

## Caracterização fenogenotípica da resistência antimicrobiana em *Staphylococcus* spp. isolados de mastite bovina<sup>1</sup>

Elaine C.L. Mendonça<sup>2</sup>, Viviane F. Marques<sup>2</sup>, Dayanne A. Melo<sup>2</sup>, Tatiani A. Alencar<sup>3</sup>, Irene da S. Coelho<sup>4</sup>, Shana M.O. Coelho<sup>4</sup> e Miliane M.S. Souza<sup>4\*</sup>

**ABSTRACT.**- Mendonça E.C.L., Marques V.F., Melo D.A., Alencar T.A., Coelho I.S., Coelho S.M.O. & Souza M.M.S. 2012. [Phenogenotypical characterization of antimicrobial resistance in *Staphylococcus* spp. isolated from bovine mastitis as a subsidy for the implementation of control measures.] Caracterização fenogenotípica da resistência antimicrobiana em *Staphylococcus* spp. isolados de mastite bovina como subsídio para implementação de medidas de controle. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 32(9):859-864. Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ 23890-000, Brazil. E-mail: [miliane@ufrj.br](mailto:miliane@ufrj.br)

The use of antibiotic in the control of intramammary infections and in the elimination of its possible sources in dairy farms is an important control measure. However, the inappropriate use of antibiotics can result in the appearance of resistant strains and compromise the efficiency of the treatment. Besides *Staphylococcus* spp. are among the main pathogens of bovine mastitis, they are often resistant to antibiotics, especially beta-lactamics, mainly by two distinct mechanisms: the production of extracellular enzyme beta-lactamase, encoded by the *blaZ* gene, and production of PBP2a or PBP2' a penicillin-binding protein with low affinity, encoded by the *mecA* gene. The expression of *mecA* gene is constitutive or induced by beta-lactamic antibiotics, such as oxacillin and ceftiofur. The *mecA* gene is inserted into the chromosome through a staphylococcal mobile genetic element, called staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*). The present study evaluated the phenogenotypical resistance profile to beta-lactam antibiotics of 250 *Staphylococcus* spp isolates, using oxacillin and ceftiofur as markers in order to produce data to the knowledge of resistance in dairy farms located in the South-Fluminense and the Metropolitan regions of the State of Rio de Janeiro to support the implementation of measures to control this disease. The assessment of resistance was made through 8 different phenotypic tests and yielded 54 profiles. Disk diffusion and agar screen with oxacillin were used as "gold standard" for the calculation of sensitivity, specificity and prediction once they are recommended by the CLSI veterinarian as standardized tests. Disk diffusion with ceftiofur achieved the best performance in the prediction of oxacillin resistance. Genotypic detection of *mecA* do not provided any positive isolate, otherwise *mecI* and *mecR* genes were also detected in 11.6% (29/250) of the studied *Staphylococcus* spp. Four cassette *mec* types were detected (I, II, III and IV), being type I the most disseminated one. Gene *blaZ* was detected in 5.2% (13/250) isolates. From these 13 *blaZ* positive isolates, the whole system comprising *blaR1-blaI-blaZ* was detected in 23.1% (3/13) isolates.

INDEX TERMS: Bovine mastitis, antibiotic resistance, *Staphylococcus* spp.

<sup>1</sup> Recebido em 22 de fevereiro de 2012.

Aceito para publicação em 23 de maio de 2012.

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Instituto de Veterinária (IV), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23890-000, Brasil.

<sup>3</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária, UFRRJ/Universid Nacional de Rio Cuarto (UNRC), Seropédica, RJ.

<sup>4</sup> Laboratório de Bacteriologia Veterinária, IV-UFRRJ, Seropédica, RJ.

\*Autor para correspondência: [miliane@ufrj.br](mailto:miliane@ufrj.br)

**RESUMO.**- A utilização de antibióticos no controle das infecções intramamárias e na eliminação de prováveis fontes de infecção nas fazendas leiteiras se constitui em importante medida de controle. No entanto, o uso inadequado de antibióticos no tratamento da doença pode selecionar cepas resistentes e comprometer a eficiência do tratamento. Bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. estão entre os principais agentes etiológicos da mastite bovina e são fre-

qüentemente resistentes aos antimicrobianos, em especial aos beta-lactâmicos, principalmente por dois mecanismos distintos: a produção da enzima extracelular beta-lactamase, codificada pelo gene *blaZ*, e a produção de PBP2a ou PBP2', uma proteína ligante de penicilina de baixa afinidade, codificada pelo gene *mecA*. A expressão do gene *mecA* é constitutiva ou induzida por antibióticos betalactâmicos, como a oxacilina e cefoxitina. O gene *mecA* está inserido no cromossomo através de um elemento genético móvel, denominado cassete estafilocócico cromossômico *mec* (SCC*mec*). O presente estudo avaliou o perfil fenogenotípico de resistência aos beta-lactâmicos em 250 isolados de *Staphylococcus* spp., utilizando os marcadores oxacilina e cefoxitina, de modo a produzir dados que possam contribuir para o conhecimento da resistência antimicrobiana em algumas propriedades leiteiras das regiões Sul-Fluminense e Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro com o objetivo de subsidiar a implementação de medidas de controle dessa enfermidade. A avaliação da resistência foi feita a partir de 8 diferentes testes fenotípicos, sendo obtidos 54 perfis. Os testes de difusão em disco simples e ágar *screen* com oxacilina foram utilizados como "padrão ouro" para os cálculos dos valores de sensibilidade, especificidade e predição por serem preconizados pelo CLSI veterinário. O teste de difusão em disco simples com cefoxitina foi o de melhor desempenho na predição da resistência a oxacilina. Na avaliação genotípica, não foi detectado qualquer isolado positivo para o gene *mecA*, já os genes *mecI* e *mecRI* foram detectados igualmente em 11,6% (29/250) dos *Staphylococcus* spp. avaliados. Foram detectados os quatro tipos de cassete *mec* analisados (I, II, III e IV), sendo o tipo I o que teve mais ampla distribuição entre as regiões estudadas. Gene *blaZ* foi detectado em 5,2% (13/250) dos isolados, sendo que nestes, todo o sistema *blaZ-blaI-blaR1* foi detectado em 23,1% (3/13) dos isolados.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Mastite bovina, resistência antimicrobiana, *Staphylococcus* spp.

## INTRODUÇÃO

O prejuízo acarretado pela mastite bovina corresponde aproximadamente a 25% de todas as doenças de importância econômica (Busato et al. 2000). No Brasil o produtor arca com altos custos para tratar as vacas com mastite. Em 2008, por exemplo, quando a produção no país foi de 27 bilhões de litros, a perda estimada foi de R\$ 2,3 bilhões (Embrapa 2012).

Dentre as medidas adotadas para redução dos índices de infecção da glândula mamária, estão a adoção de medidas higiênicas durante a ordenha, bem como a utilização de antibióticos no controle das infecções intramamárias e na eliminação de prováveis fontes de infecção nas fazendas leiteiras (Erskine 2000). No entanto, o uso inadequado de antibióticos no tratamento da doença pode gerar o aparecimento de cepas resistentes e comprometer a eficiência do tratamento (Barberis et al. 2002).

Bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. estão entre os principais agentes etiológicos da mastite bovina e são freqüentemente resistentes aos antimicrobianos, em especial

aos beta-lactâmicos, limitando assim, a escolha do antibiótico para o tratamento das infecções causadas por este agente (Coelho et al. 2009).

A resistência estafilocócica aos antibióticos beta-lactâmicos deve-se principalmente a dois mecanismos distintos: a produção da enzima extracelular beta-lactamase, codificada pelo gene *blaZ*, geralmente alocado em plasmídeos, podendo também ser cromossomal. Esta resistência pode ser constitutiva ou regulada pela presença do antibiótico, através de dois genes adjacentes, *blaI* e *blaR1*, onde o primeiro é um repressor da transcrição de *blaZ*, e o segundo, um anti-repressor (Lowy 2003) e a produção de PBP2a ou PBP2', uma proteína ligante de penicilina de baixa afinidade, codificada pelo gene *mecA* (Kuroda et al. 2001). Hiramatsu e colaboradores (2001) identificaram o elemento regulador *mecR1-mecI*, que tem atividade repressora e anti-repressora, respectivamente, sobre o gene *mecA*. A expressão do gene *mecA* é constitutiva ou induzida por antibióticos betalactâmicos, como a oxacilina e cefoxitina (Lowy 2003). O gene *mecA* está inserido no cromossomo estafilocócico através de um elemento genético móvel, denominado cassete estafilocócico cromossômico *mec* (SCC*mec*). O SCC*mec* é composto por diversos elementos genéticos essenciais: o complexo *mec*, composto pela ilha de patogenicidade *IS431*, os genes *mecA* e seus reguladores *mecI* e *mecR1*, e o complexo *ccr* (Cassete Chromossome Recombinases), caracterizado pela presença de genes que codificam recombinases. Em todos os tipos de SCC*mec*, a sequência do gene *mecA* é altamente conservada em cepas de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* spp. coagulase negativos (Weller 2000, Ma et al. 2002). Com base na classe do complexo dos genes *mec* e *ccr* presentes e em suas combinações, os cassetes SCC*mec* são classificados em sete tipos, I, II, III, IV, V, VI e VII (Oliveira et al. 2006). Os elementos SCC*mec* tipos I, II, III e VI estão mais associados a infecções causadas por *Staphylococcus* spp. de origem nosocomiais, enquanto que os tipos IV, V e VII são encontrados com maior freqüência em *Staphylococcus* spp. de infecções comunitária (Hisata et al. 2005, Kluytmans-Vanden Bergh & Kluytmans, 2006, Kondo et al. 2007, Boyle-Vavra & Daum 2007, Deurenberg & Stabberingh 2009)

Através do desenvolvimento de forma integrada de um projeto de extensão e pesquisa, objetivou-se conhecer a realidade de algumas propriedades leiteiras das regiões Sul-Fluminense e Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro. Foram efetuadas visitas que permitiram observar o manejo e as condições sanitárias destas, bem como coletar amostras para isolamento bacteriano e para avaliação do perfil fenogenotípico de resistência desses isolados.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Isolamento bacteriano e identificação fenotípica

Foram coletadas 272 amostras de leite de vacas positivas ao "California Mastitis Test" (CMT) em 8 propriedades, sendo 4 localizadas em Rio Claro (n=100), 1 em Pirai (n=40), 2 em Paracambi (n=31) e 1 em Seropédica (n=101), todas cidades pertencentes ou adjacentes à região Sul Fluminense do Rio de Janeiro. O isolamento e a identificação bacteriana foram feitos segundo Koneman et al. (2008). Os isolados foram submetidos aos testes de suscetibili-

dade segundo os padrões do Clinical Laboratory Sandart Institute (CLSI, 2011). Para comparação e controle dos testes foi utilizada a cepa padrão ATCC 43300 *Staphylococcus aureus* obtida junto ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/INCQS/Fiocruz.

#### Testes fenotípicos de resistência aos antimicrobianos

Para análise fenotípica da resistência aos betalactâmicos foram realizados os testes de difusão em disco simples com oxacilina (1mg) e cefoxitina (30mg). Para análise específica da resistência a oxacilina foram também realizados os ensaios de difusão em disco modificada (ágar suplementado com 4% de NaCl) e ágar "screen" (ágar Mueller Hinton suplementado com 4% de NaCl e oxacilina na concentração final de 6µg/ml de antibiótico) segundo Kohner et al., (1999). Ambos antimicrobianos foram avaliados pelos ensaios de microdiluição em caldo e microdiluição em ágar (determinação da concentração inibitória mínima) em diferentes concentrações que variaram de 0,25µg/ml; 0,5µg/ml; 1,0µg/ml; 2,0µg/ml; 4,0µg/ml, 8,0µg/ml, 16µg/ml, 32µg/ml, 64µg/ml, 128µg/ml, 256µg/ml e 512µg/ml em caldo e em ágar Mueller Hinton (MH), respectivamente (CLSI 2011).

#### PCR

Para a extração do DNA bacteriano, foi ajustada metodologia proposta por Coelho et al. (2009), onde as colônias foram crescidas em caldo BHI (MERCK), centrifugadas (14.000 rpm x 1 min) e lavadas com tampão TE (Tris-EDTA) por duas vezes. O pellet foi ressuspenso em 250ml de tampão de extração (NaCl 150mM; Tris-HCl 100mM-EDTA 20mM) e a lisostafina (SIGMA) foi adicionada (20mg/ml) para posterior incubação (37°C x 30 min). A lise foi completada por adição de SDS (3mg/ml), incubação em banho-maria (50°C x 1 h) e resfriamento (-20°C x 10 min). Após centrifugação (14.000 rpm x 10 min) o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo, onde foi adicionado o mesmo volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Após nova centrifugação (14.000 rpm x 1 min) o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo, adicionado NaCl (0,3M) acrescentado 2 volumes de etanol (100%) seguido de incubação (-20°C "overnight"). Posteriormente procedeu-se a centrifugação (14.000 rpm x 30min) e o pellet foi lavado com etanol (70%) para posterior secagem em temperatura ambiente e ressusensão em água mili-Q.

Foi realizado ensaio de PCR multiplex para detecção dos genes *Staph* (Zhang et al. 2004) e *S. aureus* (Straub et al. 1999). Adicionalmente foi realizada a detecção do gene *coa* (Karahana & Cektinkaya 2006). Após essa etapa, foram realizadas amplificações dos genes espécie-específicos, *S. intermedius* (*nuc 3* e *4*) (Silva et al. 2003) e SIG (*pta*) (Bannoehr et al. 2006) para outras espécies de estafilococos coagulase positivos (ECP).

Também foram realizadas reações de PCR para amplificação dos genes relacionados à produção de β-lactamases de *Staphylococcus* spp., genes do sistema *blaZ* (Rosato et al. 2003) e *mec* (Coelho et al. 2007; Lencastre et al. 2002; Rosato et al. 2003) para todos os isolados de *Staphylococcus* spp. do presente estudo.

Além disso, foi realizada a técnica de PCR multiplex para amplificação do gene *mecI*, referente aos SSC*mec* tipos II e III; do gene *cif*, relacionado ao SSC*mec* tipo I e do gene *dcs*, correspondente aos SSC*mec* tipos I, II e IV (Lencastre et al. 2002).

#### Análise estatística

Os perfis de resistência antimicrobiana obtidos nos diferentes testes foram expressos em porcentagens analisadas de forma descritiva. Os percentuais de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivos (VPP) e negativos (VPN) dos testes fenotípicos de suscetibilidade à oxacilina e cefoxitina foram calcula-

dos considerando os resultados obtidos nos testes de Difusão em Disco Simples (DDS) e Ágar Screen (AS) padronizados pelo CLSI veterinário (2008).

## RESULTADOS

A partir das 272 amostras de leite, foram isolados 250 *Staphylococcus* spp. A identificação fenogenotípica das espécies revelou 58% (145/250) de *Staphylococcus* spp. coagulase negativos e 42% (105/250) de *Staphylococcus* spp. coagulase positivos, através da amplificação dos genes *Staph* e *coa*. Dentre as espécies coagulase-positivas identificadas obteve-se 36,2% (38/105) de *S.aureus*, 11,4% de *S.intermedius* (12/105) e 3,8% (4/105) de *Staphylococcus* spp. coagulase positivos do grupo SIG, de acordo com o perfil bioquímico e a amplificação dos genes específicos de caracterização. Os demais 51 (48,6%; 51/105) isolados foram fenotipicamente caracterizados como estafilococos coagulase-positivos, no entanto não amplificaram qualquer dos genes de caracterização específica utilizados: *DNAr* de *S.aureus*, *nuc3*, *nuc4* e *pta*.

Para avaliar a sensibilidade/especificidade dos testes fenotípicos de resistência a oxacilina e cefoxitina foi tomado como *padrão ouro*, os testes de difusão em disco simples (DDS) e ágar screen (AS) preconizados pelo CLSI veterinário (2008). Cabe ressaltar que o CLSI para análise de material humano também preconiza a microdiluição em caldo (2011). Foram obtidos 54 perfis de resistência para tais testes.

Todos os isolados estudados foram negativos para o gene *mecA*, mesmo aqueles que apresentaram resistência fenotípica nos testes preconizados. O controle positivo cepa ATCC 43300 de *Staphylococcus aureus aureus* amplificou para os dois genes da reação de multiplex (*Staphy* e *mecA*) em todos os ensaios realizados, bem como para todos os genes do complexo *mec*, descartando qualquer possibilidade de erro na execução da técnica. Os genes *mecI* e *mecRI* foram detectados igualmente em 11,6% (29/250) dos *Staphylococcus* spp.

O cassete tipo I foi o de mais ampla distribuição entre as regiões estudadas. Na região de Rio Claro foi observada predominância do cassete tipo I, os isolados do grupo SIG apresentaram apenas cassete tipo III. Na região de Pirajó foram detectados os cassetes I, II e III. Onde o I encontram-se 40% dos *S. intermedius* e o II com 20% nesta mesma espécie. Já o cassete tipo III apresenta-se com 26,08% em ECN. Em Paracambi, aparecem apenas os tipos de cassete I e II, sendo o tipo I com 20% para ECP e 10,52% para ECN; e o tipo II com 20% para ECP. No município de Seropédica predominaram os tipos de cassete I e IV, em que o tipo I apresentou 20% para ECP e o tipo IV apresentou 33,3% para *S. aureus* e 30% para ECP.

Foi possível detectar que 5,2% (13/250) dos isolados apresentou o gene *blaZ* sendo que 15,4% (2/13) dos isolados foram positivos apenas para o gene *blaZ* (indutor). O sistema completo *blaZ-blaI-blaR1* foi detectado em 23,1% (3/13) dos isolados, *mecA*-negativos e fenotipicamente resistentes à oxacilina. Foi detectada a presença dos genes *blaZ-blaI* em 61,5% (8/13) dos *Staphylococcus* spp. avaliados. Apenas 7,7% (1/13) dos *Staphylococcus* spp. foi *blaZ*-

-*blaI* positivo, *mecA* negativo e fenotipicamente resistente à oxacilina.

## DISCUSSÃO

O alto percentual de ECN encontrado neste trabalho pode estar relacionado a casos de mastite subclínica, causando uma infecção leve, que pode evoluir para cura espontânea ou se agravar para mastite clínica (Amaral et al. 2003). No presente trabalho, foi possível observar que a maior frequência de isolamentos dos ECNs se deu a partir das amostras de leite de vacas que apresentavam CMT fracamente positivo. A literatura tem reportado que a frequência de ECNs implicados na mastite clínica e subclínica em todo o mundo tem aumentado consideravelmente, tornando-os agentes emergentes na etiologia das mastites bovinas (Pitkälä et al. 2004, Freitas et al. 2005). Além disso, o carreamento de genes de resistência antimicrobiana por ECNs em ambiente de produção leiteira representa um risco potencial para sanidade animal e saúde pública, tanto pela transferência genética interespecífica, incluindo para *Staphylococcus aureus*, como pela transmissão direta de patógenos resistentes (Walther & Perreten 2007)

De acordo com os resultados dos oitos testes fenotípicos realizados foi observada uma significativa variação nos perfis de resistência obtidos, evidenciando a heterogeneidade da resistência dos *Staphylococcus* spp. à oxacilina e cefoxitina. Tal heteroresistência se caracteriza pela presença tanto de organismos suscetíveis que exibem crescimento atípico de *Staphylococcus* não-heteroresistentes, quanto organismos resistentes que crescem mais lentos, ou em condições distintas de temperatura e NaCl (Aarestrup et al. 2001).

Para avaliar a sensibilidade/especificidade destes testes tomamos como *padrão ouro*, os testes de difusão em disco simples (DSO) e ágar screen (AS) com oxacilina preconizados pelo CLSI veterinário (2008). Cabe ressaltar que o CLSI (2011) para análise de material humano também preconiza a microdiluição em caldo. Ao analisar os 54 perfis obtidos foi observado que em 64,81% (35/54) houve similaridade entre os resultados obtidos por DSO e AS correspondendo a 70% do total de isolados (175/250). Tais perfis foram considerados para os cálculos dos valores preditivos positivo e negativo, e valores de especificidade e sensibilidade dos demais testes conforme Quadro 1.

**Quadro 1. Percentagem de sensibilidade, especificidade, VPP e VPN para os testes fenotípicos realizado**

Testes*	Valores (%)			
	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN
DM	53	85	48	87
DSC	87	85	77	92
CCO	96	22	76	70
CAO	91	50	75	78
CCC	98	32	90	73
CAC	95	45	82	77

\*Teste de resistência à oxacilina; DM = Difusão em Disco Modificada; DSC = Difusão em Disco Simples com Cefoxitina; CCO = Concentração Inibitória Mínima em Caldo de Oxacilina; CAO = Concentração Inibitória Mínima em Ágar de Oxacilina; CCC = Concentração Inibitória Mínima em Caldo de Cefoxitina; CAC = Concentração Inibitória Mínima em Ágar de Cefoxitina. VPP = Valor preditivo positivo; VPN = Valor preditivo negativo.

Ao analisar os resultados obtidos é possível observar que o teste de Difusão em Disco Simples com Cefoxitina (DSC) é o de melhor desempenho quando comparado aos testes padrão. Suas características de sensibilidade, especificidade e valores de predição aliadas ao seu baixo custo e fácil execução permitem que este venha a ser uma alternativa valorosa na predição fenotípica da resistência aos beta-lactâmicos. Os resultados obtidos no presente trabalho confirmam a validade desse teste como ferramenta útil também para o diagnóstico bacteriológico clínico em Medicina Veterinária.

Todos os isolados estudados foram negativos para o gene *mecA*, mesmo aqueles que apresentaram resistência fenotípica nos testes preconizados, exceto a cepa padrão, descartando qualquer possibilidade de erro na execução da técnica. Os genes *mecI* e *mecRI* foram detectados igualmente em 11,6% (29/250) dos *Staphylococcus* spp. Até o momento, em nossos estudos, não tem sido observada correlação entre os perfis fenotípicos de resistência e a detecção gênica, desse modo, pretendemos em etapa futura, investigar os processos de regulação e transcrição gênica do *mecA*, bem como do produto dessa expressão, no caso a proteína de baixa afinidade PBP2a.

Apesar da não detecção de isolados *mecA* positivos, foram detectados os quatro tipos de cassette nos isolados estudados, o que causa uma série de questionamentos, uma vez que todo MRSA deveria apresentar o gene *mecA* em seu cassette. Entretanto, no período de janeiro de 2006 a junho de 2011, a partir da análise de 12.691 isolados de origem humana coletados na Alemanha, foi encontrado um novo tipo de cassette em 11 isolados, denominado cassette tipo XI. A cepa foi nomeada MRSA CC130 e contém um homólogo do gene *mecA*, denominado *mecA*<sub>LGA251</sub> (Cuny et al. 2011).

Este homólogo do gene *mecA* foi descrito em casos de mastite bovina e mais recentemente em seres humanos ambos no Reino Unido (Shore et al. 2011, García-Álvarez et al. 2011). Isolados oriundos de seres humanos com fenótipo de MRSA, negativos para *mecA* e positivos para *mecA*<sub>LGA251</sub> foram encontrados na Inglaterra e na Dinamarca. Curiosamente, este homólogo do gene *mecA* não é detectado por PCR com primers para detecção de *mecA* (Cuny et al. 2011).

Até o momento MRSA ST130 ainda não foi isolado de bovinos, mas parece ter uma origem animal provável, pois já foi isolado a partir de um swab nasal de um veterinário em Baviera (Cuny et al. 2011). Além disso, conforme foi relatado na Dinamarca e no Reino Unido, MRSA ST130 é absolutamente capaz de colonizar e causar infecções em bovinos e em seres humanos (Shore et al., 2011; García-Álvarez et al. 2011). Vale ressaltar que isolados resistentes à oxacilina e cefoxitina que se apresentem negativos para *mecA*, devem ser submetidos ao PCR para *mecA*<sub>LGA251</sub>. Estudos futuros devem mostrar se há diferenças na capacidade de disseminação entre seres humanos de *S. aureus* e MRSA ST130 (Cuny C et al. 2011).

O cassette tipo I foi o de mais ampla distribuição entre as regiões estudadas, justificado a alta resistência aos beta-lactâmicos encontrada neste trabalho, uma vez que este tipo de cassette, assim como o cassette tipo IV contém o gene *mecA* como o único determinante de resistência, causando

resistência apenas a esta classe de antimicrobianos (Boyle-Vavra & Daum 2007).

Na região de Rio Claro foi observada predominância do cassete tipo I, os isolados do grupo SIG apresentaram apenas cassete tipo III. Na região de Pirai foram detectados os cassetes I, II e III. Os tipos de cassete II e III contêm múltiplos determinantes para resistência, como plasmídeos integrados e transposons, e são responsáveis pela multi-resistência normalmente encontrada em cepas de origem hospitalar. Devido ao seu tamanho, a transferência horizontal dos SCC*mec* tipos II e III é difícil quando comparados com o tipo IV, e a disseminação destes elementos ocorre principalmente como resultado da pressão seletiva da exposição a antibióticos (Boyle-Vavra & Daum 2007). Em Paracambi, aparecem apenas os tipos de cassete I e II. O cassete tipo IV foi prevalente no município de Seropédica. No município de Seropédica predominaram os tipos de cassete I e IV. Devido ao seu menor tamanho e ausência de outros genes de resistência, as cepas cassete SCC*mec* tipo IV são provavelmente mais móveis, conferindo vantagem fora da pressão relacionada a antibióticos em ambiente hospitalar, possibilitando sua rápida disseminação na comunidade (Cohen 2007).

Foi considerado um possível envolvimento de  $\beta$ -lactamases como explicação para o mecanismo de resistência observado nos isolados *mecA*-negativos e fenotipicamente resistentes à oxacilina. No entanto, o gene *blaZ* foi detectado em 5,2% (13/250) dos isolados, sendo que nestes 13 isolados, todo o sistema *blaZ-blaI-blaR1* foi detectado em apenas 3 isolados (23,1%) e apenas 1 isolado foi *blaZ-blaI* positivo, *mecA* negativo e fenotipicamente resistente à oxacilina. Este resultado não subsidia o envolvimento do complexo *blaZ* na resistência detectada, semelhantemente ao ocorrido com o complexo *mecA*. Por outro lado, estes dados corroboram com a atual discussão sobre o envolvimento de outros mecanismos de resistência, tais como, a presença do gene homólogo *mecA*<sub>LG251</sub> ou outras classes de PBPs (por exemplo, PBP3 e PBP4). Memmi et al. (2008) reportam ser a PBP4 o elemento chave para a resistência aos beta-lactâmicos em cepas CA-MRSA e que a PBP2a, produto do gene *mecA*, não é determinante para a resistência a oxacilina. Com base no exposto, considera-se que a multiplicidade de fatores associados à resistência aos  $\beta$ -lactâmicos requer uma investigação minuciosa que inclua a detecção de diferentes marcadores genéticos de resistência, bem como o estudo da regulação da expressão gênica do sistema *mec*, para aprofundar a compreensão do real valor de sua detecção na predição da resistência aos antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos, conforme preconizado pelo CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute).

## CONCLUSÕES

O presente estudo revelou a prevalência de *Staphylococcus* spp. coagulase negativos (58%) corroborando com relatos de sua atual emergência nos casos de mastite bovina. Dentre os coagulase-positivos, *Staphylococcus aureus* confirmou-se como espécie prevalente (36,2%).

Foram detectados 54 perfis fenotípicos de resistência à oxacilina e cefoxitina, sendo Difusão em Disco Simples com

Cefoxitina (DSC) o teste de melhor desempenho quando comparado aos testes padrão.

A baixa correlação entre a resistência fenotípica observada e a detecção dos complexos gênicos *mecA* e *blaZ* corrobora com a atual discussão sobre o envolvimento de outros mecanismos, a serem estudados, de resistência aos beta-lactâmicos.

**Agradecimentos.**- Este estudo foi fomentado pela FAPERJ (Processos E-26/103.076/2008, E-26/111.147/2010 e E-26/110.526/2011).

## REFERÊNCIAS

- Aarestrup F.M. & Schwarz S. 2006. Staphylococci and streptococci, p.187-206. In: Aarestrup F.M. (Ed.), Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin. ASM Press, Washington, DC.
- Amaral L.A., Rossi Júnior O.D., Nader Filho A., Ferreira F.L.A. & Barros L.S.S. 2003. Incidence of *Staphylococcus* sp. in the water used by dairy farms in the State of Sao Paulo. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 55(5):14884-900.
- Bannoehr J., Ben Zakour N.L., Waller A.S., Guardabassi L., Thoday K.L., Van den Broek A.H. & Fitzgerald J.R. 2007. Population genetic structure of the *Staphylococcus intermedius* group: Insights into *agr* diversification and the emergence of methicillin-resistant strains. J. Bacteriol. 189:8685-8692.
- Barberio A., Gietl H. & Dalvit P. 2002. "In vitro" sensibilidade aos antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* e coliformes isolados de mastite bovina na região de Veneto, Itália, no período de 1996-1999. Revta Napgama 5(1):10.
- Boyle-vavra S. & Daum R.S. 2007. Community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: The role of Pantone-Valentine leukocidin. Lab. Invest. 87:3-9.
- Busato A., Trachsel P., Schallibaum M. & Blum J.W. 2000. Udder health and risk factors for subclinical mastitis in organic dairy farms in Switzerland. Prev. Vet. Med. 44:205-220.
- CLSI 2008. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals. Approved Standards. 3<sup>rd</sup> ed. M31-A3. CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- CLSI 2011. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 20<sup>th</sup> Informational Supplement, M100-S20. CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Cohen P.R. 2007. Community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* skin infections: A review of epidemiology, clinical features, management and prevention. Int. J. Dermatol. 46:1-11.
- Coelho S.M.O., Reinoso E., Pereira I.A., Soares L.C., Demo M., Bogno C. & Souza M.M.S. 2009. Virulence factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Rio de Janeiro. Pesq. Vet. Bras. 29:369-374.
- Coelho S.M.O., Menezes R.A., Soares L.C. & Souza M.M.S. 2007. Mapeamento do perfil de resistência e detecção do gene *mecA* em *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus intermedius* oxacilina-resistentes isolados de espécies humanas e animais. Ciência Rural. 37:195-200.
- Cuny C., Layer F., Strommenger B. & Witte W. 2011. Rare occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC130 with a novel *mecA* homologue in humans in Germany. PLoS ONE 6(9):e24360.
- Deurenberg R.H. & Stabbering E.E. 2009. The molecular evolution of hospital- and community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Curr. Molec. Med. 9:100-115.
- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite <<http://www.cnpgl.embrapa.br/>> Acessado em 4 jan. 2012.
- Erskine R. 2000. Antimicrobial drug use in bovine mastitis, p.712-734. In: Prescott J.F., Baggot J.D. & Walker R.D. (Eds), Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine. Iowa State University Press, Ames.
- Freitas M.F.L., Pinheiro Junior J.W., Stamford T.L.M., Rabelo S.S.A., Silva D.R., Silveira Filho V.M., Santos F.G.B. & Mota R.A. 2005. Perfil de sensibilidade

- antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus* coagulase positivos isolados de leite de vacas com mastite no agreste do Estado de Pernambuco. Arqs Inst. Biológico, São Paulo, 72(2):171-177.
- García-Álvarez L., Holden M.T., Lindsay H., Webb C.R., Brown D.F., Curran M.D., Walpole E., Brooks K., Pickard D.J., Teale C., Parkhill J., Bentley S.D., Edwards G.F., Girvan E.K., Kearns A.M., Pichon B., Hill R.L., Larsen A.R., Skov R.L., Peacock S.J., Maskell D.J. & Holmes M.A. 2011. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: A descriptive study. *Lancet Infect. Dis.* 11(8):595-603.
- Hiramatsu K., Hanaki H., Ito T., Yabuta K., Oguri T. & Tenover F.C. 2001. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J. Antimicrob. Chemother.* 40:135-136.
- Hisata K., Kuwahara-Arai K., Yamanoto M., Ito T., Nakatomi Y., Cui L., Baba T., Terasawa M., Sotozono C., Kinoshita S., Yamashiro Y. & Hiramatsu K. 2005. Dissemination of methicillin resistant staphylococci among healthy Japanese children. *J. Clin. Microbiol.* 43:3364-3372.
- Karahan M. & Cetinkaya B. 2006. Coagulase gene polymorphisms detected by PCR in *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis in Turkey. *Vet. Journal* 174:428-431.
- Kluytmans-Vanden Bergh M.F.Q. & Kluytmans J.A.J. 2006. Community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: Current perspectives. *Clin. Microbiol. Infect.* 12(1):9-15.
- Kondo Y., Ito T., Ma X.X., Watanabe S., Kreiswirth B.N., Etienne J. & Hiramatsu K. 2007. Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome *mec* type assignment: rapid identification system for *mec*, *ccr*, and major differences in junkyard regions. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:264-274.
- Kohner J. P., Uhl J., Kolbert C., Persing D. & Cockerill F. A. 1999. Comparison of susceptibility testing methods with *mecA* Gene analysis for determining oxacilin (methicilin) resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and coagulase -ative *Staphylococcus* spp. *J. Clin. Microbiol.* 37(9):2952-2961.
- Koneman E.W., Allen S.D., Janda W.M., Schreckenberger P.C. & Winn J.R. 2008. *Diagnóstico Microbiológico*. 6ª ed. Meds, Rio de Janeiro. 1488p.
- Kuroda M., Ohta T., Uchiyama I., Baba T., Yuzawa H.I., Kobayashi L., Cui A., Oguchi K., Aoki Y. & Nagai J. 2001. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *New Engl. J. Med.* 319:157-61.
- Lencastre H. & Oliveira D.C. 2002. Multiplex PCR Strategy for Rapid Identification of Structural Types and Variants of the *mec* Element in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46(7):2155-2161.
- Lowy F.D. 2003. Antimicrobial resistance: The example of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Invest.* 111:1265-1273.
- Ma X.X., Ito T., Tiensasitorn C., Jamklang M., Chongtrakool P., Boyle-Vavra S., Daum R.S. & Hiramatsu K. 2002. Novel type of staphylococcal cassette chromosome *mec* identified in community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46(4):1147-1152.
- Memmi G., Filipe S.R., Pinho M.G., Fu Z. & Cheung A. 2008. *Staphylococcus aureus* BBP4 is essential for B-lactam resistance in in community-acquired methicillin resistant strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52(11):3955-3966.
- Oliveira D.C., Milheirico C. & de Lencastre H. 2006. Redefining a structural variant of staphylococcal cassette chromosome *mec*, SCC*mec* type VI. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50:3457-3459.
- Pitkälä A., Haveri M., Pyörälä S., Myllys V. & Honkanen-Buzalski T. 2004. Bovine mastitis in Finland 2001: Prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. *J. Dairy Sci.* 87:2433-2441.
- Rosato A.E., Kreiswirth B.N., Graig W.A., Eisner W., Climo M.W. & Aecker G.L. 2003. *mecA-blaZ* corepressors in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:1463-1466.
- Silva W.P., Silva A.J., Macedo M.R.P., Araújo M.R., Mata M.M. & Gandra E.A. 2003. Identification of *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius* and *S. hyicus* by Pcr amplification of *coa* and *nuc* genes. *Brazi. J. Microbiol.* 34(1):125-127.
- Shore A.C., Deasy E.C., Slickers P., Brennan G., O'Connell B., Monecke S., Ehrlich R. & Coleman D.C. 2011. Detection of staphylococcal cassette chromosome *mec* type XI encoding highly divergent *mecA*, *mecI*, *mecR1*, *blaZ* and *ccr* genes in human clinical clonal complex 130 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55:3765-3773.
- Straub J.A., Hertel C. & Hammes W.P. 1999. A 23S RNAr-targeted polymerase chain reaction-based system for detection of *Staphylococcus aureus* in meat started cultures and dairy products. *J. Food Protection* 62:1150-1156.
- Walther C. & Perreten V. 2007. Letter to the editor: Methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* in organic milk production. *J. Dairy Sci.* 90:5351.
- Weller T.M.A. 2000. The distribution of *mecA*, *mecRI* and *mecI* and sequence analysis of *mecI* and the *mec* promoter region in staphylococci expressing resistance to methicillin. *J. Antimicrob. Chemother.* 43:15-22.
- Zhang L., Gray L., Novick R.P. & Ji G. 2002. Transmembrane topology of AgrB, the protein involved in the post-translational modification of AgrD in *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* 277:34736-34742.