanismo de efluxo quanto no mecanismo de proteção ribossomal são reguladas pela presença/ausência de tetraciclina. A regulação da expressão de proteínas de efluxo em bactérias Gram positivas parece não ser regulada por uma proteína repressora específica, mas análises sequenciais demonstram estar relacionada com mecanismo de atenuação da tradução (RICE; BONOMO, 2011). A expressão de proteínas de efluxo codificada por *tet(L)* pode variar conforme sua localização, plasmidial ou cromossomal. Para o gene *tet(L)* plasmidial, a regulação ocorre através de um RNA mensageiro em estrutura alça-laço que possui dois sítios de ligação ao ribossomo (RBS- *Ribosomal binding site*), RBS1 e RBS2. Os ribossomos se ligam ao RBS1 e traduzem um pequeno peptídeo que termina antes de RBS2. Quando ocorre a exposição de RBS2, os ribossomos se ligam e começam a traduzir proteínas estruturais para formação de bombas de efluxo. Isso sugere que a regulação é por atenuação da tradução que ocorre na ausência de tetraciclina. Contudo, na presença de tetraciclina, uma segunda estrutura de RNAm na forma alça-laço revela RBS2 e permite a tradução da proteína da bomba de efluxo, que torna a célula fenotipicamente resistente à tetraciclina (SCHWARZ et al., 1992).

A regulação de *tet(L)* cromossomal não envolve a revelação de um sítio de ligação ao ribossomo como descrito acima. Acredita-se que ocorra um retardamento dos ribossomos durante a tradução dos códons iniciadores, não ocorrendo a tradução de proteínas estruturais (STASINOPOULOS; FARR; BECHHOFER, 1998). O gene *tet(L)* também parece ser regulado pela elevação do pH e presença de Na⁺ e K⁺. A produção da proteína TetK é induzida por tetraciclina, entretanto, como para TetL, a produção também parece ser regulado por outros fatores não completamente elucidados (CHOPRA, ROBERTS, 2001).

A regulação da expressão dos genes *tet(M)* e *tet(O)* não está bem estabelecida, conquanto, parece haver algum mecanismo regulatório. Estudos de Nesin et al. (1990) demonstraram que a pré-exposição de tetraciclina em *S. aureus* aumentou a resistência à tetraciclina e também o nível de transcritos de RNAm para *tet(M)*. Chopra e Roberts (2001) compararam as regiões *upstream* de sete genes *tet(M)* usando *Ureaplasma urealyticum* como parâmetro e encontraram entre 96% a 100% de similaridade sequencial. Entretanto, em regiões *downstream* houve grande variação. Desse modo, a pequena variação nas sequências *upstream* gera a hipótese que as mesmas estão envolvidas na regulação.

Em *S. aureus* os genes *tet(K)* e *tet(L)* codificam para produção de bombas de efluxo (SCHWARZ et al., 1998). Para a codificação de proteínas de proteção ribossomal os genes *tet(M)* e *tet(O)* são os mais encontrados na mesma espécie bacteriana (VRIES, 2009). As proteínas de proteção ribossomal transcritas pelos genes *tet(M)* e *tet(O)* possuem 70% de similaridade sequencial (CHOPRA, HAWKEY, HINTON 1992). Os genes *tet(K)* e *tet(L)* possuem 60% de identidade e codificam proteínas que levam a resistência da bactéria à tetraciclina e clortetraciclina. Também podem ser identificados em bactérias Gram positivas através de testes fenotípicos, pois conferem resistência à tetraciclina, mas não à minociclina. São

encontrados em pequenos plasmídeos que podem se integrar no cromossomo de *Staphylococcus* spp. (GILLESPIE; MAY; SKURRAY, 1986). Tanto *tet(K)* quanto *tet(L)* podem ser encontrados juntos no mesmo isolado bacteriano, entretanto, não é possível distingui-los através de teste de resistência a diferentes tetraciclinas, sendo necessário o uso de técnicas moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR) (ROBERTS, 1996).

2.3 TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE E RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

A determinação da resistência aos antimicrobianos é realizada por meio de testes de susceptibilidade. Esses testes são de grande importância, pois são capazes de avaliar a susceptibilidade de um micro-organismo a vários agentes antimicrobianos (CLSI, 2008). Além disso, são de grande importância para determinar a escolha terapêutica, visto a complexidade dos mecanismos de resistência e seleção de cepas resistentes. Entre os diversos métodos, o teste de disco-difusão em ágar gel e concentração inibitória mínima são os mais utilizados.

O método de disco-difusão se baseia na medida do diâmetro dos halos de inibição correlacionados às concentrações inibitórias mínimas (CIM) com cepas conhecidas, sensíveis ou resistentes aos antimicrobianos. O método padronizado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008) para bactérias não fastidiosas, como *S. aureus*, faz uso de meios gelosos, como o ágar Mueller-Hinton. Este apresenta boa reprodutibilidade entre os diferentes lotes nos testes de sensibilidade, permite crescimento satisfatório e contém baixo teor de inibidores de sulfonamidas, trimetoprim e tetraciclinas.

Outra forma de avaliar a susceptibilidade e resistência de um micro-organismo frente aos antimicrobianos é através da sua concentração inibitória mínima. O Etest® é um método quantitativo utilizado para esta finalidade e consiste em uma tira de plástico não poroso. A superfície superior da tira apresenta uma escala em $\mu\text{g/mL}$ e o código identificador do agente antimicrobiano. Na superfície inferior há um gradiente de concentrações referente a 15 diluições duplas de acordo com o método convencional para determinação da CIM. Quando aplicada na superfície inoculada de um meio gelosado, a tira transfere o gradiente do antimicrobiano ao meio. Em 24 horas, forma-se uma elipse de inibição, simétrica e centralizada ao longo da tira. Desse modo, o ponto de interceptação da tira na elipse corresponde ao valor da CIM do antimicrobiano, em $\mu\text{g/mL}$ (JORGENSEN; FERRARO, 2009)

2.4 TESTE DE DETECÇÃO DE BETALACTAMASE

A detecção de betalactamase permite fornecer informações importantes de caráter clínico e epidemiológico. Além disso, pode esclarecer resultados de testes de susceptibilidade em amostras limítrofes na CIM (0,06 – 0,25 $\mu\text{g/mL}$) para penicilina. Desse modo, um resultado positivo para produção de betalactamase prediz a resistência a penicilina, amino-penicilina e carboxi-penicilina em *Staphylococcus* sp. (CLSI,2013)

O teste direto para detecção de betalactamase demonstra que o isolado é resistente a drogas betalactâmicas, mas o resultado negativo não é conclusivo, pois outros mecanismos podem estar envolvidos na resistência a betalactâmicos. Existem três testes diretos para detecção de betalactamase: o método acidimétrico, o método iodométrico e o método cromogênico. Todos envolvem o teste com bactéria em crescimento em meio não seletivo, e os resultados são

avaliados em 60 segundos a 60 minutos. Os testes acidimétrico e iodométrico usam um indicador colorimétrico que detecta a presença de ácido penicilóico seguinte à reação de hidrólise da penicilina. No teste acidimétrico o substrato é a penicilina citrato tamponada e o indicador, o corante vermelho de fenol. A presença de ácido penicilóico leva a um decréscimo no pH, resultando na mudança de cor, de amarelo para vermelho. No teste iodométrico, o substrato é penicilina fosfato tamponada e um complexo amido iodado. A presença de ácido penicilóico reduz o iodo e evita a combinação com o amido, gerando uma reação incolor; a cor violeta corresponde ao resultado negativo (SWENSON; PATEL; JORGENSEN, 2011).

A cefalosporina cromogênica (nitrocefina) pode ser usada em testes em tubo de ensaio, mas há sua apresentação comercial em tiras ou discos de papel. A hidrólise pela betalactamase em moléculas de cefalosporinas gera uma mudança na carga dos elétrons, levando à produção de cor. Desse modo, este teste depende da visualização da produção de cor, que presume o resultado da hidrólise da molécula de betalactâmico pela ação das betalactamases (SWENSON; PATEL; JORGENSEN, 2011).

S. aureus podem produzir betalactamase constitutivamente, mas algumas cepas só produzem quantidades detectáveis após exposição a um agente indutor, geralmente um antibiótico betalactâmico. Se a bactéria produz betalactamase sem indução, o resultado positivo pode ser reportado. Entretanto, o resultado negativo só pode ser reportado se o micro-organismo foi exposto a um agente indutor. Conquanto, ainda é possível que o teste direto não seja suficientemente sensível (SWENSON; PATEL; JORGENSEN, 2011). O CLSI (2013) alerta que para uma acurada detecção pode haver a necessidade de indução da enzima. Dessa forma, é recomendado testar o crescimento bacteriano da margem do halo de inibição de um teste de disco-difusão em ágar com oxaciclina (1 µg).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS BACTERIANAS

O experimento foi realizado com 90 amostras de *S. aureus* isoladas de mastite subclínica bovina. As 90 amostras foram selecionadas de um total de 266 amostras *S. aureus* isoladas de quartos mamários de vacas de onze propriedades leiteiras da Zona da Mata de Minas Gerais, entre os anos de 2008 a 2010. As amostras estavam estocadas em freezer -80 e fazem parte da Coleção de Micro-organismos de Interesse da Agroindústria e Pecuária, da Embrapa Gado de Leite, sediada em Juiz de Fora, Minas Gerais.

Os procedimentos de isolamento e identificação dessas amostras seguiram as recomendações do National Mastitis Council (NMC, 2004). Para a identificação da espécie *S. aureus* foram realizados os testes de coagulase em tubo e de Voges-Proskauer (produção de acetoína). A confirmação da espécie foi feita pela amplificação do gene *femA*, específico para *S. aureus* pela reação de PCR, descrito no item 3.5. Posteriormente, as amostras foram armazenadas em meio especial de armazenamento contendo leite em pó desnatado (Skim Milk, Difco, Sparks, MD, USA) com 10% de glicerol (Cromoline, Diadema, SP, Brasil) em freezer a -80°C.

Todas as 266 amostras foram previamente submetidas ao teste de susceptibilidade a diferentes antimicrobianos através do método de disco-difusão em ágar gel. Os critérios para avaliação da susceptibilidade e resistência seguiram as recomendações do CLSI (2008). Dessa forma, foram selecionadas 90 amostras resistentes à penicilina e/ou ampicilina e/ou tetraciclina para realização deste estudo. Algumas dessas amostras apresentaram resistência também aos antimicrobianos clindamicina, eritromicina, enrofloxacina,

gentamicina e sulfametoxazol. Todas as amostras foram susceptíveis à cefalotina, ceftiofur, oxacilina e sulfametoxazol com trimetoprim (Anexo A). Na Tabela 1 é mostrada a origem das amostras e as resistências encontradas em cada propriedade.

Tabela 1 - Origem das amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina na Zona da Mata de Minas Gerais e utilizadas neste estudo.

Propriedade	Número de amostras	Município	Resistência fenotípica
A	2	Barbacena	AMP, PEN, TET
B	9	Bias Fortes	AMP, PEN, SUL
C	7	Santa Rita de Ibitipoca	AMP, CLI, ERI, PEN, TET
D	11	Santa Rita de Ibitipoca	AMP, CLI, ERI, PEN, TET
E	5	Santa Rita de Ibitipoca	AMP, CLI, PEN, TET
F	16	Lima Duarte	AMP, GEN, PEN, TET
G	15	Rio Preto	AMP, CLI, ERI, PEN, SUL, TET
H	15	Rio Preto	AMP, CLI, ERI, PEN, SUL, TET
I	6	Rio Preto	AMP, PEN, SUL, TET
J	4	Bicas	AMP, CLI, ENR, ERI, PEN, SUL, TET

Fonte: Produção da própria autora. AMP: ampicilina, CLI: clindamicina, ERI: eritromicina, ENR: enrofloxacina, GEN: gentamicina, PEN: penicilina, SUL: sulfonamida, TET: tetraciclina.

3.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA PELO MÉTODO DE E-TEST[®]

A partir do estoque armazenado em freezer a -80°C , as amostras bacterianas foram repicadas em ágar BHI (Brain Heart Infusion Agar, Himedia, Mumbai, Índia) e examinadas em relação à viabilidade e pureza. As concentrações inibitórias mínimas dos antimicrobianos ampicilina, penicilina e tetraciclina foram determinadas através de gradiente de difusão em ágar (E-TEST[®]) (Biomérieux, Hazelwood, MO, USA). A fita de E-TEST[®] consiste em uma tira de plástico não porosa em que a superfície superior da tira contém uma escala expressando a CIM em $\mu\text{g/mL}$.

As amostras foram inoculadas em ágar BHI e incubadas a 35°C por 24 horas. Em seguida, um inóculo foi preparado em solução salina com turvação equivalente à escala 0,5 de McFarland. As suspensões bacterianas foram inoculadas com o auxílio de um *swab* estéril na superfície do ágar Mueller-Hinton (Difco, Sparks, USA), em três direções. As tiras foram aplicadas à superfície do ágar, dentro de 15 minutos após a semeadura, com a escala contendo os valores de CIM de frente e virada para a abertura da placa. Posteriormente, as placas foram incubadas a $35^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 18 - 24 horas. As leituras da CIM foram realizadas no ponto de inserção da elipse (halo de inibição) formada com a tira. A susceptibilidade das amostras testadas foi determinada de acordo com os critérios estabelecidos pelo fabricante (Biomérieux, Hazelwood, MO, USA) e pelo CLSI (2013). A cepa *S. aureus* ATCC (American Type Culture Collection) 29213 foi utilizada como controle de qualidade do teste.

3.3 DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DE BETALACTAMASE

A determinação da produção da enzima betalactamase foi realizada com o uso de discos de Cefinase™ (BBL™ Cefinase™ Discs, Franklin Lates, New Jersey, USA). Estes contêm nitrocefim, uma cefalosporina cromogênica que muda rapidamente de coloração quando o anel betalactâmico é hidrolisado pela betalactamase. Quando a bactéria produz a enzima, a coloração passa de amarelo para vermelho, após a bactéria ser espalhada na superfície do disco.

As amostras bacterianas foram semeadas em placas de ágar BHI e incubadas em estufa bacteriológica a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. As culturas de 24 horas foram utilizadas para realização do teste. Os discos de Cefinase™ foram dispensados em placas de petri estéreis, divididas em quadrantes numerados, e em seguida, umidificados com água Mili-Q estéril. Com o auxílio de uma alça microbiológica, as amostras foram espalhadas na superfície do disco e foi observada a mudança de coloração. Para *S. aureus*, as reações positivas ocorrem entre 5 minutos e 1 hora. Seguindo as recomendações da American Society of Microbiology (SWENSON; PATEL; JORGENSEN, 2011), as amostras que tiveram resultado negativo foram incubadas com discos de oxacilina (1 µg) em ágar Mueller-Hinton, por 24 horas a 35°C, para observar a produção indutiva de betalactamase. A cepa *S. aureus* ATCC 29213 foi utilizada como controle de qualidade positivo do teste.

3.4 EXTRAÇÃO DE DNA BACTERIANO

As amostras bacterianas foram submetidas ao procedimento de extração de DNA utilizando fenol e clorofórmio. A extração seguiu a metodologia descrita por Hesselbarth e Schwarz (1995). Uma colônia da cultura pura da

amostra foi inoculada em 3 mL de caldo BHI e incubada a 37°C em estufa bacteriológica por 18-24 horas. Uma alíquota de 2 mL da cultura foi transferida para tubos do tipo Eppendorf e centrifugada por 5 minutos a 12.000 x g. O sobrenadante foi imediatamente descartado, foi adicionado ao tubo 1 mL de TES (100 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8,0, 1 mM EDTA) e o conjunto agitado em vórtex. Os tubos foram novamente centrifugados a 12.000 x g durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, foi adicionado 0,5 mL de TES e agitado no vórtex. Posteriormente, foi adicionado 8 µL de lisostafina (1 mg/mL) e os tubos foram agitados com auxílio de uma grade. Em seguida, os tubos foram incubados a 37°C durante 30 minutos e foi adicionado 20 µL de SDS (Dodecil sulfato de sódio) 10%. Os tubos foram virados de cabeça para baixo lentamente várias vezes até o conteúdo se tornar gelatinoso, ficando em temperatura ambiente por 5 minutos após esse procedimento.

Em seguida, foi adicionado 250 µL de fenol e 250 µL de clorofórmio/isoamil (24:1), cada tubo foi agitado com força e centrifugado a 12.000 x g durante 5 minutos. O sobrenadante foi então transferido para outro tubo, com auxílio de uma pipeta com ponteira cortada na diagonal. Esta etapa (adição de fenol e clorofórmio/isoamil e centrifugação) foi repetida; em seguida, foram adicionados 500 µL de clorofórmio/isoamil, os tubos foram agitados com cuidado e centrifugados por 5 minutos a 12.000 x g. Novamente o sobrenadante foi transferido para outro tubo, foram adicionados 500 µL de isopropanol e os tubos foram invertidos várias vezes até a formação de um precipitado. Ao final, os tubos foram centrifugados a 12.000 x g durante 30 minutos e o sobrenadante foi desprezado. O pellet (DNA) ao fundo do tubo foi seco em estufa bacteriológica a 35°C e depois suspenso em 40 µL de água Mili-Q estéril. O DNA foi quantificado com auxílio de espectrofotometria (Espectrofotômetro Eon™, BioTek® Instruments, Winooksi, USA) e as concentrações

ajustadas para 100 ng/mL para uso nas reações de PCR. O DNA extraído permaneceu durante todo o experimento em freezer a -20°C .

3.5 IDENTIFICAÇÃO DE *Staphylococcus aureus* POR PCR

A confirmação da identificação da espécie *S. aureus* foi realizada por meio de PCR para detecção de um fragmento do gene *femA*. Foram utilizados primers descritos por Mehrotra; Wang e Johnson (2000), que amplificaram um fragmento 132 pb do gene *femA*. As sequências dos primers utilizados neste estudo estão descritas no anexo B.

Cada reação foi preparada com o volume final de 50 μL , contendo 44 μL de PCR Master Mix [10 x (100 mM Tris-HCl pH 8,8 e 500 mM KCl), 1,7 mM MgCl_2 , 0,2 mM dNTPs e 1,5 U de Taq DNA polimerase] (Ludwig Biotec, Alvorada, Brasil), 1 μL de cada primer (10 pmoles/ μL) e 1 μL de DNA molde (100 ng/ μl). As reações foram incubadas a 94°C por 4 min. e submetidas a 5 ciclos de 94°C por 45 seg., 56°C por 45 seg. e 72°C por 45 seg.; 20 ciclos de 72°C por 45 seg., 94°C por 45 seg., 52°C por 45 seg. e 72°C por 45 seg., e uma extensão final de 72°C por 5 minutos.

3.6 AMPLIFICAÇÃO DE GENE DE RESISTÊNCIA À PENICILINA

As amostras foram submetidas à reação de PCR para identificação do marcador molecular de resistência à penicilina, o gene *blaZ*. Um segmento de 518 pb do gene foi amplificado utilizando os primers descritos por Vesterholm-Nielsen et al. (1999) (Anexo B). Foram preparadas reações de volume final de 25 μL , contendo 18,2 μL de água Mili-Q, 2,5 μL de tampão de reação 10x da Taq DNA polimerase (Sigma-Aldrich[®], St.

Louis, MO, USA), 0,5 µL de cada dNTP (10mM), 1,25 µL de cada oligonucleotídeo iniciador, 0,3 µL de Taq DNA polimerase e 1 µL de DNA molde (100 ng/µl). As reações foram incubadas a 95°C por 5 min. e submetidas a 35 ciclos de 95°C por 30 seg., 50°C por 30 seg. 72°C por 40 seg. e uma extensão final de 72°C por 7 minutos. O controle positivo da reação foi a amostra *S. aureus* 638, da Coleção de Microorganismos da Embrapa Gado de Leite. Como controle negativo da reação foi utilizada uma amostra sem DNA bacteriano.

3.7 AMPLIFICAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA À TETRACICLINA

Foram pesquisados quatro genes de resistência à tetraciclina comumente encontrados na espécie *S. aureus*, *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)* e *tet(O)*. Os primers utilizados foram descritos por Trzcinski et al. (2000), demonstrados no anexo B. Para as reações de amplificação dos fragmentos dos genes *tet(K)*, *tet(L)* e *tet(M)* foram preparadas soluções com volume final de 25 µL, utilizando 17,7 µL de água Mili-Q, 2,5 µL de tampão de reação 10x da Taq DNA polimerase (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA), 1 µL de dNTP (10mM), 1,25 µL de cada oligonucleotídeo iniciador, 0,3 µL de Taq DNA polimerase e 1 µL de DNA molde (100 ng/µl). A reação para amplificação do fragmento do gene *tet(O)* utilizou 45 µL de Master Mix (Ludwig Biotec), 2 µL de cada primer e 1 µL de DNA da amostra (100 ng/ µL).

Para amplificação do gene *tet(K)* as reações foram incubadas a 95°C por 5 min., em seguida submetidas a 35 ciclos de 95°C por 30 seg., 50°C por 30 seg., 72°C por 90 seg., finalizando com uma extensão de 72°C por 7 minutos. As reações de amplificação do gene *tet(L)* seguiram uma incubação inicial de 95°C por 5 min., 35 ciclos de 95°C por 30

seg., 55°C por 30 seg., 72°C por 90 seg., e extensão final de 72°C por 7 minutos. Para a amplificação do gene *tet(M)* as amostras foram incubadas por 5 min. a 95°C, submetidas a 35 ciclos de 95°C por 30 seg., 50°C por 30 seg., 72°C por 2 min., seguidos por uma extensão final de 72°C por 7 min. Para amplificação do gene *tet(O)* foi procedida a incubação a 95°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de 95°C por 1 min., 55°C por 1 min., 72°C por 90 seg. e uma extensão final de 72°C por 5 min. Como controle negativo da reação foi utilizada uma amostra sem DNA bacteriano. O controle positivo para a amplificação de *tet(K)* e *tet(L)* foi a amostra *S. aureus* 903, para amplificação de *tet(M)* e *tet(O)*, *S. agalactiae* 638, ambos da Coleção de Micro-organismos da Embrapa Gado de Leite. Todas as reações foram realizadas em termociclador (GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystems, Carlsbad, EUA).

3.8 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Os fragmentos de DNA amplificados nas reações de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose para visualização de seus produtos. O gel foi preparado a 1,5%, com tampão TBE 1X (0,09 M Tris, 0,09 M ácido bórico, 0,002 M EDTA). Foram adicionados em cada poço do gel 10 µL de cada produto de amplificação e 5 µL de tampão de reação (Invitrogen, Carlsbad, EUA). Dessa forma, foram submetidos à eletroforese em cuba horizontal a 120 V em tampão TBE 1X por aproximadamente 1 hora ou até alcançar $\frac{3}{4}$ do comprimento do gel. Após, o gel foi corado em solução de brometo de etídeo a 0,005% durante 15 minutos. Os produtos da reação foram visualizados com auxílio de luz ultravioleta e a imagem registrada pelo sistema de fotodocumentação (Eagle Eye II, Stratagene, La Jolla, EUA).

3.9 SEQUENCIAMENTO PARCIAL DOS GENES *blaZ*, *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)* e *tet(O)*

Para confirmação da detecção dos genes *blaZ*, *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)* e *tet(O)* foi realizado o sequenciamento de um produto de cada gene amplificado na reação de PCR. A purificação de 100 µl de cada amplicon foi realizada com o kit Easy Gen (Easy Path, São Paulo, Brasil), seguindo as recomendações do fabricante. As amostras de DNA purificado e quantificado foram enviadas para o laboratório GenOne Biotechnologies (Rio de Janeiro, Brasil). O sequenciamento foi realizado pelo método de dideoxi, descrito por Sanger, Nicklen e Coulson (1977), em equipamento ABI Prism (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA). As sequências consenso resultantes foram comparadas com sequências bacterianas depositadas no banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e analisadas pelo programa BLAST (ALTSCHUL et al., 1990).

4 RESULTADOS

4.1 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE PELO MÉTODO DISCO-DIFUSÃO EM ÁGAR GEL

Para seleção das amostras estudadas no presente trabalho, as mesmas foram classificadas através do antibiograma pelo método de disco-difusão. Os valores dos halos de inibição para determinar amostras resistentes à ampicilina e penicilina foram ≤ 28 mm e tetraciclina ≤ 14 mm. De 266 amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina, 177 (66,5%) amostras foram resistentes à ampicilina, 188 (70,7%) à penicilina e 73 (27,5%) à tetraciclina. Dessa forma, a seleção das 90 amostras buscou agrupar aquelas que apresentavam conjuntamente resistência aos três antimicrobianos.

4.2 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE AMPICILINA, PENICILINA E TETRACICLINA

Os valores de CIM utilizados como critérios para resistência à ampicilina, penicilina e tetraciclina foram $\geq 0,5$; 0,25 e 16 $\mu\text{g/mL}$, estabelecidos pelo CLSI (2013). Os resultados da concentração inibitória mínima de ampicilina, penicilina e tetraciclina de *S. aureus* realizada pelo método de E-test[®] estão apresentados no anexo C. Na tabela 2 são apresentados os resultados da CIM dos três antimicrobianos para as 90 amostras de *S. aureus*, incluindo a porcentagem de amostras resistentes a cada antimicrobiano testado, as variações e os valores das CIM e da concentração inibitória mínima capaz de inibir 50% (CIM₅₀) e 90% (CIM₉₀) da população bacteriana estudada.

Conforme pode ser observado na tabela 2, 64 amostras (71,1%) foram resistentes à ampicilina, 70 (77,7%) foram resistentes à penicilina e 65 amostras (72,2%) foram resistentes à tetraciclina. A CIM₅₀ e CIM₉₀ para ampicilina, penicilina e tetraciclina foram de 1 e 2 µg/mL, 0,5 e 1 µg/mL e 32 e 64 µg/mL, respectivamente. Os valores da CIM para ampicilina, variaram de 0,047 a 3 µg/mL, para penicilina variaram de 0,023 a 8 µg/mL e para tetraciclina variaram de 0,19 a 256 µg/mL.

Tabela 2 – Análise da concentração inibitória mínima dos antimicrobianos estudados para 90 amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina.

Antimicrobiano	CIM₅₀ (µg/mL)	CIM₉₀ (µg/mL)	Varição (µg/mL)	Resistência n(%)
Ampicilina	1	2	0,047-3	64(71,1%)
Penicilina	0,5	1	0,023-8	70(77,7%)
Tetraciclina	32	64	0,19-256	65(72,2%)

Fonte: própria autora.

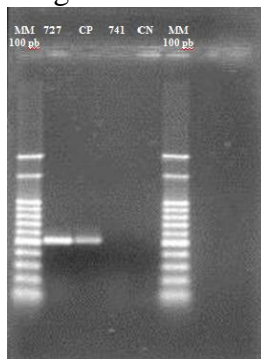
4.3 DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DE ENZIMA BETALACTAMASE PELO MÉTODO DE DISCOS DE CEFINASE™

Os resultados do teste de cefinase das amostras de *S. aureus* estão apresentados no anexo C. Das 90 amostras testadas, 78 (86,7%) produziram betalactamase. Destas 78 amostras, 7 (7,8%) produziram betalactamase somente após indução com oxacilina.

4.4 AMPLIFICAÇÃO DO GENE DE RESISTENCIA À PENICILINA

Das 90 amostras testadas, 88 (97,7%) foram positivas para o gene *blaZ*, apresentando um produto de amplificação com tamanho correspondente ao esperado na reação. Na figura 4 pode ser observado o resultado da eletroforese dos produtos de amplificação do gene *blaZ*, de 518 pb.

Figura 4- Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação do gene *blaZ*.



Fonte: arquivo pessoal. MM: Marcador de peso molecular 100 pb (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1.000, 1.500 e 2.000 pb). 727: amostra *blaZ* positiva. CP: *S. aureus* resistente à penicilina, *blaZ* positivo. 741: amostra *blaZ* negativa. CN: controle negativo da reação.

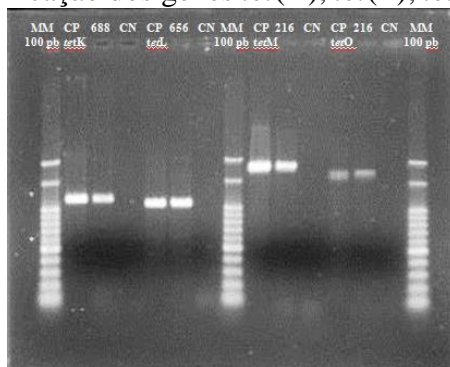
4.5 AMPLIFICAÇÃO DOS GENES DE RESISTÊNCIA À TETRACICLINA

Quatro genes que conferem resistência bacteriana à tetraciclina, *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)* e *tet(O)* foram usados para a caracterização da resistência molecular ao antimicrobiano tetraciclina. Nas 90 amostras de *S. aureus*, 81 apresentaram pelo menos um dos quatro genes *tet*, correspondente aos

fragmentos almeçados na reação de PCR. O gene mais prevalente entre as amostras testadas foi o *tet(K)*, com 76 (84,4%) amostras positivas para este gene. Os genes *tet(L)*, *tet(M)* e *tet(O)* foram encontrados em 8 (8,8%), 2 (2,2%) e 1 (1,1%) amostra, respectivamente. Quatro amostras apresentaram conjuntamente *tet(K)* e *tet(L)* (301, 436, 656, 658) e uma amostra apresentou *tet(K)*, *tet(M)* e *tet(O)* (216).

Na figura 5 está apresentado o resultado da eletroforese dos produtos de amplificação dos genes *tet(K)* (1.159 pb), *tet(L)* (1.077 pb), *tet(M)* (1.862 pb) e *tet(O)* (1.723 pb).

Figura 5- Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação dos genes *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)* e *tet(O)*.



Fonte: arquivo pessoal. MM: Marcador de peso molecular 100 pb (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1.000, 1.500 e 2.000 pb). CP: controles positivos para amplificações de *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)* e *tet(O)*. 688: amostra *tet(K)* positiva. 656: amostra *tet(L)* positiva. 216: amostra *tet(M)* e *tet(O)* positiva. CN: Controle negativo da reação.

4.6 SEQUENCIAMENTO PARCIAL DOS GENES *blaZ*, *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)* e *tet(O)* AMPLIFICADOS

Os resultados dos sequenciamentos confirmaram a identidade dos produtos de PCR realizado para detecção dos genes *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)* e *tet(O)*. Todas as sequências foram comparadas com sequências depositadas no banco de dados do NCBI e relacionadas com a maior similaridade e menor valor E (*e-value*). Todas as amostras apresentaram valor E igual a zero. A similaridade das sequências de *blaZ*, *tet(K)*, *tet(L)* e *tet(M)* foi de 100% e da sequência do gene *tet(O)* foi de 99%. A tabela 3 apresenta os resultados do sequenciamento.

Tabela 3 - Resultados do sequenciamento parcial dos genes *blaZ*, *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)* e *tet(O)*.

Amostra	Tamanho da sequência consenso (pb)	Similaridade	<i>e-value</i>	Gene identificado
727	467	100%	0.0	<i>blaZ</i>
688	935	100%	0.0	<i>tet(K)</i>
656	701	100%	0.0	<i>tet(L)</i>
216	622	100%	0.0	<i>tet(M)</i>
216	763	99%	0.0	<i>tet(O)</i>

Fonte: produção da própria autora.

4.7 COMPARAÇÃO ENTRE OS TESTES

A tabela 4 compara os testes fenotípicos e moleculares de detecção da resistência aos antimicrobianos ampicilina, penicilina e tetraciclina. E os resultados dos testes fenotípicos das amostras positivas para o gene *blaZ* estão apresentados na tabela 5.

Tabela 4- Resultados dos testes fenotípicos e moleculares de 90 amostras de *S. aureus* isoladas de leite de vacas, de fazendas leiteiras do Estado de Minas Gerais.

Nº amostras positivas		Nº de amostras resistentes		
			Disco-difusão	CIM E-test®
Produção de betalactamase	78	AMP	71	64
<i>blaZ</i>	88	PEN	82	70
<i>tet(K)</i>	76	TET	69	65
<i>tet(L)</i>	8			
<i>tet(M)</i>	2			
<i>tet(O)</i>	1			

Fonte: Produção da própria autora. AMP: Ampicilina, PEN: Penicilina, TET: Tetraciclina.

Apenas duas amostras não amplificaram o gene *blaZ* (amostras 45 e 741). Estas foram susceptíveis à ampicilina e penicilina nos testes de disco-difusão e Etest®, e não apresentaram produção de betalactamase.

Tabela 5- Resultado dos testes fenotípicos de 88 amostras positivas para o gene *blaZ*.

<i>blaZ</i>	Disco-difusão (AMP/PEN)	CIM (AMP/PEN)	Betalactamase	Nº
+	R/R	R/R	+	64
+	R/R	S/R	+	6
+	S/R	S/S	+	6
+	R/R	S/S	+	1
+	S/S	S/S	+	1
+	S/R	S/S	-	5
+	S/S	S/S	-	5
Total				88

Fonte: Produção da própria autora. Disco-difusão: Teste de disco-difusão em ágar gel. CIM: Concentração inibitória mínima pelo método de Etest®. S: Sensível. R: Resistente.

Conforme a tabela 5, das 88 amostras testadas, 70 amostras *blaZ* positivas foram resistentes à penicilina e/ou ampicilina pelos testes de disco-difusão e CIM e produziram betalactamase. Cinco amostras *blaZ* positivas foram susceptíveis à ampicilina e penicilina em ambos os testes e não produziram betalactamase; cinco amostras *blaZ* positivas foram resistentes somente à penicilina no teste de disco-difusão e não produziram betalactamase. Uma amostra *blaZ* positiva foi susceptível à ampicilina e penicilina em ambos os testes e produziu betalactamase. E sete amostras *blaZ* positivas foram resistentes à ampicilina e/ou penicilina no teste de disco-difusão e produziram betalactamase.

A tabela 6 apresenta os resultados da reação de PCR e de testes fenotípicos para caracterização da resistência à tetraciclina. De 90 amostras testadas, nove foram negativas para o gene *tet*, e seus fenótipos foram susceptíveis à tetraciclina nos testes de disco-difusão e no Etest®. Onze amostras apresentaram o gene *tet(K)* e foram susceptíveis à tetraciclina em ambos os testes (disco-difusão e E-test®) e uma

amostra apresentou os genes *tet(K)* e *tet(L)* e também foi fenotipicamente susceptível à tetraciclina por ambos os testes.

Tabela 6 - Resultados dos testes fenotípicos e moleculares para caracterização da susceptibilidade ou resistência à tetraciclina.

Gene	Disco-difusão	CIM	Nº
<i>tet(K)</i>	R	R	55
<i>tet(K)</i>	S	S	11
<i>tet(K)</i>	R	S	5
<i>tet(L)</i>	R	R	3
<i>tet(L)</i>	R	S	1
<i>tet(M)</i>	R	R	1
<i>tet(K),(L)</i>	R	R	3
<i>tet(K),(L)</i>	S	S	1
<i>tet(K),(M),(O)</i>	R	R	1
-	S	S	9
Total			90

Fonte: Produção da própria autora. Disco-difusão: Teste de disco-difusão em ágar gel. CIM: Concentração inibitória mínima pelo método de Etest®. S: Sensível. R: Resistente.

5 DISCUSSÃO

Os percentuais de resistência das 90 amostras de *S. aureus* isoladas de mastite bovina aos antimicrobianos ampicilina, penicilina e tetraciclina, estabelecidos pelo E-test, foram de 71 %, 77 % e 72 %, respectivamente. A resistência fenotípica aos antimicrobianos pode ser influenciada por vários fatores, principalmente pelo uso indiscriminado dos mesmos. Pois, o uso excessivo de agentes antimicrobianos seleciona micro-organismos com elevada concentração inibitória mínima (SCHWARZ et al., 2014)

Segundo Schwarz et al. (2010), autores (ou laboratórios veterinários) que utilizam o E-test devem seguir os critérios de interpretação recomendados pelo fabricante. Como estes critérios não são específicos para a veterinária e sim adotados da medicina humana, os valores verdadeiros para os patógenos veterinários é desconhecido. O mesmo vale para os pontos de corte aprovados pelo CLSI, que são adaptados da medicina humana, e listado no documento VET01 A4 do CLSI (2013)

O teste de produção de betalactamase possibilitou identificar a produção da enzima em 86,7 % das amostras. Esse resultado é semelhante ao encontrado por Güller et al. (2005), que relataram 90,5% de *S. aureus* produtores de betalactamase, fenotipicamente resistentes à ampicilina e penicilina pelo teste de disco-difusão. Kaase et al. (2008) relataram 14% de *S. aureus* positivos para o gene *blaZ* e produtores de betalactamase em isolados fenotipicamente sensíveis à penicilina. Robles et al. (2014) reportaram 78% de *S. aureus* oriundos de mastite bovina produtores da enzima.

As doze amostras que não produziram betalactamases apresentaram $MIC \leq 0,125 \mu\text{g/mL}$ e todas as amostras resistentes à penicilina ($MIC \geq 0,125 \mu\text{g/mL}$) foram positivas no mesmo teste. Estes resultados estão de acordo com os resultados reportados por Mork et al. (2005), em estudo conduzido com amostras de *S. aureus* de mastite bovina, ovina

e caprina. De forma semelhante, Bagcigil et al. (2012) relataram 78 amostras positivas para a enzima betalactamase, procedentes da Suécia e Finlândia, e todas amplificaram o gene *blaZ*.

Para classificar amostras de estafilococos como susceptíveis ou resistentes à penicilina, as mesmas podem ser testadas quanto à produção de betalactamase (SCHELEGLOVA et al., 2001; DEVRIESE et al., 2002). Desse modo, para atestar a sensibilidade à penicilina deve-se verificar as estirpes com resultados MIC limítrofes (0,06 - 0,25 µg/mL) (CLSI, 2013). Entretanto, mesmo amostras que apresentam valores de MIC de < 0,06 µg/mL podem apresentar o gene *blaZ*, que determina a resistência à penicilina (PITKÄLÄ et al., 2004).

No presente estudo, os resultados para MIC₅₀ e MIC₉₀ para ampicilina foram de 1 µg/mL e 2 µg/mL, respectivamente. Estes resultados foram superiores aos encontrados em outros países como Nova Zelândia (MCDOGALL et al., 2013) e Dinamarca, Inglaterra, Finlândia, Alemanha, Islândia, Irlanda, Noruega, Suécia, Suíça, Estados Unidos e Zimbábue (DE OLIVEIRA et al., 2000). Nos estudos de McDogall et al. (2013) e De Oliveira et al. (2000) os resultados de MIC₅₀ e MIC₉₀ para ampicilina foram de 0,12 µg/mL e 1,0 µg/mL e 0,25 µg/mL e 1 µg/mL, respectivamente.

A MIC₅₀ para penicilina nas amostras do presente estudo foi 0,5 µg/mL e a MIC₉₀ foi de 1 µg/mL, resultados superiores aos encontrados por Feghaly et al. (2012) que reportaram valores de 0,065 e 0,125 µg/mL, respectivamente. No estudo de Oliveira et al. (2012), realizado no Brasil, os valores obtidos foram de 0,02 µg/mL e 0,25 µg/mL em amostras de *S.aureus* isoladas de casos de mastite subclínica. , valores inferiores aos obtidos neste estudo.

Para tetraciclina, os resultados de MIC₅₀ e MIC₉₀ obtidos neste estudo foram de 32 µg/mL e 64 µg/mL, respectivamente. Estes resultados são superiores aos reportados

por Saini et al. (2012), de MIC₅₀ e MIC₉₀ igual a 1 µg/mL em *S. aureus* isolados de mastite subclínica bovina.

Das 90 amostras estudadas, 88 (97,7%) foram positivas para o gene *blaZ* e 81 (90%) positivas para o gene *tet*.

O gene *blaZ* apresentou-se amplamente disseminado entre as amostras, resultado semelhante ao reportado em estudos anteriores (BAR-GAL et al., 2015; PITKÄLÄ et al., 2004; MENDONÇA et al., 2012; LÚCIO et al., 2013; KREWER et al., 2015). No presente trabalho, cinco amostras amplificaram o gene *blaZ* mas foram fenotipicamente susceptíveis aos antimicrobianos ampicilina e penicilina em ambos os testes. Múltiplos fatores podem ser responsáveis por esta situação, como a ausência do complexo completo de genes reguladores (*blaZ-blaR1-blaI*), a localização do gene em local de não codificação do cromossomo, e a quantidade produzida de enzima não ser suficiente para inativar o princípio ativo (LI et al., 2007; RICE; BONOMO, 2011; YAO; MOELLERIN, 2011; MENDONÇA et al., 2012;).

Outro gene também responsável por gerar resistência à penicilina e a toda classe dos betalactâmicos é o *mecA* que codifica para PBPs de baixa afinidade (PBP2a) aos betalactâmicos (FRANÇOIS et al., 2004). Memmi et al. (2008) reportam também uma PBP4 como fator da resistência aos beta-lactâmicos em cepas negativas também para *mecA*. Desse modo, há uma multiplicidade de fatores associados à resistência aos β-lactâmicos além da presença dos genes *blaZ* e *mecA*.

Foram encontradas 81 amostras com genótipo resistente à tetraciclina, enquanto que o teste de disco-difusão em ágar identificou 69 amostras resistentes à tetraciclina. Este resultado demonstrou a reação de PCR foi mais efetiva na caracterização de resistência ao antimicrobiano citado.

Dentre as 90 amostras de *S. aureus* deste estudo, 76 (84,4%), 8 (8,8%), 2 (2,2%) e 1 (1,1%) apresentaram *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)* e *tet(O)*, respectivamente. A combinação

tet(K)(L) foi observada em quatro amostras, e a combinação *tet(K)(M)(O)* em uma amostra. Estes resultados são semelhantes aos encontrados em um estudo realizado na Índia, onde a presença de *tet(K)* foi maior que *tet(M)* em amostras de *S. aureus* isoladas de leite bovino: *tet(K)* estava presente em 30,5% e *tet(M)* em 3,9% dos isolados (KUMAR;YADAV; SINGH, 2010).

Entretanto, Wang et al. (2015) reportaram a presença do gene *tet(M)* em 70,2% dos isolados de *S. aureus* e em 59,6% o gene *tet(K)*. Do mesmo modo, em um trabalho realizado na Turquia foi observado maior número de isolados *tet(M)* do que com o gene *tet(K)* (TÜRKYILMAZ et al., 2010). Jamali et al. (2014), no Iran, detectaram os genes *tet(M)*, *tet(K)* e *tet(L)* em 81,8 %, 51,5% e 12,1% dos isolados de *S. aureus* de leite bovino, respectivamente. Trzcinski et al. (2000) encontraram 36% de amostras positivas para *tet(M)*, 31,8 % de amostras positivas para os genes *tet(K)* e *tet(K)(M)* e nenhuma amostra positiva para os genes *tet(L)* e *tet(O)*.

Uma amostra (726) do presente estudo *tet(M)* positiva apresentou alto nível de resistência observado no MIC (256 µg/mL). Este resultado esta de acordo com o que foi reportado por Trzcinski et al. (2000), que amostras positivas para *tet(M)* apresentaram maior nível de resistência no CIM. Níveis de resistência à tetraciclina em isolados *tet(K)(M)* também foram significativamente maiores do que naqueles com somente um gene *tet* (Trzcinski et al., 2000).

A presença de isolados contendo a combinação *tet(K)(M)* pode ser explicada pela localização dos genes em cromossomo ou plasmídeo. Do mesmo modo, NG et al. (2001) reportaram em 28 amostras de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA), doze como *tet(M)(K)*, duas apresentaram somente o gene *tet(K)* e doze somente o gene *tet(M)*, dois MRSA foram susceptíveis à tetraciclina. O fato de poderem ser encontrados conjuntamente nas amostras ou separadamente pode ser explicado pela localização dos genes. Enquanto *tet(M)* pode ser

localizado no cromossomo e em plasmídeos, o *tet(K)* tem sido detectado em plasmídeos (WARSA et al., 1996)

A presença do gene *tet(O)* foi observada em apenas uma amostra. De acordo com a literatura, este gene é raro de ser encontrado em *S.aureus* (VRIES et al., 2009). E em muitos estudos *tet(O)* não foi reportado em amostras de *S.aureus* (MOJUMBAR; KHAN,1988, NESIN et al., 1990; SCHMITH et al., 2001; ALMER, et al. 2002).

6 CONCLUSÃO

- Os resultados dos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos ampicilina, penicilina e tetraciclina realizados nas amostras de *S. aureus* isoladas de vacas leiteiras da Zona da Mata de Minas Gerais apontam para um alto índice de resistência dos isolados aos três antimicrobianos, principalmente à ampicilina e penicilina.
- Foram encontrados altos valores de CIM₅₀ e CIM₉₀ para os três antimicrobianos. A enzima betalactamase foi detectada em um grande número de amostras.
- Os genes *blaZ* e *tet(K)* encontram-se amplamente disseminados nos rebanhos estudados; os genes *tet(L)*, *tet(M)* e *tet(O)* também foram identificados, porém em um número menor de amostras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMER, L. S.; SHORTRIDGEA, V. D.; NILIUSA, A. M.; BEYERA, J. M.; SONIA, N. B.; BUIA, M.H.; STONEB, G. G.; FLAMM, R. K. Antimicrobial susceptibility and molecular characterization of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 43, p.225–232, 2002.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n.3, p. 403 - 410, 1990.

BAGCIGIL, A. F.; TAPONEN, S.; KOORT, J.; BENGTTSSON, B.; MYLLYNIEMI, A.; PYÖRÄLÄ, S. Genetic basis of penicillin resistance of *S. aureus* isolated in bovine mastitis. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 54 n.69, p. 1-7, 2012.

BAR-GAL, G. K.; BLUM, S.E.; HADAS, L.; EHRLICH, R.; MONECKE, S.; LEITNER, G. Host-specificity of *Staphylococcus aureus* causing intramammary infections in dairy animals assessed by genotyping and virulence genes. **Veterinary Microbiology**, v.176, n. 1, p. 143–154, mar, 2015.

BRADLEY, J.; LEACH, K. A. ; BREEN, J. E.; GREEN L. E.; GREEN, M. J. Survey of the incidence and aetiology of mastitis on dairy farms in England and Wales. **Veterinary Record**, v. 160, n. 24 Feb.,2007.

BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F. **Diagnóstico microbiológico da mastite**. Juiz de Fora, MG: Embrapa Gado de Leite, 1999. 16p. (Embrapa Gado de Leite. Circular Técnica, 55).

CHAMBERS, H.F. Methicillin-resistant staphylococci. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 1, p.173-186, 1988.

CHOPRA, I.; HAWKEY, P. M.; HINTONC, M. Tetracyclines, molecular and clinical aspects. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 29, p.245-277, 1992.

CHOPRA, I.; ROBERTS, M. Tetracycline Antibiotics: Mode of action, applications, molecular Biology, and epidemiology of bacteria. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 65, n. 2, p. 232–260, 2001.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals; Approved Standard, 3 ed. CLSI document M31-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.

CLSI. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard, 4 ed. CLSI document VET01-A4. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2013.

DE OLIVEIRA, A. P.; WATTS J. L.; SALMON, S. A.; AARESTRUP, F. M. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Europe and the United States. **Journal Dairy of Science**, Champaign, v. 83, n. 4, p.855–862, 2000.

DEMEU, F. A. Simulação do impacto econômico da mastite em rebanhos bovinos leiteiros—177 p. il. Dissertação(Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

DEVRIESE, L.A.; BAELE, M.; VANEECHOUTTE, M.; MARTEL, A.; HAESEBROUCK, F. Identification and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus chromogenes* isolates from intramammary infections of dairy cows. **Veterinary Microbiology**, v.87, n.2 p.175–182, jun, 2002.

FALKOW, S. **Infectious multiple drug resistance**. Pion Ltd: London, 1975, 300 p.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Food and Agricultural commodities production. Disponível em: . Acessado em: 09 abril 2015.

FEGHALY, R. E. E.; STAMM, J. E.; FRITZ, S. A.; BURNHAM, C. D. Presence of the blaZ beta-lactamase gene in isolates of *Staphylococcus aureus* that appear penicillin susceptible by conventional phenotypic methods. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 74, n.4, p. 388–393, 2012.

FRANCOIS, P.; RENZI, G.; PITTET, D.; LEW, D.; HARBARTH, S.; VAUDAUX, P.; SCHRENZEL, J. A novel multiplex real-time PCR assay for rapid typing of major staphylococcal cassette chromosome *mec* elements. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 7, p. 3309 - 3312, 2004.

GILLESPIE, M. T.; MAY, J. W.; SKURRAY, R. A. Detection of an integrated tetracycline: Resistance plasmid in the chromosome of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of General Microbiology**, v.132, p. 1723-1728, 1986.

GOODMAN G. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10 Ed. Rio de Janeiro: Editora McGrallHill. 2005. p. 757.

GÜLER, L.; OK, Ü.; GÜNDÜ Z, K.; GÜLCÜ, Y.; HADIMLI, H. H. Antimicrobial Susceptibility and Coagulase Gene Typing of *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Clinical Mastitis Cases in Turkey. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 9, 2005.

HESSELBARTH, J.; SCHWARZ, S. Comparative ribotyping of *Staphylococcus intermedius* from dogs, pigeons, horses and mink. **Veterinary Microbiology**, v. 45, p.11-17, 1995.

JAMALI, H.; RADMEHR, B.; ISMAIL S. Short communication: Prevalence and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n.4 p.2226–2230, 2014.

JORGENSEN, J. H.; FERRARO, M. J. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. **Medical Microbiology**, v. 49, p. 1749-1755, dez, 2009.

KAASE, M.; LENGHA, S.; FRIEDRICH, S.; SZABADOS, F.; KLEINE, T. B.; GATERMANN, S. G. Comparison of phenotypic methods for penicillinase detection in *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, p. 614–616, Weinheim, jun. 2008.

KORB, A.; BRAMBILLA, D. K.; TEIXEIRA, D. C.; RODRIGUES, R. M. Riscos para a saúde humana do uso de antibióticos na cadeia produtiva leiteira. **Revista de Saúde Pública de Santa Catarina**, Florianópolis, v. 4, n. 1, dez. 2011.

KREWER, C. C.; AMANSO, E. S.; GOUVEIA, G. V.; SOUZA, R. L.; COSTA, M. M.; MOTA, R. A. Resistance to antimicrobials and biofilm formation in *Staphylococcus* spp.

isolated from bovine mastitis in the Northeast of Brazil.

Tropical Animal Health Production. v.47,n.3, p.511-5188, mar, 2015

KUMAR, R.; YADAV, B.R; SINGH, R.S. Genetic Determinants of Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus* Isolates from Milk of Mastitic Crossbred Cattle. **Current Microbiology**, v. 60, n. 5, p. 379-386, mai, 2010.

LEVY, S. B., MCMURRY, L. M., BURDETT, V., COURVALIN, P., HILLEN, W., ROBERTS, M. C., TAYLOR, D. E. Nomenclature for tetracycline resistance determinants. **Antimicrobial Agents Chemotherapy.** v. 33, p. 1373– 1374, 1989.

LEVY, S.B. Active efflux mechanisms for antimicrobial resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p. 36, p.695–703, 1992.

LI, X. ; MEHROTRA, M.; GHIMIRE, S.; ADEWOYE, L. Beta-Lactam resistance and beta-lactamases in bacteria of animal origin. **Veterinary Microbiology.** v. 121, p.197–214, 2007.

LIVERMORE, D. M. Antibiotic resistance in staphylococci. **International Journal of Antimicrobial Agents.** v. 16 S3–S10, 2000.

LOWY, F. D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **The Journal of Clinical Investigation.** v.111,n. 9, mai, 2003.

LÚCIO, E. C.; OLIVEIRA, J. M. B.; GOUVEIA, G. V.; COSTA, M. M.; BRANDESPIM, D.F.; MOTA, R. A.; PINHEIRO JÚNIOR, J. W. Pesquisa dos genes *meca* e *blaz*

em cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas de mastite bovina na microrregião de Garanhuns. In: XIII Jornada de ensino, pesquisa e extensão – JEPEX 2013 – UFRPE, Recife/PE, 2013.

LUNDBERG, A.; ASPÁN, A.; NYMAN, A.; UNNERSTAD, H.E.; WALLER, K. P. Associations between bacterial genotype and outcome of bovine clinical *Staphylococcus aureus* mastitis. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.54, n.2, p. 2-8, 2014.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**. 12º Ed., Porto Alegre:Artmed, 2010. 1160p.

MCDOUGALL, S.; HUSSEINA, H.; PETROVSKIB, K. Antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* and *Streptococcus dysgalactiae* from dairy cows with mastitis. **New Zealand Veterinary Journal**, v.61, n. 6, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/00480169.2013.843135>> . Acesso em: 09 abr. 2015.

MEMMI, G.; FILIPE, S. R.; PINHO, M. G.; FU, Z.; CHEUNG, A. *Staphylococcus aureus* PBP4 is essential for b-Lactam resistance in community-acquired methicillin-resistant strains. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 52, v.11, p.3955-3966, 2008.

MENDONÇA, E. C.L.; MARQUES, V.F.; MELO, D. A.; ALENCAR, T. A.; COELHO, I. S.; COELHO, S. M.O.; SOUZA, M. M.S. Caracterização fenogenotípica da resistência antimicrobiana em *Staphylococcus* spp. isolados de mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n.9, p.859-864, set, 2012.

MEHROTRA, M.; WANG, G.; JOHNSON, W. M. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 1032–1035, mar, 2000.

MOELLERING, J. R. C. Introduction: Problems with antimicrobial resistance in Gram-positive Cocci. **Clinical Infectious Diseases**. n. 26, n. 5, p. 1177-1178, mai, 1998.

MOJUMBAR, M.; KHAN, S.A. Characterization of the tetracycline resistance gene of plasmid pT181 of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 170, p.5522-5228, 1988.

MORSE, S. A.; JOHNSON, S.R.; BIDDLE, J. W.; ROBERTS, M. C. High-level tetracycline resistance in *Neisseria gonorrhoeae* is result of acquisition of Streptococcal tetM determinant. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 30, n.5, p. 664-670 nov, 1986,

MØRK, T.; TOLLERSRUD, T.; KVITILE, B.; JØRGENSEN, H. J.; WAAGE, S. Comparison of *Staphylococcus aureus* genotypes recovered from cases of bovine, ovine, and caprine mastitis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 8, p. 3979–3984, ago., 2005.

MÜLLER, E.E. Qualidade do leite, células somáticas e prevenção da mastite. In: II Sul- Leite: Simpósio sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil, 2., 2002, Toledo. Anais... Maringá : UEM/CCA/DZO – NUPEL, 2002. p. 206-217.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL. **Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection and**

determination of milk quality. 4. ed. Verona: NMC, 2004. 47 p.

NESIN, M., SVEC,P.; LUPSKI, J.R; GODSON, N.G; KREISWIRTH, B.; KORNBLUM, J.; PROJAN, S. J. Cloning and nucleotide sequence of a chromosomally encoded tetracycline resistance determinant, tetA(M) from a pathogenic, methicillin-resistant strain of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 34, 2273-6. 1990

NG, L.-K.; MARTIN, I.; ALFA, M.; MULVEY, M. Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. **Molecular and Cellular Probes**, v.15, n.4, p. 209–215, 2001.

OLIVEIRA, L.; LANGONI, H.; HULLAND, C.; RUEGG, P. L. Minimum inhibitory concentrations of *Staphylococcus aureus* recovered from clinical and subclinical cases of bovine mastitis. **Journal Dairy Science**. v. 95, n.4, p.1913–1920, 2012.

OVIEDO-BOYSO, J.; VALDEZ-ALARCON, J. J.; CAJERO-JUAREZ, M.; OCHOA-ZARZOSA, A.; LOPEZ-MEZA, J. E.; BRAVO-PATIÑO, A.; BAIZABAL-AGUIRRE, V. M. Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. **Journal of Infection**, v. 54, p. 399-409, 2007.

PITKÄLÄ, A.; HAVERI, M.; PYÖRÄLÄ, S.; MYLLYS, V.; HONKANEN-BUZALSKI, T. Bovine Mastitis in Finland 2001- Prevalence, Distribution of Bacteria, and Antimicrobial Resistance. **Journal of Dairy Science**. v. 87, n.8, p.2433–2441, abr, 2004.

QUINN,P.J.; MARKEY,B.K.; CARTER,M.E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, F.C. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**.5º Ed., Porto Alegre:Artmed Editora. 2005. 512p.

RIBEIRO, W. O.; OLIVEIRA, R. L.; MARTIN, M. L. MARTINS, J.M.; ARCANJO, A. H.M.; ALMEIDA NETO, O. B. Enumeração de microrganismos causadores da mastite bovina e estudo da ação de antimicrobianos. **Revista Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 69, n. 1, p 45-52, jan/fev., 2014.

RICE, L.B; BONOMO, R. A. Mechanisms of resistance to antibacterial agents, In: VERSALOVIC, J.; CARROL, K.C; FUNKE, G.; JORGENSEN, J.H.; LANDRY, L.; WARNOCK, D.W. **Manual of Clinical Microbiology**. 10º Ed.,Washington: ASM Press.p. 1082-1114, 2011.

ROBLES, B. F.; NÓBREGA, D. B.; GUIMARÃES, F. F.; WANDERLEY, G. G.; LANGONI, H. Beta-lactamase detection in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* isolated from bovine mastitis. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 34, n.4, p.325 - 328, abr, 2014.

ROBERTS, M.C. Epidemiology of tetracycline-resistance determinants. **Evolution and Ecology**, v.2, n. 10, out, 1994.

ROBERTS, M.C. Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews**, v. 19, p. 1 - 24, 1996.

ROBERTS, M. C. Update on acquired tetracycline resistance genes. **FEMS Microbiology Letters**, v.245, p.195–203, mar, 2005.

SAINI, V.; MCCLURE, J. D.; LÉGER, D.; KEEFE, G. P.; SCHOLL, D. T.; MORCK, D. W.; BARKEMA, H. W. Antimicrobial resistance profiles of common mastitis pathogens on Canadian dairy farms. **Journal Dairy of Science**, Champaign, v. 95, n.8, p. 4319–4332, 2012.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of National Academy of Science USA**, v. 74, p. 5463 - 5467, 1977.

SCHLEGELOVAÂ, J. ; RYSÏAÂNEK, D.; SÏEDIVAÂ, I.; BABAÂK, V. Comparison of Methods for the Determination of Antimicrobial Resistance in *Staphylococcus aureus* from Bovine Mastitis. **Journal of Veterinay Medicine**, v. 48, p.21-29, 2001.

SCHWARZ, S.; CARDOSO, M.; WEGENER, H. C. Nucleotide Sequence and Phylogeny of the tet(L) Tetracycline Resistance Determinant Encoded by Plasmid pSTE1 from *Staphylococcus hyicus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 36, n. 3, p. 580-588, mar, 1992.

SCHWARZ, S.; ROBERTS, M. C.; WERCKENTHINA, C.; PANG, Y.; LANGE, C. Tetracycline resistance in *Staphylococcus* spp. from domestic animals. **Veterinary Microbiology**. v. 63, p. 217-227, 1998.

SCHWARZ, S.; KEHRENBERG, C.; WALSH. T.R. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal

production. **International Journal of Antimicrobial Agents** v.17, p. 431-437 ago, 2010.

SCHWARZ, S.; BUTAYE, P.; DUIJKEREN, E.; PRESCOTT, J.F. Antimicrobial resistance in bacteria from animals and the environment. **Veterinary Microbiology**, v. 171, p. 269–272, 2014.

SCHMITZ, F.J.; KREY, A.; SADURSKI, R.; VERHOEF, J.; MILATOVIC, D.; FLUIT, A.C. Resistance to tetracycline and distribution of tetracycline resistance genes in European *Staphylococcus aureus* isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 47, p. 239-246, 2001.

STASINOPOULOS, S. J.; FARR, G. A.; BECHHOFFER D. H. Bacillus subtilis *tetA(L)* gene expression: evidence for regulation by translational reinitiation. **Molecular Microbiology** n.30, v.5, p.923–932, dez, 1998.

STRATTON, C.W. The clinical implications of Beta-lactamases. **Antimicrobics and Infectious Diseases Newsletter**. Nashville, v. 15, n. 10, p.67-74, out, 1996.

SWENSON, J.M.; PATEL, J.B.; JORGENSEN, J.H. Special phenotypic methods for detecting antibacterial resistance. In: VERSALOVIC, J.; CARROL, K.C; FUNKE, G.; JORGENSEN, J.H.; LANDRY, L.; WARNOCK, D.W. **Manual of Clinical Microbiology**. 10^o Ed., Washington: ASM p.1155-1179, 2011.

TRONCO, V. M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. Santa Maria: Ed. da UFSM, 2003. 192p.

TRZCINSKI, K.; COOPER, B.S; HRYNIEWICZ, W.; DOWSON, CG. Expression of resistance to tetracyclines in

strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 45, p.763-770, 2000.

TÜRKYILMAZ, S.; TEKBIYIK, S.; ORYASIN, E.; BOZDOGAN, B. Molecular epidemiology and antimicrobial resistance mechanisms of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk. **Zoonoses Public Health**, v. 57, p. 197–203, 2010.

VERMELHO, A.B.; BASTOS, M. C. F.; BRANQUINHA, M. H. **Bacteriologia Geral**. 1º Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 582p.

VESTERHOLM-NIELSEN, M.; LARSEN, M.O; OLSEN, J.E.; AARESTRUP, F.M. Occurrence of the blaZ in penicillin resistance *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Denmark. **Acta Veterinaria Scandinavia**, v.40, p.279-286, 1999.

VOLKERS, G.; PALM, G. J.; WEISS, M. S. ; WRIGHT, G. D.; HINRICHS, W. Structural basis for a new tetracycline resistance mechanism relying on the TetX monooxygenase. **Federation of European Biochemical Societies Letters**. v. 585, n. 7, p.1061–1066, mar, 2011.

VRIES, L. E.; CHRISTENSEN, H.; SKOV, R. L.; AARESTRUP, F. M; AGERSØ, Y. Diversity of the tetracycline resistance gene tet(M) and identification of Tn916- and Tn5801-like (Tn6014) transposons in *Staphylococcus aureus* from humans and animals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.64, n.3, p.490-500, 2009.

YAMAGUCHI, A.; ONO, N.; AKASAKA, T.; NOUMI, T. Metal-tetracycline/H⁺ antiporter of *Escherichia coli* encoded by a transposon, Tn10. The role of the conserved dipeptide,

Ser65-Asp66, in tetracycline transport. **Journal Biological Chemistry**, v.265, n.26, p.15525-15530. 1990.

YAO, J. D. C.; MOELLERING, J. R. Antibacterial Agents. In: VERSALOVIC, J.; CARROL, K.C; FUNKE, G.; JORGENSEN, J.H.; LANDRY, L.; WARNOCK, D.W. **Manual of Clinical Microbiology**. 10^o Ed., Washington: ASM Press. p. 1043–1081, 2011.

ZAFALON, L.F.; LANGONI, H.; BENVENUTTO, F.; CASTELANI, L.; BROCCOLO, C.R. Aspectos epidemiológicos da mastite bovina causada por *Staphylococcus aureus*. **Veterinária e Zootecnia**, v.15, n.1, abr.,p.56-65, 2008.

WAGNER, S. A.; GEHLEN, I.; WIEST, J. M. Padrão tecnológico em unidades de produção familiar de leite no Rio Grande do Sul relacionado com diferentes tipologias. **Ciência Rural**, v.34, n.5, out, 2004.

WANG, D.; WANG, Z.; YAN, Z.; WU, J.; ALI, T.; LI, J.; LV, Y.; HAN, B. Bovine mastitis *Staphylococcus aureus*: Antibiotic susceptibility profile, resistance genes and molecular typing of methicillin-resistant and methicillin-sensitive strains in China. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 31, n.1, p. 9-16, abr, 2015.

WARSA, U.C.; NONOYAMA, M.; IDA, T.; OKAMOTO, R.; OKUBO, T.; SHIMAUCHI, C.; KUGA, A.; INOUE, M. Detection of tet(K) and tet(M) in *Staphylococcus aureus* of Countries by the Polymerase Chain Reaction. **The Journal of Antibiotics**, v.49, n.11, p.1127-1132,nov, 1996.

WENDLANDT, S.; SCHWARZ, S.; SILLEY, P. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: A Food-Borne Pathogen? **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 4, p.117–139, 2013.

**ANEXO A - RESULTADO DO TESTE DE DISCO DIFUSÃO EM
ÁGAR GEL DE 90 AMOSTRAS DE *Staphylococcus aureus***

(Continua)

Amostra	AMP		CEF		CFT		CLI	
15	16	R	30	S	30	S	28	S
34	17	R	32	S	30	S	26	S
35	21	R	32	S	30	S	29	S
45	39	S	40	S	32	S	0	R
89	11	R	32	S	36	S	28	S
90	16	R	29	S	34	S	27	S
95	17	R	30	S	30	S	26	S
96	18	R	31	S	31	S	26	S
102	27	R	42	S	38	S	30	S
135	22	R	38	S	36	S	32	S
136	17	R	34	S	32	S	27	S
146	42	S	40	S	32	S	29	S
151	20	R	36	S	34	S	31	S
163	22	R	35	S	35	S	30	S
212	21	R	35	S	32	S	0	R
216	37	S	39	S	31	S	0	R
217	20	R	34	S	30	S	0	R
218	23	R	36	S	33	S	27	S
221	15	R	29	S	29	S	25	S
226	40	S	38	S	31	S	26	S
228	31	S	31	S	29	S	26	S
229	30	S	39	S	30	S	26	S
230	32	S	37	S	30	S	25	S
237	32	S	36	S	31	S	25	S
274	25	R	43	S	32	S	0	R
297	23	R	38	S	36	S	26	S
298	22	R	34	S	36	S	29	S
299	22	R	38	S	30	S	30	S
301	23	R	30	S	36	S	30	S
303	41	S	40	S	31	S	30	S
309	19	R	32	S	34	S	28	S
310	20	R	32	S	34	S	26	S
311	16	R	31	S	32	S	25	S
315	20	R	33	S	30	S	28	S

**ANEXO A - RESULTADO DO TESTE DE DISCO DIFUSÃO EM
 ÁGAR GEL DE 90 AMOSTRAS DE *Staphylococcus aureus***

(Continua)

Amostra	AMP		CEF		CFT		CLI	
318	20	R	32	S	33	S	26	S
319	19	R	32	S	34	S	27	S
321	18	R	30	S	30	S	27	S
355	18	R	32	S	29	S	27	S
358	36	S	42	S	28	S	24	S
396	19	R	32	S	34	S	26	S
399	18	R	30	S	30	S	24	S
403	31	S	44	S	37	S	26	S
407	21	R	32	S	29	S	23	S
417	30	S	44	S	35	S	25	S
418	31	S	44	S	36	S	26	S
425	21	R	34	S	33	S	25	S
428	22	R	36	S	36	S	26	S
436	22	R	34	S	32	S	26	S
440	20	R	32	S	28	S	25	S
444	32	S	44	S	36	S	26	S
446	20	R	34	S	28	S	22	S
451	20	R	35	S	32	S	25	S
452	31	S	48	S	42	S	30	S
453	30	S	44	S	35	S	26	S
478	17	R	32	S	31	S	24	S
508	18	R	30	S	30	S	25	S
534	24	R	40	S	30	S	14	R
557	17	R	28	S	27	S	27	S
567	31	S	36	S	28	S	28	S
571	37	S	39	S	29	S	25	S
575	17	R	30	S	30	S	23	S
579	20	R	33	S	30	S	22	S
617	21	R	33	S	30	S	0	R
618	19	R	33	S	30	S	0	R
619	19	R	34	S	32	S	0	R
644	19	R	30	S	31	S	27	S
653	24	R	40	S	34	S	25	S
656	18	R	29	S	30	S	0	R

**ANEXO A - RESULTADO DO TESTE DE DISCO DIFUSÃO EM
ÁGAR GEL DE 90 AMOSTRAS DE *Staphylococcus aureus***

(Continua)

Amostra	AMP		CEF		CFT		CLI	
658	17	R	29	S	31	S	26	S
663	21	R	37	S	31	S	26	S
667	22	R	37	S	32	S	26	S
668	31	R	37	S	30	S	25	S
674	18	R	32	S	32	S	26	S
676	19	R	30	S	31	S	25	S
678	18	R	31	S	31	S	25	S
680	20	R	32	S	27	S	25	S
685	21	R	26	S	24	S	24	S
686	19	R	32	S	26	S	24	S
688	22	R	33	S	32	S	27	S
690	21	R	40	S	36	S	0	R
694	21	R	33	S	27	S	25	S
696	18	R	32	S	30	S	0	R
713	20	R	36	S	34	S	26	S
715	20	R	36	S	34	S	24	S
718	19	R	34	S	31	S	25	S
720	20	R	38	S	31	S	25	S
726	20	R	33	S	29	S	24	S
727	19	R	31	S	32	S	0	R
741	36	S	39	S	31	S	25	S
796	16	R	30	S	31	S	0	R

**ANEXO A - RESULTADO DO TESTE DE DISCO DIFUSÃO EM
 ÁGAR GEL DE 90 AMOSTRAS DE *Staphylococcus aureus***

(Continua)

Amostra	ERI		ENR		GEN		OXA	
15	25	S	28	S	23	S	20	S
34	24	S	30	S	22	S	22	S
35	24	S	32	S	24	S	19	S
45	0	R	30	S	22	S	22	S
89	24	S	33	S	0	R	21	S
90	24	S	30	S	21	S	20	S
95	24	S	30	S	21	S	24	S
96	24	S	26	S	20	S	24	S
102	24	S	32	S	24	S	29	S
135	26	S	33	S	23	S	28	S
136	22	I	31	S	22	S	22	S
146	25	S	33	S	24	S	25	S
151	25	S	32	S	23	S	26	S
163	27	S	31	S	22	S	25	S
212	0	R	34	S	21	S	26	S
216	0	R	30	S	20	S	25	S
217	0	R	28	S	21	S	24	S
218	25	S	28	S	23	S	22	S
221	23	S	28	S	22	S	19	S
226	23	S	29	S	22	S	23	S
228	0	R	0	R	20	S	19	S
229	22	I	28	S	22	S	21	S
230	22	I	26	S	21	S	23	S
237	22	I	29	S	20	S	24	S
274	0	R	32	S	29	S	27	S
297	25	S	30	S	24	S	26	S
298	25	S	32	S	23	S	22	S
299	25	S	30	S	24	S	28	S
301	28	S	32	S	24	S	24	S
303	25	S	34	S	25	S	28	S
309	26	S	28	S	23	S	22	S
310	25	S	30	S	22	S	22	S
311	23	S	25	S	21	S	23	S
315	25	S	31	S	23	S	21	S

**ANEXO A - RESULTADO DO TESTE DE DISCO DIFUSÃO EM
ÁGAR GEL DE 90 AMOSTRAS DE *Staphylococcus aureus***

(Continua)

Amostra	ERI		ENR		GEN		OXA	
318	24	S	28	S	22	S	23	S
319	23	S	26	S	21	S	25	S
321	24	S	27	S	20	S	23	S
355	26	S	28	S	22	S	17	S
358	25	S	27	S	22	S	21	S
396	25	S	25	S	21	S	23	S
399	24	S	25	S	20	S	22	S
403	26	S	31	S	18	S	30	S
407	24	S	28	S	16	S	22	S
417	24	S	31	S	17	S	30	S
418	25	S	31	S	18	S	31	S
425	25	S	30	S	16	S	22	S
428	24	S	30	S	16	S	25	S
436	27	S	31	S	16	S	22	S
440	25	S	29	S	16	S	19	S
444	26	S	35	S	14	S	31	S
446	23	S	28	S	16	S	22	S
451	24	S	28	S	18	S	20	S
452	28	S	35	S	20	S	31	S
453	27	S	35	S	15	S	32	S
478	25	S	29	S	18	S	17	S
508	24	S	25	S	16	S	18	S
534	26	S	26	S	21	S	22	S
557	26	S	28	S	22	S	16	S
567	26	S	29	S	24	S	21	S
571	25	S	30	S	19	S	22	S
575	25	S	32	S	17	S	18	S
579	24	S	31	S	17	S	20	S
617	0	R	25	S	23	S	21	S
618	0	R	25	S	22	S	22	S
619	0	R	27	S	18	S	22	S
644	26	S	25	S	21	S	22	S
653	26	S	26	S	22	S	25	S
656	0	R	24	S	20	S	20	S

**ANEXO A - RESULTADO DO TESTE DE DISCO DIFUSÃO EM
ÁGAR GEL DE 90 AMOSTRAS DE *Staphylococcus aureus***

(Continua)

Amostra	ERI		ENR		GEN		OXA	
658	26	S	27	S	22	S	22	S
663	27	S	26	S	22	S	27	S
667	27	S	26	S	22	S	24	S
668	26	S	26	S	21	S	26	S
674	26	S	26	S	21	S	25	S
676	27	S	25	S	21	S	21	S
678	25	S	26	S	21	S	25	S
680	26	S	23	S	21	S	20	S
685	26	S	30	S	22	S	16	S
686	25	S	23	S	21	S	19	S
688	28	S	29	S	24	S	21	S
690	0	R	28	S	25	S	26	S
694	26	S	26	S	22	S	21	S
696	0	R	31	S	23	S	19	S
713	27	S	28	S	22	S	26	S
715	27	S	28	S	21	S	27	S
718	24	S	25	S	21	S	21	S
720	26	S	27	S	21	S	28	S
726	24	S	25	S	19	S	26	S
727	0	R	26	S	24	S	20	S
741	26	S	29	S	22	S	26	S
796	0	R	12	R	22	S	17	S

**ANEXO A - RESULTADO DO TESTE DE DISCO DIFUSÃO EM
ÁGAR GEL DE 90 AMOSTRAS DE *Staphylococcus aureus***

(Continua)

Amostra	PEN		SUL		SXT		TET	
15	13	R	30	S	35	S	31	S
34	13	R	26	S	30	S	28	S
35	12	R	29	S	33	S	30	S
45	31	S	27	S	32	S	0	R
89	12	R	27	S	33	S	0	R
90	11	R	25	S	34	S	0	R
95	13	R	25	S	35	S	0	R
96	12	R	22	S	34	S	0	R
102	19	R	30	S	32	S	28	S
135	16	R	30	S	34	S	12	R
136	12	R	20	S	30	S	11	R
146	33	S	20	S	33	S	14	R
151	13	R	18	S	30	S	12	R
163	25	R	20	S	31	S	11	R
212	14	R	26	S	32	S	0	R
216	32	S	20	S	30	S	0	R
217	14	R	26	S	31	S	0	R
218	16	R	24	S	33	S	0	R
221	0	R	25	S	30	S	0	R
226	32	S	21	S	30	S	11	R
228	20	R	21	S	29	S	31	S
229	28	R	23	S	30	S	30	S
230	29	S	17	R	29	S	0	R
237	39	S	21	S	28	S	0	R
274	24	R	35	S	39	S	9	R
297	22	R	30	S	34	S	10	R
298	22	R	30	S	33	S	11	R
299	22	R	28	S	34	S	11	R
301	23	R	28	S	28	S	11	R
303	43	S	27	S	30	S	14	R
309	19	R	28	S	34	S	11	R
310	20	R	28	S	32	S	9	R
311	17	R	25	S	32	S	9	R
315	19	R	23	S	32	S	11	R

**ANEXO A - RESULTADO DO TESTE DE DISCO DIFUSÃO EM
 ÁGAR GEL DE 90 AMOSTRAS DE *Staphylococcus aureus***

(Continua)

Amostra	PEN		SUL		SXT		TET	
318	19	R	25	S	32	S	10	R
319	13	R	26	S	32	S	9	R
321	12	R	25	S	32	S	10	R
355	11	R	28	S	31	S	26	S
358	28	R	30	S	30	S	25	S
396	18	R	24	S	30	S	0	R
399	16	R	23	S	29	S	0	R
403	24	R	0	R	27	S	38	S
407	14	R	16	I	26	S	32	S
417	24	R	12	R	25	S	34	S
418	25	R	12	R	27	S	35	S
425	14	R	0	R	24	S	0	R
428	14	R	0	R	25	S	0	R
436	14	R	0	R	26	S	35	S
440	13	R	16	I	27	S	0	R
444	23	R	0	R	27	S	37	S
446	14	R	15	I	22	S	0	R
451	14	R	14	I	27	S	0	R
452	23	R	0	R	30	S	39	S
453	23	R	16	I	26	S	38	S
478	12	R	0	R	29	S	34	S
508	12	R	16	I	27	S	11	R
534	22	R	26	S	30	S	9	R
557	11	R	23	S	30	S	0	R
567	26	R	27	S	33	S	25	S
571	28	R	18	S	31	S	35	S
575	10	R	17	S	29	S	35	S
579	14	R	13	I	27	S	34	S
617	13	R	26	S	32	S	0	R
618	12	R	26	S	31	S	0	R
619	12	R	15	I	27	S	0	R
644	18	R	30	S	31	S	0	R
653	24	R	28	S	31	S	0	R
656	17	R	26	S	30	S	0	R

**ANEXO A - RESULTADO DO TESTE DE DISCO DIFUSÃO EM
ÁGAR GEL DE 90 AMOSTRAS DE *Staphylococcus aureus***

(Conclusão)

Amostra	PEN		SUL		SXT		TET	
658	16	R	28	S	33	S	0	R
663	22	R	28	S	30	S	0	R
667	20	R	28	S	33	S	0	R
668	20	R	27	S	30	S	0	R
674	17	R	26	S	31	S	0	R
676	17	R	28	S	32	S	0	R
678	18	R	27	S	31	S	0	R
680	18	R	26	S	32	S	0	R
685	19	R	26	S	32	S	0	R
686	19	R	26	S	30	S	0	R
688	21	R	30	S	32	S	0	R
690	20	R	31	S	34	S	0	R
694	13	R	26	S	33	S	0	R
696	11	R	26	S	31	S	0	R
713	19	R	25	S	28	S	0	R
715	20	R	27	S	29	S	0	R
718	17	R	25	S	28	S	0	R
720	19	R	25	S	28	S	0	R
726	17	R	25	S	28	S	0	R
727	17	R	27	S	28	S	0	R
741	40	S	0	R	30	S	0	R
796	15	R	24	S	22	S	0	R

**ANEXO B – PRIMERS UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE
PCR, SEQUÊNCIAS, TAMANHO DOS FRAGMENTOS
ESPERADOS (PB).**

Primer	Sequência 5' – 3'	pb	Referência
<i>femA</i> -1	AAAAAAGCACATAACAAGCG	132	Mehrotra; Wang;
<i>femA</i> -2	GATAAAGAAGAAACCAGCAG		Johnson, 2000
<i>blaZ</i> A1	AAGAGATTTGCCTATGCTTC	518	Vesterholm- Nielsen
<i>blaZ</i> A2	GCTTGACCACTTTTATCAGC		et al,1999
<i>tet</i> (K)-up	TATTTTGGCTTTGTATTCTTTCA	115	Trzcinski,
	T	9	2000
<i>tet</i> (K)- rev	GCTATACCTGTTCCCTCTGATA		
	A		
<i>tet</i> (L)-up	ATAAATTGTTTCGGGTCGGTAA	107	Trzcinski,
	T	7	2000
<i>tet</i> (L)- rev	AACCAGCCAATAATGACAATG		
	AT		
<i>tet</i> (M)- up	AGTTTTAGCTCATGTTGATG	186	Trzcinski,
		2	2000
<i>tet</i> (M)- rev	TCCGACTATTTAGACGACGG		
<i>tet</i> (O)-up	AGCGTCAAAGGGGAATCACTAT	172	Trzcinski,
	CC	3	2000
<i>tet</i> (O)-up	CGGCGGGGTTGGCAAATA		

ANEXO C - RESULTADOS DOS TESTES FENOTÍPICOS E MOLECULARES REALIZADOS NAS 90 AMOSTRAS DE S. AUREUS COM FENÓTIPO DE RESISTÊNCIA À PENICILINA E/OU TETRACICLINA

(Continua)

Amostra	Disco difusão	E-test Ampicilina		E-test Penicilina	
	Amp/Pen/Tet	Leitura	Resultado	Leitura	Resultado
15	RRS	1	R	0,5	R
34	RRS	0,5	R	0,38	R
35	RRS	0,75	R	0,5	R
45	SSR	0,047	S	0,064	S
89	RRR	0,75	R	0,38	R
90	RRR	1	R	0,5	R
95	RRR	2	R	0,75	R
96	RRR	0,75	R	0,5	R
102	RRS	0,19	S	0,25	R
135	RRR	0,5	R	0,38	R
136	RRR	1	R	0,75	R
146	SSR	0,064	S	0,032	S
151	RRR	1	R	0,5	R
163	RRR	0,75	R	0,38	R
212	RRR	1	R	0,38	R
216	SSR	0,094	S	0,023	S
217	RRR	0,38	S	0,38	R
218	RRR	0,25	S	0,25	R
221	RRR	3	R	2	R
226	SSR	0,125	S	0,032	S
228	SRS	0,094	S	0,125	S
229	SRS	0,19	S	0,023	S
230	SSR	0,125	S	0,032	S
237	SSR	0,094	S	0,047	S
274	RRR	0,38	S	0,25	R
297	RRR	0,5	R	0,5	R
298	RRR	0,75	R	0,38	R
299	RRR	0,75	R	0,38	R
301	RRR	0,75	R	0,38	R

*resultado sem indução/resultado após indução

ANEXO C - RESULTADOS DOS TESTES FENOTÍPICOS E MOLECULARES REALIZADOS NAS 90 AMOSTRAS DE S. AUREUS COM FENÓTIPO DE RESISTÊNCIA À PENICILINA E/OU TETRACICLINA

(Continua)

Amostra	Disco difusão	E-test Ampicilina		E-test Penicilina	
	Amp/Pen/Tet	Leitura	Resultado	Leitura	Resultado
303	SSR	0,094	S	0,032	S
309	RRR	1,5	R	0,75	R
310	RRR	3	R	1,5	R
311	RRR	1	R	0,75	R
315	RRR	2	R	0,75	R
318	RRR	1,5	R	1,5	R
319	RRR	1,5	R	0,75	R
321	RRR	1,5	R	0,75	R
355	RRS	1	R	0,75	R
358	SRS	0,125	S	0,094	S
396	RRR	0,75	R	0,5	R
399	RRR	1,5	R	1	R
403	SRS	0,25	S	0,19	S
407	RRS	1	R	0,5	R
417	SRS	0,19	S	0,19	S
418	SRS	0,19	S	0,19	S
425	RRR	2	R	0,75	R
428	RRR	1	R	0,75	R
436	RRS	0,75	R	0,5	R
440	RRR	2	R	1	R
444	SRS	0,19	S	0,125	S
446	RRR	2	R	1	R
451	RRR	0,75	R	0,5	R
452	SRS	0,19	S	0,094	S
453	SRS	0,25	S	0,19	S
478	RRS	3	R	1	R
508	RRR	1,5	R	2	R
534	RRR	1	R	0,5	R
557	RRR	2	R	1	R

*resultado sem indução/resultado após indução

ANEXO C - RESULTADOS DOS TESTES FENOTÍPICOS E MOLECULARES REALIZADOS NAS 90 AMOSTRAS DE S. AUREUS COM FENÓTIPO DE RESISTÊNCIA À PENICILINA E/OU TETRACICLINA

(Continua)

Amostra	Disco difusão	E-test Ampicilina		E-test Penicilina	
	Amp/Pen/Tet	Leitura	Resultado	Leitura	Resultado
567	SRS	0,19	S	0,064	S
571	SRS	0,125	S	0,094	S
575	RRS	3	R	8	R
579	RRS	1,5	R	0,75	R
617	RRR	1	R	0,75	R
618	RRR	1,5	R	1,5	R
619	RRR	1	R	0,75	R
644	RRR	1,5	R	1	R
653	RRR	0,38	S	0,19	S
656	RRR	0,75	R	0,5	R
658	RRR	1	R	3	R
663	RRR	0,38	S	0,38	R
667	RRR	0,5	R	0,5	R
668	RRR	0,75	R	0,38	R
674	RRR	0,75	R	0,5	R
676	RRR	0,75	R	0,5	R
678	RRR	1	R	0,5	R
680	RRR	0,75	R	0,38	R
685	RRR	1	R	0,38	R
686	RRR	0,75	R	0,5	R
688	RRR	0,75	R	0,5	R
690	RRR	0,38	S	0,38	R
694	RRR	1	R	0,5	R
696	RRR	1	R	1	R
713	RRR	1	R	0,75	R
715	RRR	2	R	0,5	R
718	RRR	1	R	0,75	R
720	RRR	1,5	R	0,75	R
726	RRR	1,5	R	2	R
727	RRR	0,75	R	0,5	R
741	SSR	0,125	S	0,064	S
796	RRR	3	R	3	R

*resultado sem indução/resultado após indução

ANEXO C - RESULTADOS DOS TESTES FENOTÍPICOS E MOLECULARES REALIZADOS NAS 90 AMOSTRAS DE S. AUREUS COM FENÓTIPO DE RESISTÊNCIA À PENICILINA E/OU TETRACICLINA

(Continua)

Amostra	Etest Tetraciclina							
	Leitura	Resultado	Cefinase	blaZ	tetK	teL	tetM	tetO
15	0,38	S	+	+	+	-	-	-
34	0,25	S	+	+	+	-	-	-
35	0,19	S	+	+	+	-	-	-
45	32	R	-	-	+	-	-	-
89	24	R	+	+	+	-	-	-
90	32	R	+	+	+	-	-	-
95	0,38	S	+	+	+	-	-	-
96	48	R	+	+	+	-	-	-
102	0,38	S	+	+	+	-	-	-
135	24	R	+	+	+	-	-	-
136	0,38	S	+	+	+	-	-	-
146	32	R	+	+	+	-	-	-
151	24	R	+	+	+	-	-	-
163	24	R	+	+	+	-	-	-
212	24	R	-/+*	+	+	-	-	-
216	24	R	-/-	+	+	-	+	+
217	24	R	+	+	+	-	-	-
218	32	R	+	+	+	-	-	-
221	24	R	+	+	+	-	-	-
226	24	R	-/-	+	+	-	-	-
228	0,38	S	-/-	+	+	-	-	-
229	0,5	S	-/-	+	-	-	-	-
230	24	R	-/-	+	+	-	-	-
237	32	R	-/-	+	+	-	-	-
274	48	R	+	+	-	+	-	-
297	48	R	+	+	+	-	-	-
298	32	R	-/+	+	+	-	-	-
299	24	R	-/+	+	+	-	-	-
301	32	R	+	+	+	+	-	-
303	24	R	-/-	+	+	-	-	-
309	64	R	+	+	+	-	-	-

*resultado sem indução/resultado após indução

ANEXO C - RESULTADOS DOS TESTES FENOTÍPICOS E MOLECULARES REALIZADOS NAS 90 AMOSTRAS DE S. AUREUS COM FENÓTIPO DE RESISTÊNCIA À PENICILINA E/OU TETRACICLINA

(Continua)

Amostra	Etest Tetraciclina		Cefinase	blaZ	tetK	teL	tetM	tetO
	Leitura	Resultado						
310	32	R	-/+	+	+	-	-	-
311	48	R	-/+	+	+	-	-	-
315	48	R	+	+	+	-	-	-
318	64	R	-/+	+	+	-	-	-
319	32	R	+	+	+	-	-	-
321	64	R	-/+	+	+	-	-	-
355	0,5	S	+	+	+	-	-	-
358	1	S	-/-	+	+	-	-	-
396	32	R	+	+	+	-	-	-
399	96	R	+	+	+	-	-	-
403	0,25	S	+	+	+	-	-	-
407	0,5	S	+	+	+	-	-	-
417	0,25	S	+	+	+	-	-	-
418	0,38	S	+	+	+	-	-	-
425	32	R	+	+	+	-	-	-
428	32	R	+	+	+	-	-	-
436	0,5	S	+	+	+	+	-	-
440	24	R	+	+	+	-	-	-
444	0,38	S	+	+	-	-	-	-
446	24	R	+	+	+	-	-	-
451	24	R	+	+	+	-	-	-
452	0,38	S	+	+	-	-	-	-
453	0,38	S	+	+	-	-	-	-
478	0,75	S	+	+	-	-	-	-
508	32	R	+	+	+	-	-	-
534	96	R	+	+	+	-	-	-
557	32	R	+	+	+	-	-	-
567	0,38	S	-/-	+	-	-	-	-
571	0,38	S	-	+	-	-	-	-
575	0,75	S	+	+	-	-	-	-
579	0,38	S	+	+	-	-	-	-

*resultado sem indução/resultado após indução

ANEXO C - RESULTADOS DOS TESTES FENOTÍPICOS E MOLECULARES REALIZADOS NAS 90 AMOSTRAS DE S. AUREUS COM FENÓTIPO DE RESISTÊNCIA À PENICILINA E/OU TETRACICLINA

(Continua)

Amostra	Etest Tetraciclina		Cefinase	blaZ	tetK	teL	tetM	tetO
	Leitura	Resultado						
617	24	R	+	+	+	-	-	-
618	48	R	+	+	+	-	-	-
619	32	R	+	+	+	-	-	-
644	24	R	+	+	+	-	-	-
653	16	R	+	+	+	-	-	-
656	48	R	+	+	+	+	-	-
658	32	R	+	+	+	+	-	-
663	32	R	+	+	+	-	-	-
667	24	R	+	+	+	-	-	-
668	24	R	+	+	+	-	-	-
674	96	R	+	+	+	-	-	-
676	96	R	+	+	+	-	-	-
678	48	R	+	+	+	-	-	-
680	32	R	+	+	+	-	-	-
685	24	R	+	+	+	-	-	-
686	24	R	+	+	+	-	-	-
688	0,75	S	+	+	+	-	-	-
690	96	R	+	+	-	+	-	-
694	32	R	+	+	+	-	-	-
696	64	R	+	+	-	+	-	-
713	48	R	+	+	+	-	-	-
715	32	R	+	+	+	-	-	-
718	24	R	+	+	+	-	-	-
720	32	R	+	+	+	-	-	-
726	48	R	+	+	+	-	-	-
727	0,75	S	+	+	-	+	-	-
741	8	S	-	-	+	-	-	-
796	256	R	+	+	-	-	+	-

*resultado sem indução/resultado após indução