

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

T

S586r
2008
Silva, Carla Cilene Matos, 1972-
Resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus aureus*
isolados de gado de leite / Carla Cilene Matos Silva. –
Viçosa, MG, 2008.
xiii, 94f.: il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Célia Alencar de Moraes.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 82-94.

1. Drogas - Resistência em microorganismos.
2. *Staphylococcus aureus* - Filogenia. 3. Mastite.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 579.353

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

CARLA CILENE MATOS SILVA

RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS EM *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE GADO DE LEITE

Tese apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação
em Microbiologia Agrícola, para
obtenção do título de *Doctor
Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2008

CARLA CILENE MATOS SILVA

**RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS EM *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*
ISOLADOS DE GADO DE LEITE**

Tese apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia Agrícola, para
obtenção do título de *Doctor
Scientiae*.

APROVADA: 28 de fevereiro de 2008.

Dr^a Maria A. V. Paiva e Brito
(Co-orientadora)

Prof^a Tânia Maria F. Salomão

Prof^a Maria Cristina Dantas
Vanetti

Prof. Arnaldo Chaer Borges

Prof^a Célia Alencar de Moraes
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

Meu reconhecimento se direciona a Deus em primeira instância, sustentáculo seguro, que me permitiu continuar o caminho em meio a tantas atribulações e frustrações. Sem a Sua presença constante na minha vida, a jornada seria mais difícil.

Devo especial gratidão à professora Célia Alencar de Moraes, pelas palavras de estímulo e irrestrito apoio, que me auxiliaram sempre, especialmente nos instantes em que a dúvida e o desânimo se fizeram presentes.

Aos mestres que participaram com imprescindíveis contribuições à minha formação pessoal e acadêmica, meu sincero agradecimento. À professora Maria Aparecida Scatamburlo Moreira pelos conselhos e constante auxílio; a Dra. Maria Aparecida Vasconcelos Paiva e Brito pela disponibilidade em ceder os isolados utilizados neste estudo; à professora Tânia Maria Fernandes Salomão pelo auxílio e apoio técnico.

Agradeço a Vanilda Sales Tibúrcio, pelo profissionalismo e carinho que dispensou durante nossas longas conversas.

Registro meu agradecimento ao grande amigo Robert, que me acolheu carinhosamente em sua casa nos primeiros anos dessa jornada, me proporcionando momentos de refazimento do corpo e da alma.

Agradeço à amiga Mônica, pelos conselhos, torcida e carinho, principalmente, durante as horas de incerteza.

Meu agradecimento sincero ao Anderson, grande amigo, pelo muito que aprendi durante o tempo de convivência, pelo incentivo, apoio e carinho.

Ao Alexandre, querido companheiro de muitas jornadas, registro aqui a minha gratidão pela sua presença amorosa, feito anjo da guarda, que consola, acolhe e compreende.

Aos meus familiares, por compreender os tantos momentos ausentes do caro convívio familiar e pelo apoio e carinho imprescindíveis nessa jornada, deixo registrado meu eterno agradecimento.

Agradeço ainda aos meus companheiros de caminhada que não me faltaram com o apoio nas horas de trabalho infindáveis. Foram tantos que me é difícil enumerá-los aqui. Aos amigos do Laboratório de Microbiologia Industrial, pela amizade, carinho e torcida constante e aos funcionários do Departamento meu sincero agradecimento.

A todos que de forma direta ou indireta estiveram presente em minha vida e contribuíram para o meu crescimento moral e intelectual, meu eterno agradecimento.

BIOGRAFIA

CARLA CILENE MATOS SILVA, filha de Joaquim Rodrigues da Silva e Nília Santos Matos, nasceu em Frei Gaspar, Minas Gerais, em 21 de fevereiro de 1972.

Em fevereiro de 1994, concluiu a graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa-MG, obtendo o título de Bacharel e Licenciada em Ciências Biológicas. Como trabalho de conclusão de curso, defendeu o projeto intitulado “Estudo morfológico e determinação do peso molecular das poliedrinas e granulinas de Baculovírus isolados no Brasil”, sob orientação do professor Dr. José Mario da Silveira Mezêncio. Durante a graduação foi bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Em 1994, ingressou no mestrado do programa de Pós-Graduação em Microbiologia pela Universidade Federal de Minas Gerais, tornando-se bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Em dezembro de 1997, defendeu a dissertação de mestrado, com o projeto intitulado “Inativação de *Leptospira interrogans*: avaliação da imunogenicidade e da proteção contra a infecção renal em hamsters”, sob orientação da professora Dra. Matilde Cota Koury.

Em 1998, foi aprovada em concurso público pela Universidade Estadual de Montes Claros, onde permaneceu com atividades de docência e pesquisa até 2005. Neste mesmo ano assumiu o cargo de professora de Microbiologia e Microbiologia de Alimentos da FAMINAS, Faculdade de Minas, em Muriaé - MG.

Em 2002, ingressou no doutorado do programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola pela Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa- MG, sob orientação da professora Dra. Célia Alencar de Moraes.

Em fevereiro de 2008, defendeu a tese de doutorado intitulada “Resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados de gado de leite”.

ÍNDICE

	Página
Lista de Figuras.....	vii
Lista de Quadros	ix
Resumo.....	x
Abstract.....	xii
1. Introdução.....	1
2. Revisão da literatura.....	3
2.1. Diversidade genética	3
2.2. Mecanismos de ação e de resistência a antimicrobianos β-lactâmicos em bactérias.....	8
2.2.1. B-lactâmicos.....	8
2.2.2. Mecanismo de ação dos β- lactâmicos.....	11
2.2.3. Mecanismos de resistência de <i>Staphylococcus aureus</i> a β-lactâmicos.....	13
2.3. Mecanismos de ação e de resistência a antimicrobianos macrolídeos em bactérias.....	21
2.3.1. Macrolídeos	21
2.3.2. Mecanismo de ação dos macrolídeos	22
2.3.3. Mecanismos de resistência de <i>Staphylococcus aureus</i> aos macrolídeos	25
3. Objetivos.....	30
3.1. Objetivo geral.....	30
3.2. Objetivos específicos	30
4. Materiais e Métodos	32

4.1. Origem dos isolados.....	32
4.2. Extração de DNA e amplificação do gene de rRNA16S	34
4.3. Resistência dos isolados a β -lactâmicos e macrolídeos	35
4.4. Detecção da presença dos genes <i>blaZ</i> , <i>mecA</i> e <i>ermC</i>	36
4.5. Sequenciamento e análise filogenética	39
5. Resultados e Discussão	40
5.1. Relações filogenéticas de <i>S. aureus</i> isolados de gado de leite com mastite crônica, clínica e subclínica	40
5.2. Perfil de resistência dos isolados aos β -lactâmicos.....	50
5.3. Detecção da presença dos genes <i>blaZ</i> e <i>mecA</i> de <i>S.</i> <i>aureus</i>	58
5.4. Detecção, sequenciamento e análise filogenética dos genes <i>blaZ</i> e <i>mecA</i> de <i>S. aureus</i>	63
5.5. Resistência dos isolados à tilosina e detecção da presença do gene <i>ermC</i>	68
5.6. Sequência e análise filogenética de <i>ermC</i>	78
6. Conclusões.....	80
7. Referências bibliográficas	82

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Estrutura de antibióticos β -lactâmicos	10
Figura 2 - Adição de novo material ao peptidoglicano pré-existente e o mecanismo de ação da penicilina	12
Figura 3 - Operon <i>blaR1-blaI—blaZ</i> e a via de transdução de sinal para expressão de β -lactamase em <i>S. aureus</i>	20
Figura 4 - Estrutura química de alguns macrolídeos.....	23
Figura 5 - Árvore filogenética reconstruída com sequências do gene de rRNA 16S dos isolados de <i>S. aureus</i> de gado com mastite subclínica	44
Figura 6 - Árvore filogenética reconstruída com sequências do gene de rRNA 16S isolados de <i>S. aureus</i> de gado com mastite clínica	47
Figura 7 - Árvore filogenética reconstruída com sequências do gene de rRNA 16S dos isolados de <i>S. aureus</i> de gado com mastite crônica	49
Figura 8 - A) Efeito de concentrações ($\mu\text{g/ml}$) de penicilina (Pen) e B) ampicilina (Amp), sobre o crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> , isolado 2724/SP	55
Figura 9 - A) Efeito de concentrações ($\mu\text{g/ml}$) de penicilina (Pen) e B) ampicilina (Amp), sobre o crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> , isolado 2727/SP	56

Figura 10 - Efeito de concentrações ($\mu\text{g/ml}$) de oxacilina (Oxa) sobre o crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> , isolado 226/C.....	57
Figura 11 - Produtos da amplificação por PCR do gene <i>blaZ</i> dos isolados analisados.....	59
Figura 12 - Produtos da amplificação por PCR do gene <i>mecA</i> dos isolados analisados.....	59
Figura 13 - Árvore filogenética reconstruída com sequências do gene <i>blaZ</i>	65
Figura 14 - Árvore filogenética reconstruída com sequências do gene <i>mecA</i>	67
Figura 15 - Distribuição de resistência de <i>S. aureus</i> à tilosina dos 31 isolados de gado com mastite clínica, subclínica e crônica.....	77
Figura 16 - Árvore filogenética reconstruída com sequências do gene <i>ermC</i>	79

LISTA DE QUADROS

	Página
Quadro 1 - Isolados de <i>S. aureus</i> pertencentes à coleção de culturas da EMBRAPA- Juiz de Fora.....	33
Quadro 2 - Oligonucleotídeos iniciadores (<i>primers</i>) usados para a amplificação de segmentos dos genes <i>mecA</i> , <i>blaZ</i> , <i>ermC</i> de <i>S. aureus</i>	38
Quadro 3 -Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/ml}$) dos β -lactâmicos em Caldo Nutriente e perfil de resistência dos isolados de <i>S. aureus</i> isolados de vacas com mastite clínica, subclínica e crônica.	52
Quadro 4 - Perfil genotípico e o fenotípico de <i>S. aureus</i> isolados de vacas com mastite clínica após exposição à tilosina em Caldo Nutriente.	70
Quadro 5 - Perfil genotípico e o fenotípico de <i>S. aureus</i> isolados de vacas com mastite subclínica com CMT positivo após exposição à tilosina em Caldo Nutriente.....	71
Quadro 6 - Perfil genotípico e fenotípico de <i>S. aureus</i> isolados de vacas com mastite subclínica com CMT negativo após exposição à tilosina em Caldo Nutriente.	72
Quadro 7 - Perfil genotípico e fenotípico de <i>S. aureus</i> isolados de vacas com mastite subclínica crônica após exposição à tilosina em Caldo Nutriente.	72

RESUMO

SILVA, Carla Cilene Matos, D.Sc. Universidade Federal de Viçosa, fevereiro, 2008. **Resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados de gado de leite.** Orientadora: Célia Alencar de Moraes. Co-orientadores: Maria Aparecida Vasconcelos Paiva e Brito e Maria Aparecida Scatamburlo Moreira e Hilário Cuqueto Mantovani.

A diversidade genética entre linhagens de *Staphylococcus aureus* isoladas de casos de mastite bovina da Zona na Mata Mineira e os seus principais modelos de resistência à penicilina, oxacilina, ampicilina e tilosina foram estudados. A análise filogenética dos isolados foi conduzida após amplificação e sequenciamento de regiões de DNA que codificam rRNA 16S, comparando-se seqüências dos isolados com as seqüências correspondentes em *S. aureus* provenientes de casos clínicos humanos depositadas no GeneBank. A caracterização da resistência dos isolados foi feita pela determinação da concentração inibitória mínima (CIM). A presença dos genes *blaZ*, *mecA* e *ermC* foi detectada por amplificação por PCR com primers específicos. As seqüências de rRNA 16S de *S. aureus* provenientes de casos de mastite clínica, subclínica e crônica de diferentes localidades da Zona da Mata Mineira demonstraram diversidade entre os isolados. Dois dos nove isolados de mastite bovina subclínica distinguem-se dos outros por mostrarem-se filogeneticamente mais próximos a uma das linhagens de origem humana do que às outras sete linhagens bovinas.

Os isolados provenientes de vacas com mastite clínica separam-se nitidamente dos isolados de origem clínica humana. Isolados de casos de mastite crônica oriundos do mesmo rebanho apresentam grande proximidade entre si e agrupam-se com *S. aureus* originado de espécimes clínicos humanos. Entre os isolados, 48% mostram-se sensíveis aos antimicrobianos ampicilina e penicilina e 97% mostraram-se sensíveis a oxacilina. As presenças dos genes *blaZ* e *mecA* foram detectadas em 16% e 13% nos 31 isolados estudados, respectivamente. Entre os isolados resistentes a ampicilina e penicilina, 31% e 25%, apresentaram o gene *blaZ* e *mecA*, respectivamente. O isolado 226/C, proveniente de mastite bovina clínica, foi caracterizado como MRSA. Dos isolados estudados, 6,45% apresentaram resistência à tilosina. e somente o isolado 247/R, proveniente de mastite bovina crônica apresentou o gene *ermC*. A análise das sequências dos genes *blaZ* de cinco isolados estudados mostrou que existe uma distância filogenética entre eles e o *blaZ* de *S. aureus* de origem humana. As diferenças observadas entre as sequências do gene *ermC* em isolados de diferentes casos de mastite indicam uma grande diversidade genética entre os genes *ermC*. Constata-se diversidade genética entre isolados de *S.aureus* provenientes de vacas com mastite na zona da Mata Mineira, bem como diversidade entre os modelos e entre os genes de resistência a antimicrobianos.

ABSTRACT

SILVA, Carla Cilene Matos, D.Sc. Universidade Federal de Viçosa, february, 2008. **Antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from dairy cattle.** Adviser: Célia Alencar de Moraes. Co-advisers: Maria Aparecida Vasconcelos Paiva e Brito, Maria Aparecida Scatamburlo Moreira and Hilário Cuqueto Mantovani.

The genetic diversity among *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis cases in the Zona da Mata Region, Minas Gerais, Brazil, was studied along with the strains resistance to penicillin, oxacillin, ampicillin and also to tylosin. DNA amplification and sequencing of the 16S rRNA encoding region were performed for phylogenetic analysis. Antimicrobial resistance profiles were determined by Minimal Inhibitory Concentration measurements (MIC). The genes *blaZ* and *mecA*, conferring resistance to β -lactams, and the gene *ermC*, conferring resistance to macrolide, were detected by PCR amplification with specific primers. 16S rDNA sequences originated from *S. aureus* isolated from cows with clinical, subclinical or chronic mastitis in different regions of Zona da Mata displayed genetic diversity among themselves as demonstrated by nucleotide alignment and reconstruction of phylogenetic trees. Two of the nine bovine isolates from subclinical mastitis displayed closer relatedness with *S. aureus* originated from human clinical specimens than to the others of bovine origin. Strains isolated from cows with chronic mastitis were less related to *S. aureus* originated from human clinical specimens. Strains from chronic mastitis

originated from the same herd are phylogenetically very close and also group with *S. aureus* from human origin. Among all the strains, 48% were sensitive to ampicillin and penicillin, 97% were sensitive to oxacillin. The genes *blaZ* and *mecA* were present in 16% and 13%, respectively, among the 31 strains. Among strains resistant to ampicillin and penicillin, 31% and 25%, presented *blaZ* and *mecA*, respectively. *S. aureus* 226/C, originating from clinical mastitis, was determined to have the MRSA phenotype. Only 6,5% were resistant to tylosin and only one *S. aureus* strain, 247/R isolated from chronic mastitis, presented the *ermC* gene. Phylogenetic analysis of the *blaZ* sequences revealed close relatedness among all the strains from the region; however a difference from the human originated *S. aureus* was observed. The genes *ermC* found and sequenced are also different. Genetic diversity was thus demonstrated among *S. aureus* strains isolated from cows with mastitis and among the prevalent antimicrobial resistance genes.

1. INTRODUÇÃO

A caracterização dos mecanismos de resistência a drogas em patógenos isolados do leite e de seus derivados é extremamente importante para a saúde pública uma vez que esses alimentos são consumidos pela comunidade em geral. Portanto, o leite proveniente de animais com mastite, a mais frequente doença infecciosa que acomete o gado leiteiro, pode ser uma importante fonte de contaminação de humanos por esses microrganismos. Entre os principais patógenos isolados de animais com mastite encontra-se *Staphylococcus aureus*. Esta espécie apresenta resistência a praticamente todas as classes de antimicrobianos disponíveis no mercado, tornando-se um alvo de interesse em pesquisas relacionadas a multirresistência. Conforme descrito na literatura, existe uma diversidade de mecanismos de resistência a antimicrobianos conhecidos em *S. aureus* que poderiam justificar a resistência múltipla dessa espécie.

O estudo genômico dos mecanismos de resistência a antimicrobianos é importante para a caracterização de sistemas que

podem se tornar alvos específicos de inibidores e para o monitoramento da distribuição dos genes de resistência. Conhecer os aspectos genotípicos da resistência de uma população microbiana e obter inibidores específicos para o seu controle tornou-se hoje um importante objetivo para quimioterapia anti-infectiva. O monitoramento dos determinantes de resistência aos antimicrobianos é de fundamental importância para o estado de Minas Gerais, que tem sua economia grandemente voltada para o agronegócio dos produtos de leite e carne. Aspectos sanitários relacionados a bactérias multiresistentes têm sido cada vez mais discutidos na comunidade internacional.

Em razão dos aspectos epidemiológicos e econômicos da mastite e da multirresistência em seu principal agente etiológico, propõe-se estudar a diversidade de linhagens de *S. aureus* isolados de diferentes casos de mastite bovina ocorridos na Zona da Mata Mineira e os seus principais modelos de resistência à penicilina, oxacilina, ampicilina e fillosina.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. DIVERSIDADE GENÉTICA

Os principais fenômenos genéticos envolvidos no aumento da diversidade do genoma bacteriano incluem duplicação, transferência horizontal e perda de genes e rearranjos cromossômicos.

A duplicação do gene é considerada um importante mecanismo de inovação do gene antecedente e tem facilitado a adaptação a mudanças ambientais e exploração de novos nichos (Hooper e Berg, 2003). A capacidade bacteriana de realizar mudanças rápidas em condições ambientais pode impedir a extinção em massa de uma população bacteriana (Dykhuizen, 1998). Em um ambiente que sofre mudanças constantes, alguns genes parecem ser preservados após duplicação, mostrando a importância do processo de duplicação gênica na evolução biológica (Tekaia et al., 1999). O papel da duplicação de genes na evolução tem sido bastante estudado (Jordan, et al., 2001; Hooper e Berg, 2003). Um estudo realizado com gene parálogos em bactérias

mostrou que muitos dos genes duplicados parecem ter surgido de pequenos eventos de duplicação do gene (Gevers et al., 2004). Eventos de duplicação em grande escala, como ocorre em eucariotos não foram observados em genoma bacteriano (Vandepoele et al., 2004).

A transferência horizontal de genes (HGT) é o segundo mecanismo alternativo adotado pelos procariotos para adaptação genética a um determinado ambiente. A introdução de novos genes ou alelos por transferência gênica horizontal permite uma adaptação nicho-específica, que pode resultar eventualmente em diversificação e especiação (Ochman et al., 2000 Cohan, 2001). Existem controvérsias sobre o papel da transferência horizontal de genes porque evidências filogenéticas proporcionadas por (HGT) podem ser atribuídas à combinação de duplicação gênica e eventos de perda de genes linhagem-específicos. Sorensen et al. (2003) detectaram e quantificaram a transferência horizontal de genes utilizando citometria de fluxo e o gene repórter *gfp* que codifica uma proteína verde fluorescente.

A perda de conteúdo genético tem contribuído para balancear o ganho gênico ocorrido em função da duplicação de genes e da HGT. As deleções podem ser úteis na eliminação de genes que não desempenham uma função significativa no contexto genômico ou que foram adquiridos como sequências supérfluas (Lawrence et al., 2001; Mira et al., 2001). Em muitos casos pode resultar em vantagem seletiva contribuindo para o aumento de virulência de um determinado microrganismo (Maurelli et al., 1998). A redução

genômica parece ser a principal força evolucionária que impulsiona bactérias parasitas e/ou intracelulares (Anderson e Anderson, 1999; Klasson e Anderson, 2004).

O rearranjo gênico é considerado uma força diretriz que influencia diretamente a organização do genoma. Suyama e Bork (2001) mostraram que assim como o número de substituições de aminoácidos, o grau de rearranjo gênico também aumenta constantemente ao longo da escala temporal evolucionária. O grau de flexibilidade do genoma depende do conteúdo de seqüências repetidas e móveis como elementos de seqüência de inserção (ISE), transposons conjugativos, plasmídeos e bacteriófagos (Kolsto, 1997).

A diversidade molecular está relacionada diretamente à diversidade ecológica (Prosser et al., 2007) e esse aspecto pode ser interessante para conceituar espécie.

Espécies são mais comumente definidas utilizando o conceito de espécie biológica proposto por Mayr em 1957. Esta é uma definição genética que estabelece que os membros de um grupo de populações que se inter cruzam ou potencialmente inter cruzam uns com os outros sob condições naturais compõe a mesma espécie. Procariotos são microrganismos assexuados, e essa característica destoa com o conceito biológico de espécie.

Um conceito alternativo, em termos de espécie ecológica ou ecotipos, define como espécie um grupo de indivíduos que podem ser considerados idênticos considerando todas as propriedades ecológicas relevantes. As bactérias ocupam nichos discretos e a seleção periódica poderia remover a variação genética dentro de

cada nicho sem, entretanto, interferir na diferença entre os habitantes de diferentes nichos (Cohan, 2002).

Stackebrandt et al. (2002) propuseram a definição de espécie procariota como uma categoria que circunscreve um grupo genomicamente coerente de linhagens ou isolados individuais com um alto grau de similaridade em características independentes, quando comparativamente testadas sob condições padronizadas.

A dificuldade em se estabelecer uma definição apropriada para espécie bacteriana tem inclinado os taxonomistas a adotarem um conceito mais natural de espécie, proposto por Ward (1998). Segundo ele, a diversidade deve ser estudada no ambiente natural em que ela se manifesta, baseada no princípio de que padrões ecológicos e evolucionários governam a produção de biodiversidade entre todos os organismos, inclusive os procariotos.

Woese et al. (1985) mostraram que as relações filogenéticas de bactérias e das demais formas de vida existentes poderiam ser determinadas comparando uma região estável do código genético. Diferentes moléculas alvo incluindo genes que codificam rRNA 16S, são utilizadas em estudo de taxonomia e filogenia molecular (Takahashi et al., 1999; Clarridge, 2004). O gene que codifica o rRNA 16S tem sido usado em estudos sobre taxonomia e relações filogenéticas em bactérias (Clarridge, 2004; Janda e Abbott, 2007).

Devido à sua importância como componente crítico de função celular, esse gene manteve-se altamente conservado ao longo da sua história evolutiva e é considerado uma excelente ferramenta para estudos nessa área. Os genes codificadores de RNA ribossomais

como o 16S, são usados em estudo de diversidade por se apresentarem estáveis e por sofrerem pouca influência de transferências horizontais (Young, 2000).

Mutações em genes codificadores de enzimas que participam de vias metabólicas podem ser toleradas mais frequentemente, pois não afetam estruturas essenciais como o rRNA. Embora as taxas de mudança nas sequências gênicas de rRNA 16S ainda não sejam bem conhecidas (Van Berkun et al., 2000) sugerem que a história evolutiva do gene do rRNA 16S aproxima-se da história evolutiva do genoma total, sendo possível estabelecer relações filogenéticas entre bactérias analisando as diferenças nas sequências desse gene.

A informação contida nas sequências gênicas oferece mais detalhes e profundidade, sobre as relações filogenéticas e classificação de microrganismos quando comparada à informação fenotípica. Além disso, é mais pronta, confiável e precisamente interpretada (Woese, 1987).

As características moleculares, como a composição básica de um gene, são precisamente definidas enquanto características fenotípicas sofrem mudanças contínuas. Muitas mudanças genotípicas diferentes podem produzir fenótipos similares, resultando na dificuldade de identificar características similares de dois organismos como homólogas ou análogas (Olsen e Woese, 1993).

A razão pela qual o rRNA é uma medida útil para distinguir entre espécies dentro do mesmo gênero ou ocasionalmente linhagens dentro da mesma espécie é porque as frequências de mudança da composição em diferentes posições na molécula variam

grandemente, pelo menos em duas ordens de magnitude (Olsen, 1987; Olsen e Woese, 1989).

A avaliação de sequências genômicas completas de organismos intimamente relacionados apresentam uma oportunidade para reconstruir eventos da evolução do genoma. Comparando-se genomas relacionados e inferindo um ancestral é possível identificar eventos tais como rearranjo cromossomal específico, aquisição e deleção de genes, os quais têm conduzido a uma grande diversidade no conteúdo genômico e organizacional. (Snel et al., 2002; Kunin e Ouzounis, 2003; Hong et al., 2004).

2.2. MECANISMOS DE AÇÃO E DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS B-LACTÂMICOS EM BACTÉRIAS

2.2.1. β -lactâmicos

Os β -lactâmicos são uma família de agentes antimicrobianos constituídos de quatro grandes grupos: penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenems. Todos apresentam um anel β -lactâmico que está relacionado à atividade antibiótica. Os grupos diferem uns dos outros pelos anéis adicionais, tiazolidina para penicilinas, núcleo cefem para cefalosporinas, dois anéis para carbapenem e nenhum para monobactâmicos. Os vários antibióticos de cada grupo diferem entre si pela natureza de uma ou duas cadeias laterais (Figura 1) (Samaha-Kfoury e Araj, 2003).

As penicilinas e as cefalosporinas são ambas metabólitos secundários produzidos por fungos. As penicilinas e as cefalosporinas

são produzidas, respectivamente, por *Penicillium crysogenum* e *Acremonium crysogenum*. O antimicrobiano imipenem é um variante da tienamicina, um carbapenem encontrado na natureza e primeiramente isolado da bactéria *Streptomyces cattleya*. Essa droga é administrada em associação com um inibidor de dipeptidase renal, a cilastina, que bloqueia a hidrólise do anel β -lactâmico e aumenta o tempo de vida *in vivo* do carbapenem. Os monobactâmicos e os clavans, representados, respectivamente, por nocardicinas e aztreonans e pelo clavulonato, são variantes de produtos β -lactâmicos naturais, mas não são considerados propriamente antibióticos. Esses compostos apresentam um mecanismo de inativação de enzimas degradadoras de antibióticos, as β -lactamases, aumentando a eficiência da droga administrada (Walsh, 2003).

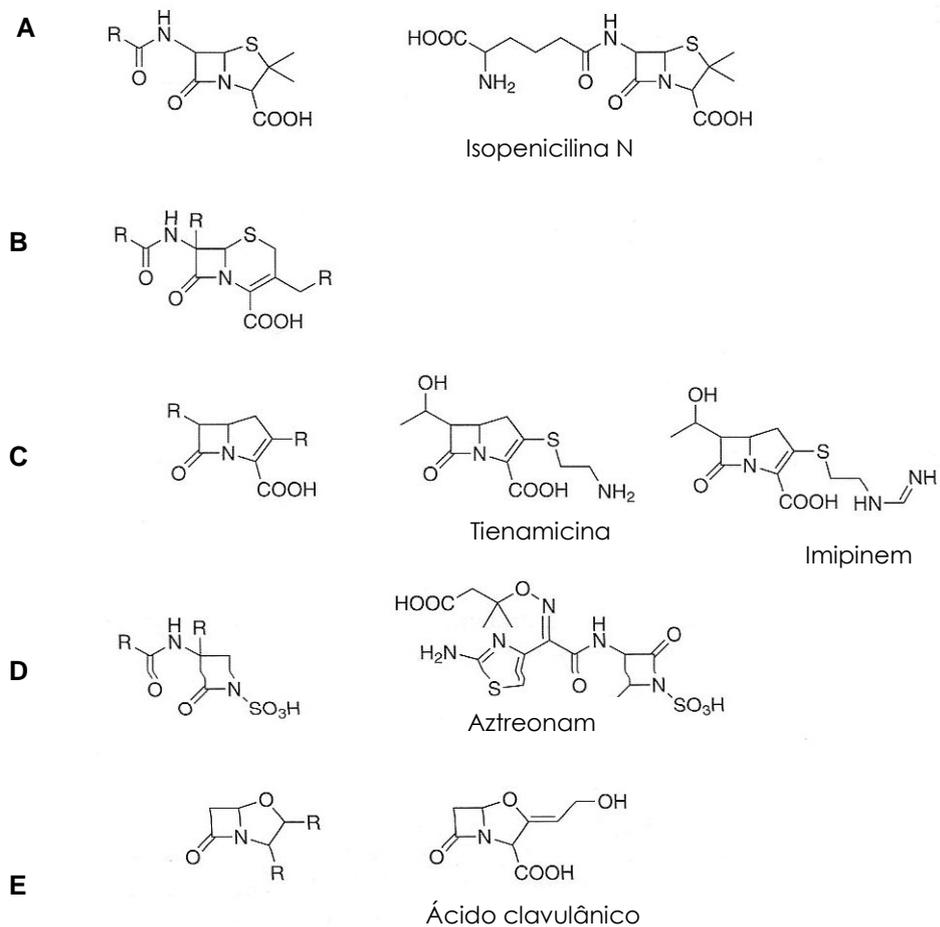


Figura 1 - Estrutura de antibióticos β -lactâmicos. A: penicilinas; B: cefalosporinas; C: carbapenens; D: monobactâmicos; E: clavams. Fonte: Walsh, 2003.

2.2.2. Mecanismo de ação dos β - lactâmicos

Os antibióticos β -lactâmicos apresentam uma alta afinidade pelas transpeptidases, denominadas proteínas ligantes à penicilina ou PBP (Penicilin Binding Proteins), e agem como inibidores dessas enzimas, inativando-as (Figura 2). A alta afinidade dos β -lactâmicos a essas enzimas é devido à uma similaridade estereoquímica dos β -lactâmicos com o substrato d-alanina-d-alanina que compõe o pentapeptídeo presente no polímero que forma parede celular das bactérias. As unidades individuais de peptideoglicanos são produzidas dentro das células e as ligações cruzadas catalizadas pelas transpeptidases ocorrem na face externa da membrana plasmática. Na reação cruzada, uma ligação peptídica é formada entre a penúltima d-alanina em uma cadeia e um grupo terminal amino livre de um ácido diaminopimérico em Gram negativas ou um resíduo de l-lisina em Gram positivas, de uma outra cadeia (Wilke et al, 2005).

Os antibióticos β -lactâmicos impedem a ação das transpeptidases, responsáveis pela formação das ligações cruzadas dos polímeros de peptideoglicanos. Na presença dos β -lactâmicos, as transpeptidases formam um complexo covalente peniciloil-enzima utilizando um resíduo serino no sítio ativo e realiza seu ciclo catalítico de acilação/desacilação. O complexo formado bloqueia a reação normal de transpeptidação e resulta num peptideoglicano frágil, o que pode levar à lise celular e morte da bactéria (Wilke et al, 2005).

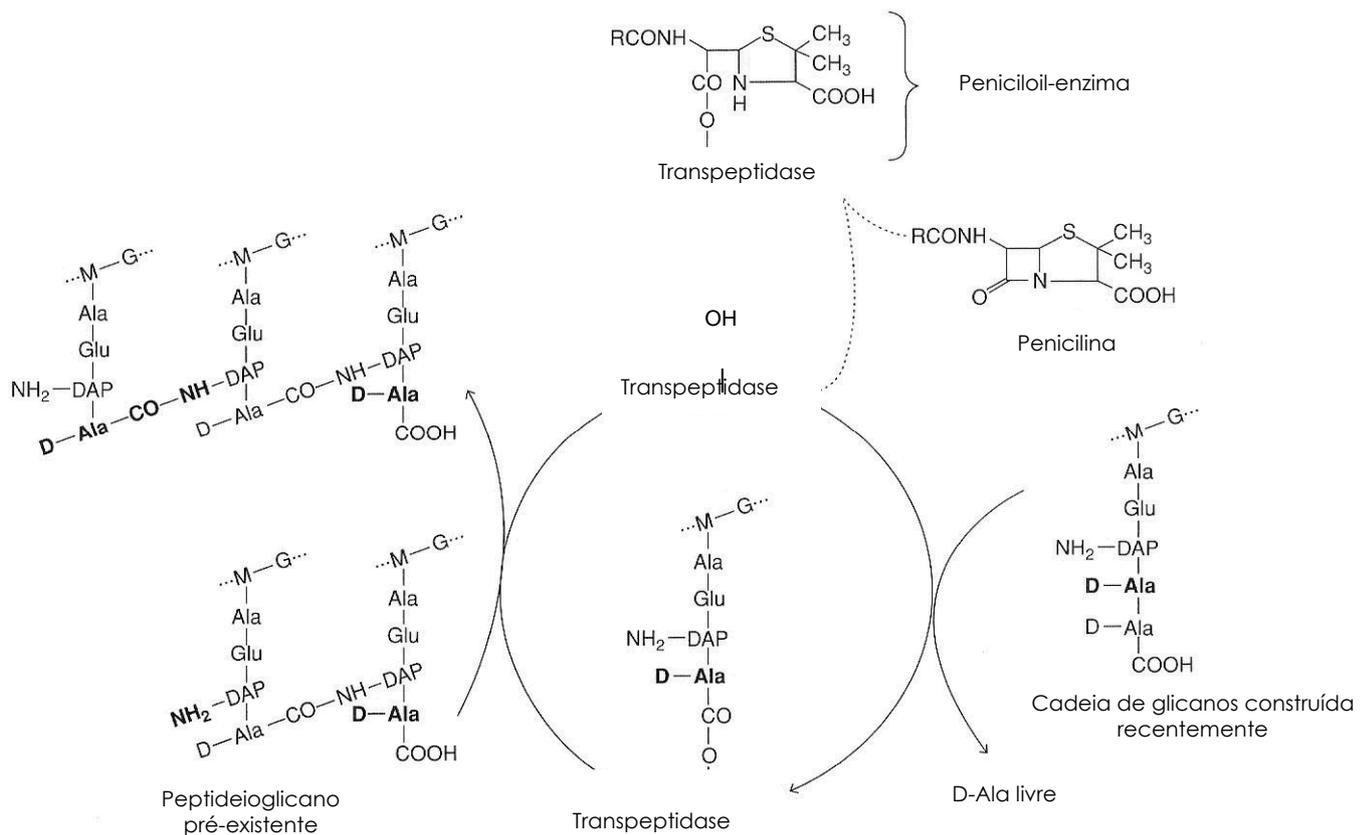


Figura 2. Adição de novo material ao peptidioglicano pré-existente e o mecanismo de ação da penicilina. A cadeia de peptidioglicano construída recentemente, liga-se de forma covalente a uma transpeptidase por uma reação de ligação D-alanil-D-alanina. O novo componente peptidioglicano é transferido para um complexo peptidioglicano pré-existente. A penicilina também produz um complexo covalente com a transpeptidase (penicilil-enzima), mas este complexo é estável e a enzima permanece inativada (setas interrompidas). Fonte: Glazer e Nikaido, 2007.

2.2.3. Mecanismos de resistência de *Staphylococcus aureus* a β -lactâmicos

No início da década de 40, quando a penicilina foi aprovada para uso clínico, menos de 1% de *Staphylococcus aureus* eram resistentes a esse antibiótico. Em 1946, esse valor alcançou 14%, um ano depois, chegou a 38%. Atualmente, mais de 90% dos *S. aureus* isolados são resistentes à penicilina (Lowy, 2003).

A resistência de bactérias a antimicrobianos está associada à capacidade do genoma bacteriano de expressar características adaptativas que vão garantir sua sobrevivência em um ambiente hostil. A resistência aos β -lactâmicos pode advir de modificações do alvo, tornando o antimicrobiano inócuo; de modificações do antimicrobiano por enzimas específicas como, por exemplo, as β -lactamases, que hidrolizam o anel β -lactâmico. O mais importante desses mecanismo é a produção de β -lactamases, as quais hidrolizam o anel beta lactâmico e inativam o antibiótico.

A resistência de estafilococos à penicilina é mediada por *blaZ*, um gene que codifica uma β -lactamase. Esta enzima predominantemente extracelular é sintetizada quando estafilococos são expostos a antibióticos β -lactâmicos (Lowy, 2003).

A resistência dependente de β -lactamases é encontrada frequentemente em mais de 95% dos isolados de estafilococos (Lowy, 1998). Estafilococos de origem bovina produtores de β -lactamases têm sido encontrados. Oliveira et al. (2000) mostraram que dos 811 *S.*

aureus isolados de vacas com mastite, 57% eram produtores de β -lactamases.

A classificação das β -lactamases é baseada nas características bioquímicas, funcionais e moleculares da enzima. Os critérios utilizados para a classificação funcional incluem o substrato antimicrobiano, o perfil de inibição enzimática, a taxa de hidrólise (V_{max}), a afinidade de ligação (K_m), o peso molecular da proteína e a composição de aminoácidos (Bush et al., 1995).

Bush-Jacoby-Medeiros apresentaram em 1995, a última classificação das β -lactamases representada por quatro grupos de 1 a 4 e subgrupos de a a f. No sistema adotado, as enzimas são agrupadas de acordo com o substrato e o perfil de inibição. Os substratos que definem um grupo particular são testados incluindo o painel padrão de β -lactâmicos (benzilpenicilina e cefaloridina) e os inibidores β -lactâmicos (ácido clavulônico, sulbactam e EDTA). No grupo 1 estão presentes β -lactamases (cefalosporinases) codificadas em cromossomos e fracamente inibidas por clavulanato. O grupo 2 é composto por diversas β -lactamases como penicilinas, cefalosporinases, oxacilinas e carbapenemases, são codificadas por plasmídios ou cromossomos e em geral são inibidas por clavulanato. O grupo 3 é representado pelas metaloenzimas e o grupo 4 contém enzimas que não foram bem caracterizadas.

A classificação molecular divide as β -lactamases em quatro classes: A, C e D que apresentam como característica comum os resíduos de serina na sua estrutura e a classe B que é representada

pelas metalo β -lactamases que requerem o íon metálico zinco (Ambler et al., 1980).

As β -lactamases destroem o anel β -lactâmico por dois mecanismos diferentes: o primeiro deles, o mais comum, representado pelas classes A, C e D, baseia-se na ação catalítica de um resíduo de serina ativo presente nas β -lactamases. O resíduo serina reage irreversivelmente com o grupo carbonil do anel β -lactâmico, o que resulta em seu rompimento e inativação (Kotra et al., 2002; Stratton, 2000).

As três classes são similares quanto à forma e todas têm um mecanismo que envolve a criação de um nucleófilo serino pela deprotonação de uma serina no sítio ativo, o ataque nucleofílico do anel β -lactâmico para formar um intermediário acil-enzima e hidrólise do intermediário utilizando uma base geral ativada pela molécula de água. A diferença entre os mecanismos catalíticos das serino β -lactamases situa-se nos resíduos utilizados para acilação e deacilação (Wilke et al., 2005). Estas enzimas são ativas contra muitas penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos (Page, 2002).

Um segundo tipo de β -lactamases, menos comumente encontrado, é denominado grupo B, é constituído pelas metalo β -lactamases, que requerem um íon metálico divalente, muito frequentemente zinco, ligado ao resíduo de histidina ou cisteína ou ambos, para reagir com o grupo carbonil da ligação amida de muitas penicilinas, cefalosporinas e carbapenems mas não dos monobactâmicos (Page, 2002). Existem três subclasses de β -lactamases tipo B. As classes B1 e B3 são aptas a ligar um ou dois íons

de zinco (Heinz et al., 2004), enquanto as enzimas da classe B2 parecem ser mononucleares (Garau et al., 2005). Nas metalo β -lactamases binucleares, os íons zinco estão próximos um do outro e são separados por ligações de hidrogênio que foram propostas como o local do ataque nucleofílico no anel β -lactâmico. As classes B1 e B3 também funcionam como enzimas mononucleares, nos quais um único íon de zinco coordena o hidróxido nucleofílico (Wommer et al., 2002).

A descoberta de que a penicilina era destruída por linhagens de *S. aureus* resistentes à penicilina em meados da década de 1940, foi seguida pela identificação de β -lactamases com alta atividade catalítica contra a penicilina, a PC1. A β -lactamase PC1 utiliza uma serina no sítio ativo para hidrolizar o anel β -lactâmico. A expressão desta β -lactamase não é constitutiva mas induzida e os genes envolvidos na sua síntese estão organizados em "clusters" localizados em plasmídios ou cromossomos. As das classes A, C e D são geralmente localizadas em plasmídios, enquanto as do tipo B, residem tipicamente em cromossomo (Vollandri et al., 1998).

Uma região responsável pela síntese de β -lactamase foi seqüenciada e revelou a presença de três genes: *blaZ*, *blaRI* e *blaI* que codificam a β -lactamase, uma proteína transdutora de sinal e a proteína repressora, respectivamente. A *BlaRI* de *S. aureus* é uma proteína de alto peso molecular que se liga à penicilina e consiste em dois domínios (Ghuysen, 1994). O primeiro é um domínio N-terminal intracelular, com atividade de metaloprotease dependente de zinco, de aproximadamente 38K Da com uma α -hélice atravessando a

membrana quatro vezes, via quatro segmentos transmembrana (TM1, TM2, TM3 e TM4) (Hardt et al., 1997). Os segmentos transmembrana são interconectados por três alças (L1, L2 e L3), onde L1 e L3 são expostas ao citoplasma e L2 é posicionada fora da célula. O segundo domínio C-terminal de aproximadamente 27 KDa consiste de um sensor localizado na superfície da membrana. Os β -lactâmicos no meio extracelular reagem com a serina do sítio ativo do domínio C-terminal da β -lactamase num evento de acilação (Kerff et al., 2003).

O mecanismo de indução das β -lactamases ainda não está muito bem esclarecido. O modelo aceito para síntese de β -lactamases em estafilococos prediz que o gene regulatório *blaR1* codifica uma proteína transmembrana que sinaliza a transcrição de *blaZ* após exposição ao antibiótico. O evento pode ser resumido em quatro etapas que se iniciam com a acilação irreversível concomitante à abertura do anel β -lactâmico. A acilação é o primeiro evento na transdução do sinal (Wilke et al., 2004; Golemi-Kotra et al., 2003). O antibiótico liga-se à parte extracelular (terminal carboxil) de BlaR1 e causa uma mudança conformacional que leva à ativação proteolítica intracelular de BlaR1. O segundo evento na transdução de sinal é uma discreta clivagem proteolítica do domínio intracitoplasmático de BlaR1. A autoclivagem é seguida pela propagação citoplasmática do sinal e posteriormente pela proteólise da proteína repressora dimérica. O repressor Blal após clivado pela protease BlaR1 libera *blaZ* do controle transcricional negativo, permitindo a transcrição de *blaZ* e síntese da β -lactamase (Fuda et al., 2005) (Figura 3).

Devido ao aumento da resistência de *S. aureus* à penicilina, novas drogas foram lançadas no mercado. A meticilina é um exemplo de antibiótico desenvolvido para contornar a crescente resistência de *S. aureus*. Essa droga foi introduzida em 1959 como a primeira penicilina semi-sintética resistente à penicilinase (Fuda et al., 2005).

Em 1961 foi divulgado o primeiro caso de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA). Na década de 80, as linhagens resistentes já haviam disseminado para diferentes países (Fuda et al., 2005).

A emergência e a disseminação de MRSA têm se tornado mais abrangentes. Inicialmente, MRSA era isolada somente em ambiente hospitalar; hoje, porém, existem vários relatos de casos de MRSA adquirida na comunidade (CA-MRSA). A exata prevalência de CA-MRSA é difícil de ser determinada, mas parece aumentar, particularmente, em crianças (Buescher, 2005). Embora sejam mais sensíveis a outros agentes antimicrobianos que MRSA adquiridos em ambiente hospitalar (HA-MRSA), as linhagens adquiridas na comunidade são mais virulentas que *S. aureus* sensíveis a meticilina (MSSA), podendo provocar pneumonia necrosante e sepse grave em crianças (Ellis et al., 2004).

Isolados CA-MRSA têm se tornado muito comum e esse fato pode estar relacionado à colonização e infecção de animais por MRSA. Vários autores têm estudado a transmissão de MRSA entre humanos e animais, sugerindo que animais podem ser potenciais reservatórios dessa linhagem (Weese et al., 2006a).

Nos últimos anos, a resistência antimicrobiana de origem animal e seu impacto na saúde humana tem sido alvo de vários estudos

(Threlfall, 2002; Guardabassi et al., 2004; Phillips et al., 2004; Van Duijkeren et al., 2004; Smith et al., 2005; Arestrup et al., 2006; Wesse et al., 2006b; Li et al., 2007).

O aparecimento de MRSA se deve à aquisição do gene *mecA* que codifica uma enzima denominada PBP2a (penicillin binding protein). As PBPs são peptidases associadas à membrana com atividade bioquímica semelhante às serino proteases que são responsáveis pela reação de transpeptidação necessária à formação da ligação cruzada entre as cadeias de peptideoglicano. As PBP2a substituem-nas e devido à baixa afinidade pelos β -lactâmicos, estafilococos conseguem sobreviver a altas concentrações desses antibióticos (Chambers, 1997). Assim, a resistência à meticilina estende-se a todos os agentes β -lactâmicos.

A regulação do gene *mecA* está sob influência de dois outros genes, o *mecI* e *mecR1*, e ocorre por um mecanismo semelhante ao *blaZ*. O domínio externo de MecR1 é também uma PBP que ao se ligar de forma covalente ao β -lactâmico inicia uma sinalização transmembrana em cascata que se inicia com a proteólise do domínio citoplasmático de MecR1 e finaliza com a clivagem de MecI e liberação da repressão que este exerce sobre o gene *mecA*. O produto do gene *mecA*, PBP2a, apresenta uma baixa afinidade pela meticilina e outros β -lactâmicos, bloqueando a ação do antimicrobiano (Walsh, 2003).

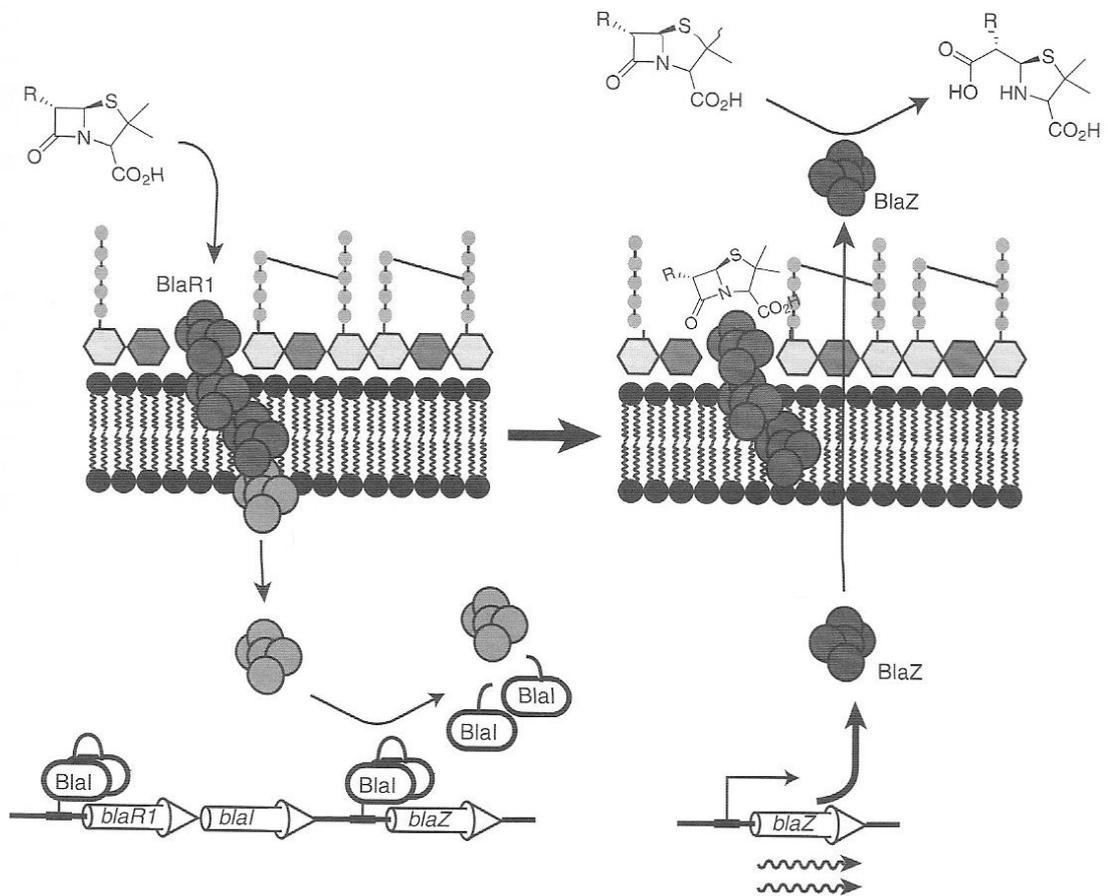


Figura 3. Operon *blaR1-blaI-blaZ* e a via de transdução de sinal para expressão de β -lactamase em *S. aureus*. O antibiótico liga-se à parte extracelular de BlaRI e causa uma mudança conformacional que ativa a atividade proteolítica intracelular de BlaRI. O repressor Blal após clivado pela protease BlaRI libera *blaZ* do controle transcripcional negativo, permitindo a transcrição de *blaZ* e síntese da β -lactamase que inativa o β -lactâmico. Fonte: Walsh, 2003.

2.3. MECANISMOS DE AÇÃO E DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS MACROLÍDEOS EM BACTÉRIAS

2.3.1. Macrolídeos

Os macrolídeos foram originalmente isolados de *Streptomyces* e constituem uma classe de antibióticos que apresentam na sua estrutura um anel lactona de 14, 15 ou 16 átomos carregando um ou mais resíduos de açúcares e substituições adicionais ligadas a vários átomos do anel lactona (Gaynor e Mankin, 2005).

Embora eficiente no tratamento de infecções graves, a eritromicina, um macrolídeo, apresentava instabilidade em meio ácido. Esse fato contribuiu para a busca de macrolídeos com melhores propriedades farmacocinéticas. O resultado foi a produção de macrolídeos de segunda geração, com maior tolerância à acidez e maior espectro de ação. Os macrolídeos com 14 átomos, como claritromicina e roxitromicina e com 15 átomos como azitromicina, são os representantes desta categoria. Em razão da crescente resistência de bactérias aos macrolídeos, novas pesquisas resultaram em macrolídeos de 16 átomos que incluem três representantes, carbomicina, espiromicina e tilosina. A nova geração de macrolídeos é representada pelos cetolídeos (Figura 4) utilizados no tratamento de infecções ocasionadas por linhagens resistentes (Gaynor e Mankin, 2005). A eritromicina A, descoberta em 1950, foi o primeiro macrolídeo utilizado clinicamente no tratamento de infecções causadas por várias espécies Gram positivas, cujo tratamento com penicilina era

ineficiente ou em casos de intolerância a β -lactâmicos (Retsema e Fu, 2001). Contudo, a resistência de vários patógenos à eritromicina tem se disseminado rapidamente. Em 1953, já haviam sido descritos casos de resistência de *Staphylococcus* à eritromicina nos Estados Unidos, Europa e Japão (Roberts et al., 1999).

2.3.2. Mecanismo de ação dos macrolídeos

Os macrolídeos estão entre os agentes antibacterianos que inibem a síntese de proteínas, entretanto detalhes desse mecanismo ainda são pouco compreendidos.

O mecanismo de ação dos macrolídeos na inibição da síntese de proteínas está associado com as características químicas e estruturais do antimicrobiano. Quatro mecanismos de inibição da síntese de proteínas pelos macrolídeos são descritos. O primeiro mecanismo descrito por Mao e Robishaw (1972) e Vasquez (1975) descreve a inibição da síntese de proteínas devido à interrupção da cadeia peptídica nascente durante as primeiras etapas da tradução. No segundo mecanismo ocorre uma inibição da formação da cadeia peptídica (Mao e Robishaw, 1972). Os dois últimos mecanismos revelam uma dissociação do peptidil-tRNA com o ribossomo durante a translocação (Menninger e Otto, 1982) e interferência na montagem da subunidade 50S (Champney e Burdine, 1995).

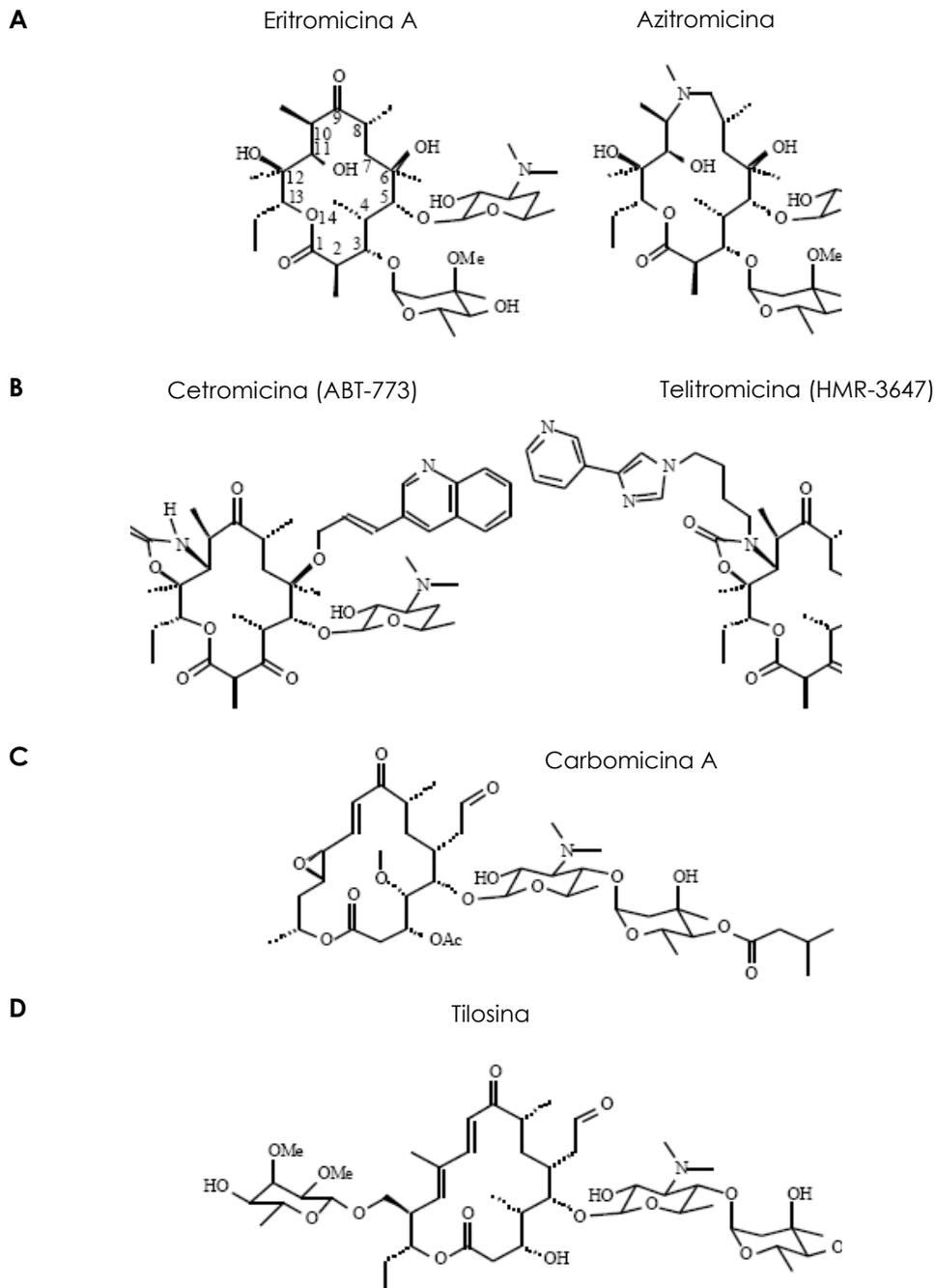


Figura 4- Estrutura química de alguns macrolídeos. A: Macrolídeos da primeira geração (eritromicina) e segunda geração (azitromicina); B: Macrolídeos da terceira geração (cetolídeos); C e D: Macrolídeos com 16 átomos. Fonte: Gaynor e Mankin, 2005.

O macrolídeo se liga ao sítio localizado na subunidade maior do ribossomo, na parte interna do túnel de saída do peptídeo nascente. Esta proximidade ao centro da peptidiltransferase explica o efeito inibitório de alguns macrolídeos na formação peptídica. O resíduo de açúcar da posição C5 do anel lactona forma uma protuberância no centro da peptidil transferase. É o que acontece, por exemplo, com o dissacarídeo micaminose-micarose da cadeia lateral do anel da filossina, espiramicina e carbomicina A. A protuberância formada pelo açúcar ocupa um espaço tal que interfere na formação da cadeia peptídica (Hansen et al., 2002; Poulsen et al., 2000). Os resíduos monossacarídicos dos macrolídeos de 14 átomos são mais curtos e não alcançam o sítio peptidil transferase. Esse fato explica a ausência de efeito inibitório deste tipo de macrolídeos na reação de transpeptidação (Vasquez, 1975).

O segundo mecanismo de ação dos macrolídeos na inibição da síntese de proteínas ocorre quando a cadeia peptídica nascente torna-se grande o suficiente para atingir a região estreita do túnel formado pelas proteínas L4 e L22, que estão localizadas a uma curta distância do sítio da peptidiltransferase. Os macrolídeos cujos anéis apresentam 14 ou 15 átomos estão relacionados a esse tipo de inibição. Inicialmente, o tamanho da cadeia peptídica em formação não é suficiente para promover o bloqueio da síntese, entretanto, à medida que essa cadeia se alonga, ela alcança a região constricta do túnel a progressão é bloqueada (Schlunzen et al., 2001; Hansen et al., 2002).

O terceiro mecanismo de ação dos macrolídeos, consiste na dissociação do peptidil-tRNA do ribossomo, e é o resultado da interrupção da cadeia peptídica nascente. Na presença de doses efetivas de eritromicina, carbomicina e espiramicina não são formados ligações peptídicas e a translocação não ocorre. Além disso, uma dissociação freqüente do peptidil-tRNA dos ribossomos reduz a síntese de proteínas úteis a níveis inibitórios de crescimento (Menninger e Otto, 1982).

O último modelo proposto para inibição da síntese de proteínas pelos macrolídeos está associado à montagem do ribossomo. O modelo prediz que a ligação dos macrolídeos às subunidades precursoras pode impedir o rearranjo conformacional específico e ou a ligação de proteínas necessárias para a montagem completa do ribossomo (Champney e Tober, 1998).

2.3.3. Mecanismos de resistência de *Staphylococcus aureus* aos macrolídeos

A tilosina é um dos antibióticos da classe dos macrolídeos utilizados no tratamento da mastite subclínica em vacas no período seco. Dados da literatura têm mostrado um aumento dos valores de CIM e resistência de *S. aureus* ao tratamento (Tikofsky et al., 2004). Yoshimura et al., (2002) apresentaram valores de CIM de 1,56 µg/ml para tilosina no tratamento de infecção provocada por *S. aureus*. A tilosina também tem sido amplamente utilizada como aditivo alimentar para promover o crescimento de suínos ou como agente

antimicrobiano no tratamento de doenças respiratórias e disenteria em aves, suínos e bovinos (Liu e Douthwaite, 2002). Outras infecções provocadas por agentes relacionados à mastite, como espécies de *Streptococcus*, têm sido controladas com o uso de tilosina. Tikofsky et al., (2004) relataram a diminuição na susceptibilidade de estreptococos ambientais a compostos MLS (macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas) e Schaberg et al. (1982) descreveram a transferência, pela mobilização de um plasmídeo não-conjugativo e por conjugação, de genes que conferem resistência aos MLSs de *Streptococcus faecalis* para *S. aureus*. Estes mecanismos envolvendo a participação de plasmídios interespecíficos podem ter acelerado o desenvolvimento de resistência em estafilococos.

Os dois mecanismos mais comuns de resistência aos macrolídeos são a modificação do sítio na célula devido à modificação pós-transcricional do rRNA 23S ou por mutação nos genes do rRNA 23S ou de proteínas ribossomais e o efluxo da droga para o meio externo à célula através de bombas de efluxo (Gaynor e Mankin, 2005).

O primeiro mecanismo de resistência aos macrolídeos descrito é uma modificação pós-transcricional do rRNA 23S por uma adenina N⁶-metiltransferase. A modificação altera o sítio do rRNA 23S que é o alvo dos antibióticos MLS. O mecanismo mais freqüente, é portanto, a modificação do sítio ribossomal que confere resistência cruzada aos antibióticos MLS. Em geral, os genes que codificam essas metiltransferase são designados como *erm* (erythromycin ribosome

methylation). A expressão de resistência a MLS pode ser constitutiva ou induzida (Fuit et al., 2001).

A expressão induzida do gene *ermC* é regulada por um grampo em região cromossômica anterior ao gene e que bloqueia a iniciação no códon iniciador (Leclercq e Courvallin, 1991; Weisblum, 1995). Os macrolídeos de 14 e 15 átomos são capazes de induzir a expressão do gene *ermC*, enquanto os de 16 átomos não podem fazê-lo (Lodder et al., 1997). A expressão constitutiva depende de uma deleção de 16 a 116 pares de bases na região regulatória. Quando a deleção ocorre a resistência a macrolídeos de 16 átomos, como por exemplo a tilosina, que antes era inexistente, pode ser expressa de forma constitutiva (Werckenthin et al., 1999).

O primeiro mecanismo de resistência aos macrolídeos descrito para *S. aureus*, ainda o mais frequentemente observado, é uma modificação do sítio de ligação da droga pela dimetilação do nucleotídeo A2058. A modificação é dada por uma adenina -N⁶-metiltransferase que altera o sítio do rRNA 23S, o alvo dos antibióticos macrolídeos, lincosamidas e estreptogramina B (MLS). A dimetilação do nucleotídeo A2058 diminui bastante a afinidade destes três antibióticos ao sítio ribossomal (Schlunzen et al., 2001).

Os genes que codificam as metilases são designados como *erm* (erythromycin ribosome methylation) e são encontrados em espécies de *Streptomyces* produtoras de macrolídeos que possivelmente disseminaram a outras bactérias por uma transferência horizontal (Cundliffe, 1989). Entre os genes *erm*, o mais encontrado em *S. aureus*

é o *ermC* (Robert set al., 1999) e sua expressão pode ser induzível ou constitutiva.

Nos casos de resistência induzida, a produção de metiltransferase é ativada somente quando células são expostas à droga. A bactéria parece evitar a metilação desnecessária do nucleotídeo. Esse mecanismo é acionado em situações em que a enzima torna-se essencial à sua sobrevivência (Giovnetti et al., 1999). A expressão constitutiva do gene *ermC* confere resistência a todos os tipos de macrolídeos (Jensen e Aarestrup, 2005).

O segundo mecanismo de resistência a macrolídeos com base na modificação do sítio alvo é decorrente de alterações das proteínas ribossomais L4 ou L22. As proteínas mutantes exibem uma abertura mais ampla do túnel de saída dos peptídeos nascentes de forma que estes podem deslizar pelo macrolídeo e possivelmente removê-los (Gabashvili et al., 2001). Mutações nos genes que codificam proteínas ribossomais são uma causa freqüente de resistência aos macrolídeos porque um único evento mutacional é suficiente para tornar as células resistentes à droga (Tait-Kamradt et al., 2000).

As mutações em genes que expressam proteínas ribossomais ou em genes que codificam o rRNA também são responsáveis pelo aumento da resistência aos macrolídeos. O primeiro mecanismo é o mais comum e esse fato se justifica pelo número de cópias do gene de rRNA que são produzidas. O gene modificado é normalmente transcrito em menor quantidade que os genes que não apresentaram mutações. Esse mecanismo de resistência é verificado em

microrganismos que têm poucas cópias de rRNA (Veter e Douthwaite, 2001).

A resistência de estafilococos aos macrolídeos mediada por efluxo tem sido descrita desde 1980. Em 1986, foi descrita a resistência de *S. epidermidis* a macrolídeos de 14 e 15 átomos, expressa constitutivamente. A resistência foi atribuída a uma proteína que conferia permeabilidade a eritromicina e que não estava presente em linhagens sensíveis a macrolídeos (Lampson et al., 1986). Entretanto, o mecanismo de efluxo mais frequentemente observado em estafilococos coagulase negativos é codificado pelo gene *msrA* que confere resistência a macrolídeos de 14 e 15 átomos e a estreptogramina B, mas não a lincosamida (fenótipo MS) (Ross et al., 1989; Ross et al., 1990) . Em 1990, novos estudos mostraram que *S. aureus* também apresentava o fenótipo MS e presença do gene *msrA* codificando uma proteína idêntica à descrita para *S. epidermidis* (Janosi et al., 1990).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Estudar a diversidade genética entre linhagens de *S. aureus* de diferentes casos de mastite bovina e os seus principais modelos de resistência à penicilina, oxacilina, ampicilina e tilosina.

3.2. Objetivos Específicos

3.2.1. Avaliar a diversidade genética entre linhagens de *S. aureus* oriundos de diferentes casos de mastite bovina ocorridos na Zona da Mata Mineira a partir de seqüências do gene de rRNA 16S.

3.2.2. Avaliar o perfil de resistência à penicilina, oxacilina, ampicilina e tilosina de *S. aureus* isolados de vacas com mastite clínica, subclínica e crônica.

3.2.3. Verificar a presença de *blaZ*, *mecA* e *ermC* em *S. aureus* isolados de vacas com mastite clínica, subclínica e crônica.

3.2.4. Estabelecer comparações entre o fenótipo e genótipo dos isolados de *S. aureus* provenientes de diferentes casos de mastite bovina.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Origem dos isolados

Neste trabalho foram utilizados 31 isolados de *S. aureus*, pertencentes a uma coleção da EMBRAPA-Gado de Leite-Juiz de Fora/MG. Trinta desses isolados foram obtidos de rebanhos leiteiros com diferentes quadros de mastite, distribuídos na Zona da Mata de Minas Gerais, e um proveniente do Estado do Rio de Janeiro (Quadro 1). Os isolados foram gentilmente cedidos pela Doutora Maria Aparecida Vasconcelos Paiva e Brito e seus modelos de resistência já haviam sido estabelecidos (Brito et al. 2001).

Quadro 1. Isolados de *S. aureus* pertencentes à coleção de culturas da EMBRAPA- Juiz de Fora.

Isolado	Município
41/C	Juiz de Fora, MG
75/C	Juiz de Fora, MG
216/C	Juiz de Fora, MG
218/C	Juiz de Fora, MG
226/C	Juiz de Fora, MG
230/C	Juiz de Fora, MG
284/C	Belmiro Braga, MG
287/C	Belmiro Braga, MG
1440/C	Paty do Alferes, RJ
2551/C	Belmiro Braga, MG
2555/C	Belmiro Braga, MG
806/SN	Santos Dumont, MG
2221/SN	Pequeri, MG
2238/SN	Leopoldina, MG
2252/SN	Leopoldina, MG
2623/SN	Coronel Pacheco, MG
701/SP	Tabuleiro, MG
707/SP	Tabuleiro, MG
795/SP	Santos Dumont, MG
1621/SP	Ibertioga, MG
2309/SP	Argirita, MG
2314/SP	Argirita, MG
2722/SP	São Pedro dos Ferros, MG
2724/SP	São Pedro dos Ferros, MG
2727/SP	São Pedro dos Ferros, MG
258/R	Coronel Pacheco, MG
2413/R	Coronel Pacheco, MG
2389/R	Coronel Pacheco, MG
2633/R	Coronel Pacheco, MG
247/R	Coronel Pacheco, MG
347/R	Coronel Pacheco, MG

Fonte: EMBRAPA-Juiz de Fora (2002). C= Isolados de casos clínicos; SN= isolados de infecção subclínica com CMT negativo; SP= isolados de infecção subclínica com CMT positivo; R= Isolados de casos crônicos de mastite.

4.2. Extração de DNA e amplificação do gene de rRNA 16S

Os isolados foram cultivados por 24 horas a 37°C em Ágar Nutriente. e, em seguida, uma colônia de cada isolado foi transferida para 50 ml de Caldo Nutriente. As culturas foram incubadas a 37°C, por aproximadamente, 14 horas, para posteriormente, proceder a extração do DNA (Sambrook et al., 1989).

Um fragmento de aproximadamente, 1383 pb foi amplificado por PCR em termociclador (Techne TC – 512), utilizando-se como oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) sequências nucleotídicas para o gene do rRNA 16S. A reação de amplificação foi preparada em uma mistura de 25 µl, contendo 1 µl de cada primer, 5 µl de DNA e 0,5 U de Taq DNA polimerase (Promega), em condições recomendadas pelo fabricante. Reações que não continham DNA foram feitas como controle negativo. A linhagem *S. aureus* ATCC 33591 foi utilizada como controle positivo. O programa utilizado para a amplificação do gene do rRNA 16S consistia de uma etapa de desnaturação a 94 °C por 1 minuto seguida de 40 ciclos de 1 minuto a 94 °C para desnaturação; pareamento durante 1 minuto a 55 °C e extensão de 2 minutos a 72 °C. Ao final de 40 ciclos foi realizada uma extensão final durante 10 minutos a 72 °C. Após a reação de PCR, volumes de 10 µl da mistura foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,0 % para detecção dos amplicons do gene rRNA 16S.

4.3. Resistência dos isolados a β -lactâmicos e macrolídeos

A caracterização da resistência dos isolados foi feita pela determinação da concentração inibitória mínima (CIM), utilizando o método da diluição em meio líquido (Moreira et al., 2005) dos antibióticos ampicilina (Sigma), penicilina (Fluka - Biochemika), oxacilina (Fluka - Biochemika) e tilosina (Sigma).

As culturas bacterianas conservadas a -80°C , em Caldo Nutriente com 20% de glicerol, foram reativadas em Caldo Nutriente e incubadas a 37°C , por aproximadamente, 14 horas. Ao atingirem a densidade óptica (D.O) líquida de 0,4 em comprimento de onda de 560 nm, cujo valor corresponde, aproximadamente, a concentração de 10^8 UFC/ml, as culturas foram diluídas em Caldo Nutriente, até 10^5 UFC/ml. Em seguida, 230 μl de cada cultura diluída foram adicionados à placa de microtitulação (Nunc-Immuno™ plates, Dinamarca), com os compartimentos preenchidos previamente com 70 μl do antimicrobiano em um total de 300 μl de cultura por compartimento da placa. Para penicilina e ampicilina foram utilizadas concentrações entre 1,125 $\mu\text{g/ml}$ e 4 $\mu\text{g/ml}$; para oxacilina foram utilizadas as concentrações de 2 $\mu\text{g/ml}$ a 4 $\mu\text{g/ml}$ e para tilosina as concentrações variaram de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ a 4 $\mu\text{g/ml}$. Esse procedimento foi realizado em triplicata com duas repetições e com os devidos controles.

Os antimicrobianos ampicilina, penicilina, oxacilina e tilosina foram diluídos em água e filtrados em membrana com poro de 0,22 µm de diâmetro (Schleicher e Schuell, Alemanha).

A curva de crescimento dos isolados foi monitorada em aparelho leitor de ELIZA (Enzyne –linked ImmunoSorbent Assay) (Titertek Multiskan®, Plus-MkII). Foram realizadas oito leituras com intervalos de duas horas. A curva de crescimento foi construída com o programa Sigma Plot 10, utilizando-se a média aritmética das triplicatas. A CIM foi definida arbitrariamente como o menor valor da concentração da droga que impedia o crescimento bacteriano até duas horas após o tempo correspondente ao início da fase estacionária da cultura controle, isto é, da bactéria cultivada em Caldo Nutriente sem antimicrobiano (Moreira et al., 2005).

4.4. Detecção da presença dos genes *blaZ*, *mecA* e *ermC*

Os isolados foram cultivados por 24 horas a 37°C em Ágar Nutriente acrescido do antimicrobiano em questão, em concentração correspondente a 50% da CIM. Em seguida, uma colônia de cada isolado foi transferida para 50 ml de Caldo Nutriente acrescido de antimicrobiano na mesma concentração. As culturas foram incubadas a 37 °C, por aproximadamente, 14 horas, para posteriormente proceder a extração do DNA total (Sambrook et al., 1989).

Fragmentos de aproximadamente 517 pb, 314 pb e 299 pb foram amplificados por PCR (Haveri et al., 2005; Ardic et al., 2006; Ardic et al., 2005) em termociclador (Techne TC – 512), utilizando-se como

primers sequências nucleotídicas para os genes *blaZ*, *mecA* e *ermC*, respectivamente (Quadro 2). A reação de amplificação foi preparada em uma mistura de 25 µl, contendo 0,5U de Taq DNA polimerase (Promega), em condições recomendadas pelo fabricante. Reações que não continham DNA foram feitas como controle negativo. A linhagem *S. aureus* ATCC 33591 foi utilizada como controle positivo para os genes *mecA* e *blaZ*. O programa utilizado para a amplificação do gene *mecA* consistia de uma etapa de desnaturação a 95 °C por 2 minutos seguida de 30 ciclos de 2 minutos a 95°C para desnaturação; anelamento durante 1 minuto a 54 °C e extensão de 1 minuto a 72 °C. Para finalizar realizava-se uma extensão final durante 7 minutos a 72 °C. Para o gene *blaZ*, a amplificação foi conduzida nas seguintes condições: desnaturação inicial por 5 minutos a 94 °C seguida por 35 ciclos de desnaturação de 30 segundos a 94° C; anelamento durante 30 segundos a 55° C e extensão de 30 segundos a 72° C. Por último, realizava-se uma extensão final durante 10 minutos a 72° C. O programa utilizado para a amplificação do gene *ermC* consistia de uma etapa de desnaturação a 95°C por 3 minutos seguida por 30 ciclos de 30 segundos a 95 °C para desnaturação; anelamento durante 30 segundos a 54 °C e extensão de 30 segundos a 72 °C. Para finalizar realizava-se uma extensão final durante 4 minutos a 72 °C. Após a reação de PCR, 10µl da mistura foram submetidos à eletroforese em gel de 2,5% para detecção dos amplicons dos genes *mecA* e *ermC* e em gel de 1,5% de agarose para detecção dos amplicons do gene *blaZ*.

Quadro 2. Oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) usados para a amplificação de segmentos dos genes *mecA*, *blaZ*, *ermC* de *S. aureus*.

Gene	Seqüências (5'-3')	Comprimento esperado do amplicon (pares de bases)	Referência
<i>blaZ</i>	AAGAGATTGCCTATTC GCTTGACCACTTTATCAGC	517	Haveri et al., 2005
<i>mecA</i>	CCTAGTAAAGCTCCGGAA CTAGTCCATTCGGTCCA	314	Ardic et al., 2006
<i>ermC</i>	AATCGTCAATTCCTGCATGT TAATCGTGGAATACGGGTTTG	299	Ardic et al., 2005

4.5. Sequenciamento e análise filogenética

Os amplicons obtidos foram purificados utilizando-se o Kit Exo SAP – IT® (USB Corporation) e seqüenciados utilizando-se o sequenciador MegaBace 500 (Amersham Pharmacia Biotech). As seqüências de DNA resultantes foram comparadas com as seqüências de *S. aureus* COL, MW2, pSAS, N315, USA 300, MRSA 252, plasmídio pES5, provenientes de casos clínicos humano. Todas as seqüências estavam depositadas no GeneBank e foram utilizadas para comparação, empregando-se o programa BlastX (Basic Local Alignment Search Tool) na página do National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

As árvores filogenéticas foram reconstruídas pelo método da Máxima Parcimônia, utilizando o método de dois parâmetros de Kimura, com auxílio do programa MEGA 4,0 (Tamura et al., 2007).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Relações filogenéticas de *S. aureus* isolados de gado de leite com mastite crônica, clínica e subclínica

A figura 5 mostra a topologia da árvore filogenética reconstruída com sequências do gene de rRNA 16S dos 9 isolados de *S. aureus* de gado com mastite subclínica positiva (SP) e subclínica negativa (SN).

A mastite subclínica é assim chamada por sua natureza inaparente, ou seja, ausência de sinais clínicos externos que possam diferenciar o animal afetado pela mastite clínica. Embora o animal com mastite subclínica não apresente sinais clínicos da doença, ocorre perda da produção leiteira (Costa, 1998). Esta doença é de longa duração e pode afetar a vaca durante toda sua vida produtiva, caso não sejam tomadas medidas necessárias (Júnior et al., 2005).

Os isolados de *S. aureus* selecionados para este estudo constituem objeto de interesse uma vez que são provenientes de vacas com mastite, uma das mais importantes enfermidades do gado

leiteiro. Esse fato revela a necessidade de pesquisas sobre a diversidade de *S. aureus* envolvidos em casos dessa doença.

Para a análise de diversidade, sequências de rRNA 16S de 20 isolados foram obtidas, alinhadas e comparadas com outras duas obtidas no GenBank (*S. aureus* COL e MW2), originárias de pacientes humanos dos Estados Unidos.

Os isolados de mastite clínica foram agrupados em dois grupos distintos (Figura 5). O primeiro grupo é constituído por isolados de mastite subclínica positiva (2722/SP, 2724/SP, 701/SP, 2309/SP, e 2314/SP) e negativa (2221/SN e 2238/SN), sendo a maioria proveniente de diferentes municípios. A relação filogenética entre todos os isolados desse grupo parece não estar bem definida, mesmo naqueles provenientes do mesmo município e rebanho (isolados 2722/SP e 2724/SP; isolados 2309/SP e 2314/SP).

No segundo grupo foram incluídos os isolados 806/SN e 2727/SP que, embora pertencentes a rebanho de diferentes municípios e com diferentes escores no CMT, apresentam grande proximidade genética, conforme mostrado pelo tamanho do ramo e confirmada pelos altos valores de *bootstrap*. Esses resultados podem indicar a disseminação de um mesmo clone de *S. aureus* para diferentes regiões geográficas.

Alguns estudos sobre biogeografia microbiana têm revelado que a endemidade ocorre em microrganismos de vida livre, entretanto, fortes forças contrárias como dispersão e influxo constante podem anular esse processo (Sogin et al., 2006). Endemidade pode significar a extinção local do microrganismo em ambientes adversos. A capacidade de dispersão aumenta com o tamanho do organismo,

portanto, pequenos organismos têm uma pequena capacidade de dispersão e disseminação por propulsão ativa, entretanto, esse fato não previne sua dispersão sobre grandes distâncias. Microrganismos que habitam a região mais profunda do solo, sedimentos e regiões subsuperficiais apresentam uma dispersão menor que aqueles presentes em água ou regiões mais superficiais do solo (Martiny et al., 2006).

Outro dado importante sobre os isolados 806/SN e 2727/SP é a respeito da sua proximidade com o *S. aureus* COL isolado de caso clínico humano. Os demais isolados apresentados na Figura 5 mostram um distanciamento evolutivo entre *S. aureus* COL e os isolados 806/SN e 2727/SP.

Sung et al., 2008 mostraram que a maioria de *S. aureus* isolados de hospedeiros animais agrupavam-se entre si ou com linhagens predominantemente isoladas de animais. Entretanto, 12 das linhagens relacionadas aos casos de mastite bovina consistiam de linhagens causadoras de infecções em humanos. Esse fato é contrário à idéia de que somente isolados de *S. aureus* provenientes de animais causam doenças em animais.

O contato de profissionais com animais infectados pode refletir a oportunidade de disseminação e infecção provocadas por *S. aureus*. Aspectos relacionados a transmissão de *S. aureus* de animais para humanos são de fundamental importância porque essas linhagens tem se tornado mais virulentas e resistentes (Gopal Rao et al., 2007). O tratamento de infecções causadas por *S. aureus*, muitas vezes requer um tratamento complexo devido à multiresistência desse

agente. O resultado pode ser o aumento do risco potencial para pacientes imunocomprometidos (Loeffler et al., 2005; Weese et al., 2005).

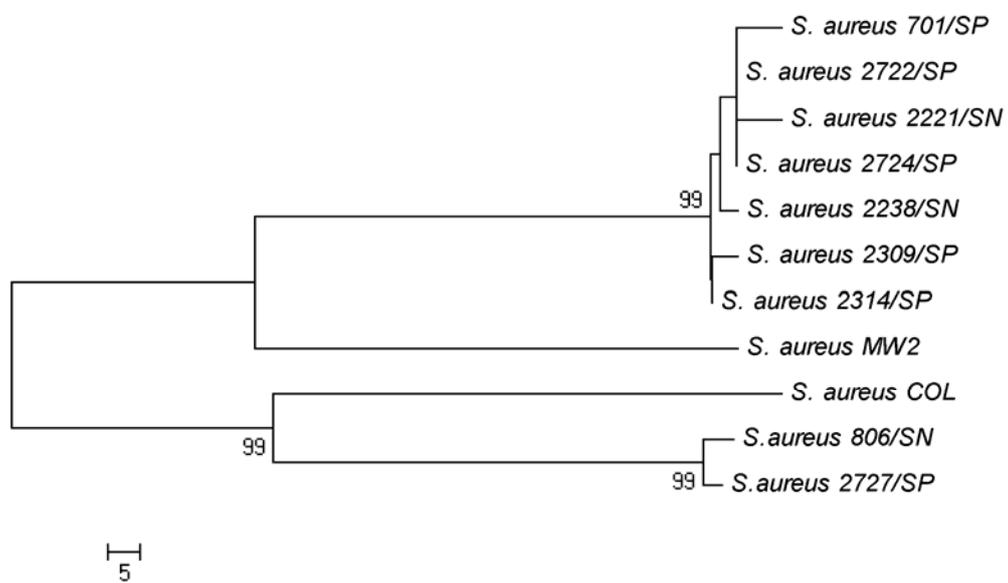


Figura 5- Árvore filogenética reconstruída com sequências do gene de rRNA 16S dos isolados de *S. aureus* de gado com mastite subclínica. A história evolucionária foi inferida utilizando o método da Máxima Parcimônia. Análises filogenéticas foram conduzidas no MEGA4.

A árvore filogenética reconstruída com sequências do gene de rRNA 16S dos 8 isolados de *S. aureus* de gado com mastite clínica é mostrada na Figura 6.

Os isolados 226/C, 75/C, 218/C, 216/C e 41/C, provenientes do mesmo município e rebanho apresentam diferenças em relação a sua filogenia. Os isolados 226/C, 75/C, 218/C mostraram uma relação evolutiva próxima, entretanto, esse fato não é observado em relação aos isolados 216/C e 41/C, que apresentam distância genética entre si e dos demais isolados do mesmo rebanho.

Esse distanciamento é observado também quando todos os isolados desse mesmo município são comparados com o isolado *S. aureus* COL e *S. aureus* MW2. Esse resultado difere daquele observado para os isolados 806/SN e 2727/SP de caso clínico, e indica uma diversidade entre os isolados de casos clínicos e subclínicos estudados.

Os isolados 2552/C e 284/C, embora pertencentes ao mesmo rebanho, não apresentam grande proximidade entre si. O isolado 284/C, pertencente a outro município e rebanho, foi incluído no mesmo grupo que 41/C.

A mastite clínica caracteriza-se pela formação de alguns coágulos e presença de aglomerados de fibrina no soro e gera elevados custos ao produtor relacionados ao diagnóstico, ao tratamento e à produção do leite, tais como o seu descarte e o aumento de riscos de resíduos neste alimento (McDougall et al., 2007). Os problemas resultantes de infecções provocadas por *S. aureus* isolados de vacas com mastite clínica e subclínica, atingem o setor da

indústria leiteira em grandes proporções (Fenlon, et al., 1995). Em estudo sobre o impacto da mastite clínica e subclínica em seis fazendas de Araxá- Minas Gerais, foi mostrado que os custos e perdas totais com mastite foram equivalentes à US\$126 por vaca em lactação por ano gastos com medicamentos, mão de obra extra, reposição de animal, descarte de leite por causa do tratamento e serviços veterinários (Júnior et al., 2005).

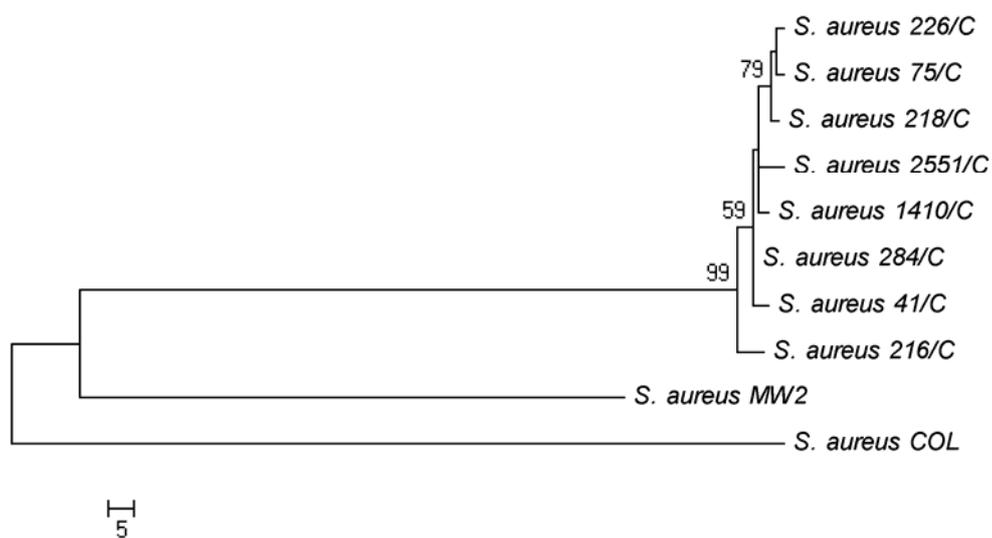


Figura 6- Árvore filogenética reconstruída com sequências do gene de rRNA 16S isolados de *S. aureus* de gado com mastite clínica. A história evolucionária foi inferida utilizando o método da Máxima Parcimônia. Análises filogenéticas foram conduzidas no MEGA4.

A figura 7 apresenta os dados de três isolados de *S. aureus* provenientes de casos de mastite crônica pertencentes à mesma localidade. A topologia da árvore revela um ramo curto entre os isolados 2413/R e 347/R indicando uma proximidade evolutiva desses isolados. É observada também a proximidade entre o isolado 258/R e o isolado *S. aureus* COL proveniente de caso clínico humano.

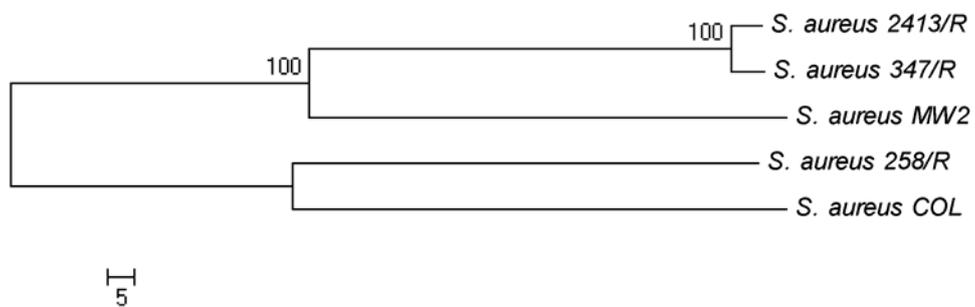


Figura 7- Árvore filogenética reconstruída com sequências do gene de rRNA 16S dos isolados de *S. aureus* de gado com mastite crônica. A história evolucionária foi inferida utilizando o método da Máxima Parcimônia. Análises filogenéticas foram conduzidas no MEGA4.

5.2. Perfil de resistência dos isolados aos β -lactâmicos

Entre os isolados, 48,35% mostraram-se sensíveis aos antibióticos ampicilina e penicilina e 96,77% mostram-se sensíveis a oxacilina. A resistência, medida em meio líquido, conforme a metodologia do NCCLS (2001), foi definida como $\geq 0,5$ $\mu\text{g/ml}$ para ampicilina; $\geq 0,25$ $\mu\text{g/ml}$ para penicilina e $\geq 4,0$ $\mu\text{g/ml}$ para oxacilina. O quadro 3 mostra diferentes níveis de resistência de 17 isolados a dois dos três β -lactâmicos avaliados, os outros 14 isolados foram sensíveis aos β -lactâmicos testados.

Dos 31 isolados estudados, dezesseis apresentaram resistência a dois dos antimicrobianos avaliados, ampicilina e penicilina, e um isolado apresentou resistência à oxacilina. Os isolados de mastite subclínica, 2724/SP, 2727/SP e 2314/SP, apresentaram resistência à penicilina e ampicilina e valores de CIM variando de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ a 2,0 $\mu\text{g/ml}$ para ampicilina e 2,0 $\mu\text{g/ml}$ para penicilina (Quadro 3). Esses valores são altos, considerando os valores limites estabelecidos pelo NCCLS (2001). Embora a validade desses critérios tenha sido discutida, por se basearem em dados obtidos de humanos, ainda são os adotados, para isolados provenientes de animais, uma vez que não há critérios específicos para bovinos.

O aumento dos valores da CIM tem implicações sérias no tratamento de rotina adotado na clínica humana e veterinária vindo a constituir um grave problema de saúde pública. Conseqüências podem surgir a partir do aumento da dose necessária para controlar

uma infecção, como por exemplo, seleção de bactérias resistentes da microbiota normal do indivíduo e possivelmente, a transferência dessa resistência a outras bactérias susceptíveis ampliando a disseminação da resistência (Gutiérrez -Martin et al., 2006).

Quadro 3. Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/ml}$) dos β -lactâmicos em Caldo Nutriente e perfil de resistência dos isolados de *S. aureus* isolados de vacas com mastite clínica, subclínica e crônica.

Isolado	Tipo de mastite	Antimicrobianos			Perfil de resistência
		Amp.	Oxa.	Pen.	
41/C	Clínica	1,0	< 2	0,25	Resistente a dois antimicrobianos
75/C	Clínica	0,5	< 2	0,5	Resistente a dois antimicrobianos
216/C	Clínica	1	< 2	1	Resistente a dois antimicrobianos
218/C	Clínica	1	< 2	0,5	Resistente a dois antimicrobianos
284/C	Clínica	1	< 2	0,5	Resistente a dois antimicrobianos
2551/C	Clínica	0,5	< 2	0,25	Resistente a dois antimicrobianos
806/SN	Subclínica com CMT negativo	2	< 2	2	Resistente a dois antimicrobianos
2252/SN	Subclínica com CMT negativo	2	< 2	2	Resistente a dois antimicrobianos
701/SP	Subclínica com CMT positivo	0,25	< 2	2	Resistente a dois antimicrobianos
795/SP	Subclínica com CMT positivo	1	< 2	0,5	Resistente a dois antimicrobianos
2314/SP	Subclínica com CMT positivo	2	< 2	0,5	Resistente a dois antimicrobianos
2389/R	Crônico	1	< 2	1	Resistente a dois antimicrobianos
226/C	Clínica	0,125	4	0,03	Resistente a oxacilina
2555/C	Clínica	0,5	< 2	0,25	Resistente a dois antimicrobianos
2724/SP	Subclínica com CMT positivo	2	< 2	1	Resistente a dois antimicrobianos
2727/SP	Subclínica com CMT positivo	2	< 2	2	Resistente a dois antimicrobianos
2413/R	Crônico	0,5	< 2	1	Resistente a dois antimicrobianos

Amp: Ampicilina; Oxa: Oxacilina, Pen: Penicilina.

Neto et al. (2005) realizaram um levantamento com o objetivo de conhecer os medicamentos mais frequentemente administrados em terapêuticas para patologias do rebanho leiteiro e definir os princípios ativos. Os resultados da pesquisa mostraram que a penicilina foi o antimicrobiano com o maior número de citações.

O uso de antibiótico em gado de leite pode ser classificado como terapêutico, quando utilizado no tratamento de uma condição pré-existente; profilática, quando a administração ocorre em condições de alto risco de desenvolvimento da doença. Concentrações subterapêuticas podem acelerar o desenvolvimento de resistência a antibióticos devido ao longo período de exposição da bactéria ao antibiótico, proporcionando tempo para sua adaptação à nova condição (McAllister et al, 2001).

Um estudo comparativo de isolados de *S. aureus* de mastite bovina mostrou que no período de 5 anos (1952 a 1956) somente uma linhagem dessa espécie apresentou resistência à penicilina, em 1992 seis linhagens foram resistentes (Aarestrup et al, 1995). Em outro estudo comparativo entre 1988 e 1995, a proporção de isolados de *S. aureus* resistentes à penicilina aumentou de 36,95% em 1988 para 63,65% em 1995, com um aumento paralelo na multiresistência (Myllis et al., 1998). Dados da Argentina e Brasil mostraram que o percentual de estafilococos isolados de gado com mastite resistentes à penicilina aumentou de 40 para 86% (Gentilini et al, 2002).

Os resultados revelaram que 51,6% de *S. aureus* isolados de vaca com mastite apresentaram resistência a ampicilina e penicilina e 3,22% apresentou resistência a oxacilina. A concentração inibitória

mínima dos três β -lactâmicos testados para os isolados são mostrados nas Figuras 8(A e B), 9 (A e B) e 10, respectivamente.

Amostras de *S. aureus* provenientes da Zona da Mata do Estado de Minas Gerais foram avaliadas quanto ao perfil de resistência anteriormente por Brito et al. (2001). Resultados diferentes dos obtidos neste trabalho foram relatados. Os percentuais de sensibilidade relatados para ampicilina e penicilina foram de 65% e, no caso da oxacilina, 100% dos isolados mostraram-se sensíveis. A variação na sensibilidade de *S. aureus* isolados de mastite são, possivelmente, devido a diferenciação dos métodos de avaliação utilizados. Brito et al. (2001) utilizaram o método de crescimento em meio sólido e, embora o método empregado neste estudo seja diferente, pode-se, para finalidades acadêmicas, considerar os valores obtidos. Os objetivos deste trabalho justificam o uso de metodologia diferente por detectar o efeito do antimicrobiano durante todo o crescimento do microrganismo. Neste trabalho, qualquer nível de resistência é relevante por sinalizar presença de algum determinante genético de resistência.

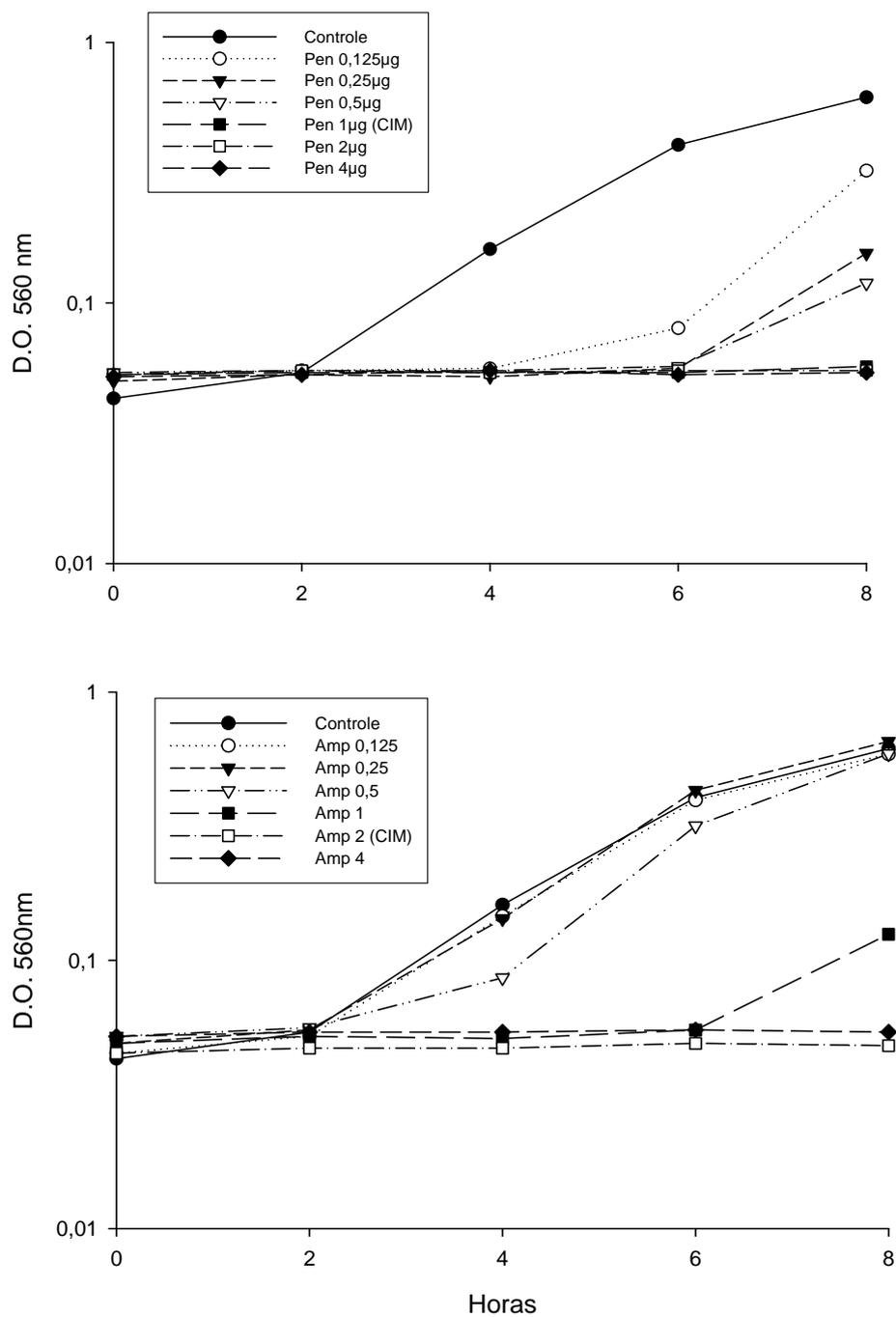


Figura 8. A) Efeito de concentrações ($\mu\text{g/ml}$) de penicilina (Pen) e B) ampicilina (Amp), sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus*, isolado 2724/SP. A concentração inibitória mínima foi arbitrariamente definida como a menor concentração que mantém a cultura em crescimento até duas horas após o início da fase estacionária do controle.

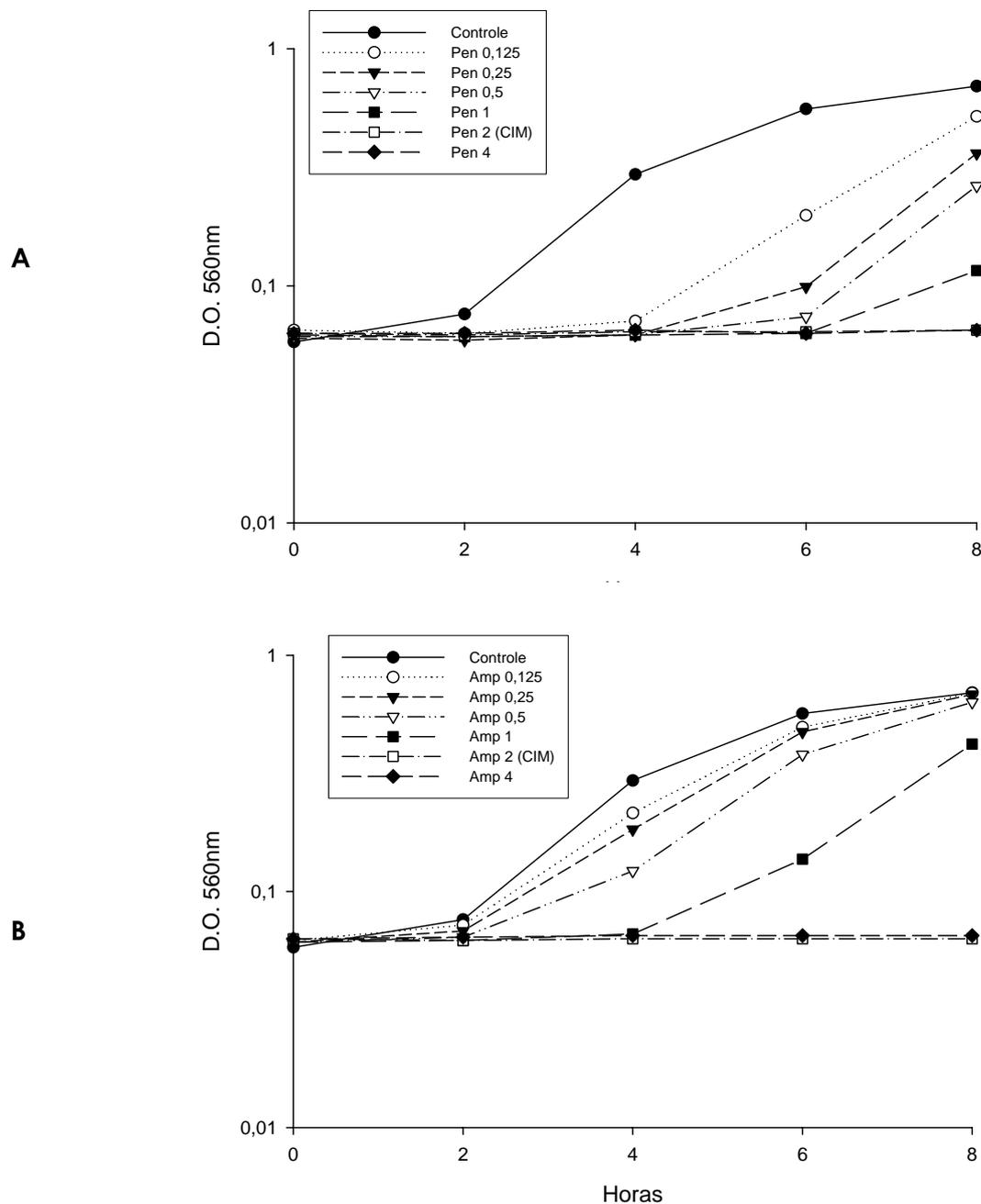


Figura 9. A) Efeito de concentrações ($\mu\text{g/ml}$) de penicilina (Pen) e B) ampicilina (Amp), sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus*, isolado 2727/SP. A concentração inibitória mínima foi arbitrariamente definida como a menor concentração que mantém a cultura em crescimento até duas horas após o início da fase estacionária do controle.

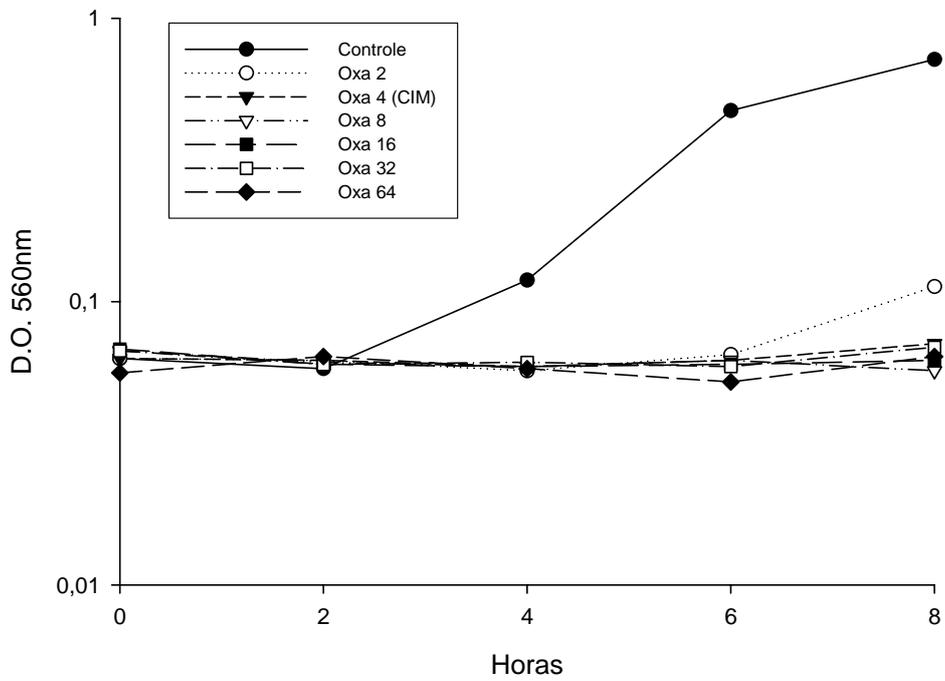


Figura 10. Efeito de concentrações ($\mu\text{g/ml}$) de oxacilina (Oxa) sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus*, isolado 226/C. A concentração inibitória mínima foi arbitrariamente definida como a menor concentração que mantém a cultura em crescimento até duas horas após o início da fase estacionária do controle.

5.3. Detecção da presença dos genes *blaZ* e *mecA* de *S. aureus*

Com relação ao gene *blaZ*, dos 31 isolados analisados, cinco apresentaram resultados positivos por representarem segmentos de DNA amplificados com tamanho esperado, cerca de 517 pb para o gene *blaZ* (Figura 11). Os isolados 226/C e 2555/CA são originários de leite de animais com mastite clínica; o isolado 2724/SP corresponde a um caso de mastite subclínica com escore positivo no CMT e os isolados 2413/R e 347/R são de animais com mastite subclínica crônica. Em todos os casos, as seqüências do DNA amplificado confirmaram a ocorrência do gene *blaZ* nestes isolados.

Resultado semelhante foi observado para *mecA*. A amplificação dos DNA dos isolados 226/C e 2555/C relacionados a casos mastite clínica; 2724/SP proveniente de caso de mastite subclínica com escore positivo no CMT e o 2423/R originário de mastite crônica apresentaram produtos de PCR com tamanhos de 310 pb, semelhante ao esperado para o gene *mecA* (Figura 12).

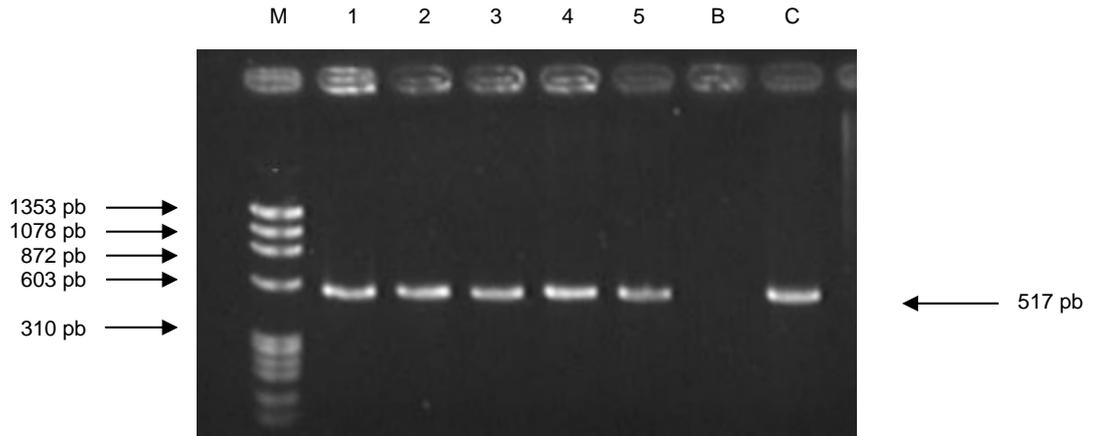


Figura 11- Produtos da amplificação por PCR do gene *blaZ* dos isolados analisados. 1, 2, 3, 4 e 5 representam os isolados analisados (226/C, 2555/C, 2724/SP, 2413/R, 347/R), respectivamente. M: representa o marcador de tamanho (PhyX-174) digerido com *Hae* III. B: representa o controle negativo e C: representa o controle positivo (ATCC 33591).

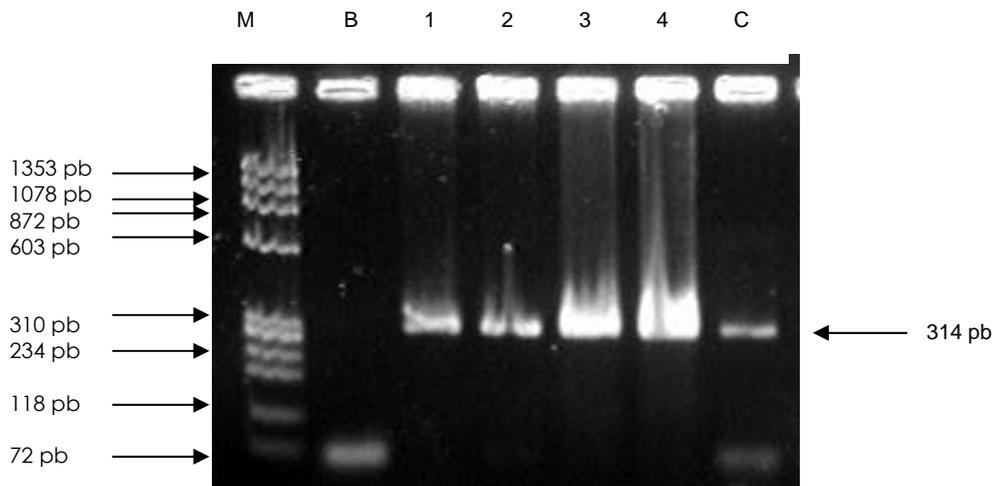


Figura 12- Produtos da amplificação por PCR do gene *mecA* dos isolados analisados. 1, 2, 3 e 4 representam os isolados 226/C, 2555/C, 2724/SP, 2413/R, respectivamente. M: representa o marcador de tamanho (PhyX-174) digerido com *Hae* III. B: representa o controle negativo e C: representa o controle positivo (ATCC 33591).

A amostra 2724/SP isolada de mastite subclínica apresentou os dois genes de resistência estudados (Figuras 11 e 12). Esses dados são relevantes considerando que a mastite subclínica é considerada mais problemática devido à transferência silenciosa do agente infeccioso para o rebanho leiteiro, uma vez que o animal não apresenta sinais clínicos da doença. A presença de genes de resistência em isolados subclínicos de *S. aureus* pode agravar a situação devido a expansão do reservatório de genes de resistência. O emprego indiscriminado de antibióticos pode fornecer uma oportunidade de pressão seletiva para tal evento. No início de 1969, foi alertado que a administração de quantidades mínimas de antimicrobianos nos alimentos pode resultar na seleção de bactérias resistentes (van Houweling e Kingma, 1969).

Evidências tem demonstrado que a emergência de resistência a antimicrobianos pode ser transmitida para humanos via cadeia alimentar. Um estudo realizado por Garau et al., (1999) com 308 amostras fecais de crianças mostrou que 26% delas eram portadoras sadias de *Escherichia coli* resistente a quinolonas. Uma vez que as quinolonas não são utilizadas no tratamento de crianças, os autores sugeriram que a fonte de aquisição dessas linhagens foi o consumo de alimentos de origem animal.

Baseados nas informações contidas no Manual do NCCLS (2001) e nos dados obtidos (Quadro 3 e Figura 8) pode-se classificar o isolado 226/C como MRSA. De acordo com o Manual do NCCLS (2001), *S. aureus*, pode ser considerado MRSA quando apresenta um MIC para oxacilina ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$ e positividade no teste em Ágar Sal. Frequentemente, os laboratórios têm adotado a detecção do gene

mecA em associação com o CIM, como método alternativo para identificação de MRSA.

Estudos publicados sobre os aspectos epidemiológicos de infecções por MRSA em animais são raros. Lee et al, em 2003 realizaram um estudo com MRSA isolados de leite e de aves no período de 2001 a 2003, na Coréia, com objetivo de investigar a possível contaminação de humanos com isolado MRSA de animais. A maioria dos isolados era proveniente de gado de leite com sinais de mastite. Em fazendas na Coréia, o tratamento usual da mastite consiste na administração de penicilina e ampicilina, embora meticilina e oxacilina sejam raramente utilizadas na medicina veterinária. Essa prática pode contribuir para o aumento da incidência de MRSA em vacas com mastite. Alguns estudos sugerem que a transferência de *S. aureus* entre humanos e vacas é possível, embora seja um evento não muito freqüente (Fox et al., 1991; Roberson et al., 1994).

A identificação e colonização causada por *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) em cavalos procedentes de hospitais veterinários e da comunidade bem como reportagens relatando a transmissão de MRSA entre humanos e animais têm demonstrado o papel dos animais na transmissão dessas linhagens para humanos e o seu potencial para tornar-se um reservatório (Cefai et al. 1994; Manian, 2003; O'Mahony et al, 2005; Van Duijkeren et al, 2004; Wesse et al, 2005).

A figura 11 mostra que o isolado 347/R, sensível aos três antimicrobianos testados apresenta o gene *blaZ*. A presença do gene *blaZ*, não implica necessariamente na produção de β -lactamase,

conforme observado por Haveri et al. (2005). Entretanto, isolados sensíveis aos antimicrobianos em testes de sensibilidade, quando carregam determinantes de resistência a tais antimicrobianos, podem ser considerados potencialmente resistentes. Eventos de mutação podem ativar genes regulatórios e induzir a expressão de resistência aos antimicrobianos, como foi observado por Kolbert et al. (1998), em *S. aureus* resistentes à oxacilina. Esse resultado está de acordo com os obtidos neste estudo, com o 226/C. Embora sensível a ampicilina e penicilina, apresentou valores altos da CIM para oxacilina (Quadro 3) e a presença dos dois genes que conferem resistência aos β -lactâmicos (Figuras 11 e 12). Outro aspecto importante que deve ser considerado é o limite para resistência recomendado para o método de diluição em ágar. O valor pode ser considerado alto, por se basear em dados obtidos de humanos. Haveri et al., (2005) mostraram que o limite de resistência nos seus isolados foi $> 0,03 \mu\text{g/ml}$ e não $\geq 0,25$, valor aprovado para estudos comparativos pelo NCCLS, 2001.

Em doze dos isolados estudados resistentes a penicilina e ampicilina não foi observada a presença dos genes *mecA* e *blaZ*, provavelmente devido à presença de um terceiro mecanismo de resistência. Van Griethuysen e colaboradores (2005) descreveram a perda do gene *mecA* em 32 das 35 linhagens de MRSA durante a estocagem em freezer -80°C . Possivelmente, eventos de deleção e inserção ocorreram durante a estocagem. Entretanto, o cuidado ao incluir o antimicrobiano em concentração baixa no meio visou à manutenção de determinantes genéticos, tais como plasmídeos que são facilmente perdidos durante o cultivo sem pressão seletiva.

Hurlimann-Dalel et al., (1992), também descreveram uma aparente perda do gene *mecA* em culturas de MRSA liofilizadas. Contudo, esses dados não puderam ser confirmados nas culturas utilizadas no presente estudo, porque não foram realizadas análises para detectar a presença do gene antes da estocagem dos isolados.

Os resultados apresentados por Haveri et al. (2005) apontam outra possibilidade para justificar, em parte, os dados encontrados neste estudo. O estudo realizado por esses pesquisadores mostrou que alguns isolados que apresentavam positividade nos testes fenótipos para a produção de β -lactamases não continham o gene *blaZ*. Diferentes β -lactamases podem ser encontradas em *S. aureus*, e essas modificações podem estar localizadas no sítio de anelamento do *primer*, podendo comprometer a amplificação.

5.4. Detecção, sequenciamento e análise filogenética dos genes *blaZ* e *mecA* de *S. aureus*

Para avaliar a relação filogenética entre os genes dos isolados de *S. aureus* que apresentaram o *blaZ* foi reconstruída uma árvore pelo método da Máxima Parcimônia (Figura 13).

A seqüência do gene *blaZ* dos isolados provenientes de diferentes casos de mastite clínica (226/C, 2555/C); crônica (2413/R, 347/R) e subclínica com CMT positivo (2724/C) foram comparadas entre si e com a da linhagem de *S. aureus* pSAS proveniente de um caso clínico humano.

Foi possível identificar que as seqüências do gene *blaZ* dos isolados 226/C, 2413/R e 347/R, provenientes de diferentes casos clínicos se agrupam, mostrando uma proximidade genética entre elas (Figura 13). Os isolados 2413/R e 347/R pertencem ao mesmo rebanho leiteiro, entretanto o 226/C é proveniente de gado de outra localidade.

Outros dois isolados estudados, o 2555/C e o 2724/SP, embora, pertencentes a diferentes casos clínicos e de diferentes localidades, apresentam as seqüências do gene *blaZ* relacionadas sugerindo uma proximidade filogenética entre eles (Figura 13).

Conforme observado pela distância entre os ramos, os genes dos isolados de diferentes casos clínicos, apresentam proximidade entre si, mas grande distância filogenética entre eles e o gene *blaZ* de *S. aureus* pSAS isolado de caso clínico humano (Figura 13).

East e Dyke (1989), mostraram que o gene *blaZ* em *S. aureus* de origem bovina na Noruega está localizado no cromossomo e sua transferência pode ser clonal. Olsen et al. (2006) mostraram que os isolados de bovinos e humanos com os quais trabalharam, apresentavam alta similaridade quando o gene *blaZ* estava localizado em plasmídio. Contudo, esse fato não era observado quando o gene se encontrava no cromossomo.

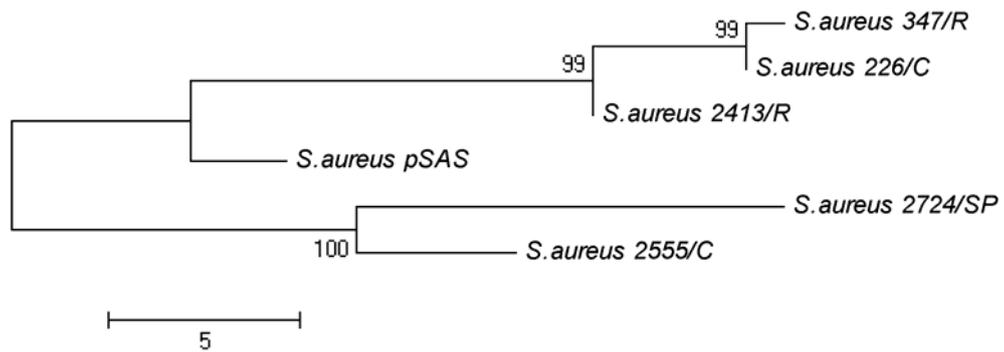


Figura 13- Árvore filogenética reconstruída com sequências do gene *blaZ*. As relações filogenéticas foram inferidas utilizando o método da Máxima Parcimônia. Análises filogenéticas foram conduzidas no MEGA4.

A árvore filogenética reconstruída pelo método da Máxima Parcimônia e com sequências do gene *mecA* mostrou diferenças entre o gene do isolado 226/C e outros de isolados provenientes de casos clínicos humanos (Figura 14).

Uma característica diferencial de resistência à meticilina é a sua natureza heterogênea, com o nível de resistência variando de acordo com as condições de cultivo e o tipo de β -lactâmico presente no meio (Chambers, 1997). Estas mudanças na expressão da resistência sob diferentes condições de cultivo são transitórias e inteiramente fenotípicas. A proporção de células altamente resistentes diminui gradualmente quando são subcultivadas repetidas vezes em meios sem antibiótico. Esse fato resulta na emergência do padrão original do isolado. Entretanto, alguns isolados clínicos, como por exemplo, a linhagem de *S. aureus* COL isolada de paciente humano, se apresenta homogênea mesmo quando subcultivada inúmeras vezes (Chambers, 1997).

O gene *mecA* do isolado 226/C apresentou grande diferença com o de *S. aureus* COL. Esse resultado aponta para a natureza heterogênea no padrão de expressão de resistência desse isolado em relação a esse gene.

Poucas informações estão disponíveis sobre relacionamento filogenético entre genes que conferem resistência a antimicrobianos em *S. aureus*, principalmente nos de origem animal. Há necessidade de analisar o significado da diversidade entre clones associados à mastite no Estado de Minas Gerais devido à sua importância

econômica. A distribuição e prevalência dos determinantes genéticos de resistência precisam ser melhor conhecidas.

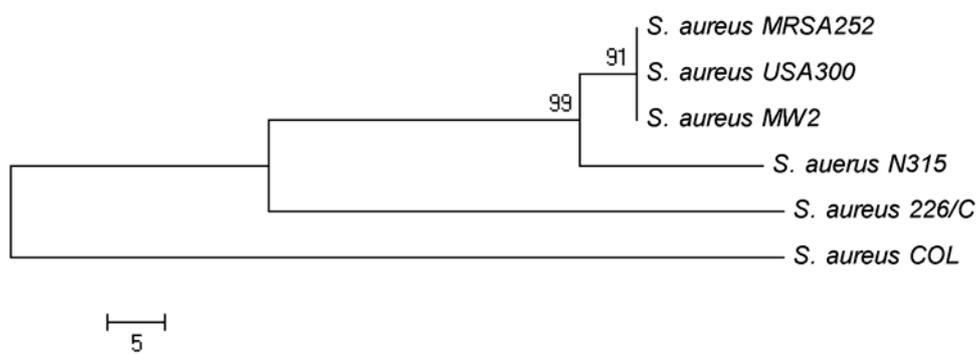


Figura 14- Árvore filogenética reconstruída com sequências do gene *mecA*. As relações filogenéticas foram inferidas utilizando o método da Máxima Parcimônia. Análises filogenéticas foram conduzidas no MEGA4.

5.5. Resistência dos isolados à tilosina e detecção da presença do gene *ermC*

Isolados que apresentaram sensibilidade à tilosina quando determinada a CIM mas que continham o gene *mecA* quando realizada a PCR, representaram 100% dos casos de mastite subclínica com CMT positivo (Quadro 5). Nos casos de mastite clínica, subclínica com CMT negativo e crônica foram observados que 81,81%, 60% e 33,3% dos isolados, respectivamente, apresentam sensibilidade à tilosina com expressão de resistência a MLS possivelmente induzível (Quadros 4, 6 e 7). Somente o isolado 246/R, proveniente de um caso de mastite crônica mostrou resistência à tilosina e presença do gene *ermC*. Esse resultado indica possivelmente uma resistência constitutiva.

A expressão do gene *ermC* pode ser induzida ou constitutiva e somente eritromicina e outros macrolídeos de 14 e 15 átomos são capazes de atuar como indutores da expressão de *ermC*, enquanto outros macrolídeos de 16 átomos como tilosina, espiramicina, bem como lincosamida e estreptogramina B não induzem a expressão do gene *ermC*. Linhagens que contém o gene *ermC* e expressam resistência a macrolídeos de 14, 15 e 16 átomos e a lincosamidas e estreptogramina B, apresentam uma resistência constitutiva (Lodder et al., 1997).

O gene *ermC* pode ser expresso constitutivamente quando outros MLS indutores, com 14 ou 15 átomos ativam a região regulatória. Jensen e Aarestrup, (2005) relatam que altas concentrações de

macrolídeos não induzíveis, como a filossina, são responsáveis pela seleção da expressão constitutiva. Dados obtidos de estudos clínicos e *in vitro* têm mostrado que a expressão do gene poderia ser alterada de induzível para constitutiva sob pressão seletiva de não indutores (Luthje e Schawarz, 2007).

Um estudo recente confirmou a capacidade de três não indutores, pirlimicina, espiramicina e filossina selecionar mutantes *ermC* em *S. aureus* pela inativação funcional de um atenuador da tradução (Luthje e Schawarz, 2007). A expressão induzível é regulada pela atenuação traducional e requer uma região regulatória completa (Weisblum, 1995). A expressão constitutiva resulta de alterações estruturais dentro da região regulatória do gene *ermC*, tais como deleções, duplicações ou mutações pontuais (Werckenthin et al., 1999; Schmitz et al., 2002).

Quadro 4. Perfil genotípico e o fenotípico de *S. aureus* isolados de vacas com mastite clínica após exposição à tilosina em Caldo Nutriente.

Isolado	CIM ($\mu\text{g/ml}$)	Presença do gene <i>ermC</i> *	Fenótipo (NCCLS, 2001)
41/C	0,5	+	Sensível
75/C	2,0	+	Sensível
216/C	2,0	+	Sensível
218/C	2,0	+	Sensível
226/C	2,0	+	Sensível
230/C	2,0	+	Sensível
284/C	2,0	-	Sensível
287/C	2,0	+	Sensível
1440/C	4,0	-	Resistente
2551/C	1,0	+	Sensível
2555/C	1,0	+	Sensível

* Presença ou ausência determinada por PCR

Quadro 5. Perfil genotípico e o fenotípico de *S. aureus* isolados de vacas com mastite subclínica com CMT positivo após exposição à tilosina em Caldo Nutriente.

Isolado	CIM (µg/ml)	Presença do gene <i>ermC</i>*	Fenótipo (NCCLS, 2001)
701/SP	2,0	+	Sensível
707/SP	2,0	+	Sensível
795/SP	2,0	+	Sensível
1621/SP	2,0	+	Sensível
2309/SP	1,0	+	Sensível
2314/SP	2,0	+	Sensível
2722/SP	2,0	+	Sensível
2724/SP	2,0	+	Sensível
2727/SP	2,0	+	Sensível

* Presença ou ausência determinada por PCR

Quadro 6. Perfil genotípico e fenotípico de *Staphylococcus aureus* isolados de vacas com mastite subclínica com CMT negativo após exposição à tilosina em Caldo Nutriente.

Isolado	CIM (µg/ml)	Presença do gene <i>ermC</i> *	Fenótipo (NCCLS, 2001)
806/SN	2,0	-	Sensível
2221/SN	2,0	+	Sensível
2238/SN	2,0	+	Sensível
2252/SN	2,0	+	Sensível
2623/SN	1,0	-	Sensível

* Presença ou ausência determinada por PCR

Quadro 7. Perfil genotípico e fenotípico de *Staphylococcus aureus* isolados de vacas com mastite subclínica crônica após exposição à tilosina em Caldo Nutriente.

Isolado	CIM (µg/ml)	Presença do gene <i>ermC</i> *	Fenótipo (NCCLS, 2001)
258/R	2,0	-	Sensível
2413/R	2,0	+	Sensível
2389/R	2,0	+	Sensível
2633/R	2,0	-	Sensível
247/R	4,0	+	Resistente
347/R	2,0	-	Sensível

* Presença ou ausência determinada por PCR

Os resultados mostraram que o maior percentual de isolados com expressão de resistência a MLS possivelmente induzível pertence aos casos de mastite subclínica (Quadro 5 e 6). Essa informação é de particular importância considerando a perda econômica proporcionada por essa enfermidade e as medidas quimioterápicas utilizadas para promover a cura dos animais afetados. É necessário um controle do uso da tilosina como agente terapêutico no tratamento deste tipo de mastite com o intuito de desacelerar a seleção de linhagens mais adaptadas. Os dados apresentados pela literatura sobre a pressão exercida na indução da expressão de *ermC* sugerem uma vantagem seletiva aos isolados sensíveis que contenham o gene.

Linhagens de *S. aureus* com resistência induzível a eritromicina, porém aparentemente sensíveis, poderiam alterar o padrão de resistência induzível para constitutiva. Este tipo de resistência poderia ser direcionada a todos os antibióticos MLS com consequente aumento da morbidade (Weisblum, 1995). Watanakunakorn (1976) relatou um caso de paciente com endocardite causada por *S. aureus* com resistência induzível a eritromicina. A linhagem apresentou-se sensível a clindamicina e o paciente respondeu favoravelmente ao tratamento durante 26 dias, entretanto, ao final deste período observou-se uma reinfecção associada ao desenvolvimento de resistência constitutiva pela linhagem de *S. aureus* causadora da infecção.

A presença do gene *ermC*, *blaZ* e *mecA* foi detectada nos isolados 226/C, 2555/C, 2724/SP e 2413/R, revelando um potencial para expressão de multiresistência desses isolados.

DaCosta et al., 2006, analisaram o perfil de resistência a 21 antibióticos, de 500 bactérias formadoras de esporos isoladas de vários ambientes. O estudo revelou que todas as bactérias apresentaram resistência multidroga, sendo cada bactéria resistente a sete ou oito antibióticos. A partir desses dados é possível inferir que a múltipla resistência a drogas poderia constituir uma característica intrínseca de muitos microrganismos e que a resistência a diferentes classes de antibióticos revela uma grande capacidade adaptativa e extensiva do resistoma. A mobilização de genes de resistência via transdução, conjugação ou transformação tem contribuído para a expansão do resistoma mesmo na ausência de pressão seletiva.

O termo resistoma tem sido atribuído a uma coleção de determinantes de resistência a antibióticos encontrados em bactérias patogênicas e não patogênicas e a genes de resistência críptica, os quais não necessariamente são expressos ou são expressos em baixos níveis, mas estão presentes no DNA cromossomal. O resistoma inclui também genes precursores que codificam proteínas com expressão modesta de resistência ou proteínas com pouca afinidade aos antibióticos que podem evoluir para um gene de resistência efetiva (Da Costa et al., 2006).

A exposição intensa e constante a uma diversidade de compostos antimicrobianos impulsionou uma contramedida genética para produzir um alto nível de resistência. O modelo proposto para a

evolução de resistência bacteriana aos antibióticos aponta para proteínas com funções bioquímicas alternativas que funcionariam como elementos precursores para a resistência. Algumas dessas proteínas precursoras desempenhariam funções secundárias na resistência aos antibióticos, mas que sob pressão constante poderiam desempenhar um papel central na evolução de uma resistência efetiva (Wright, 2007).

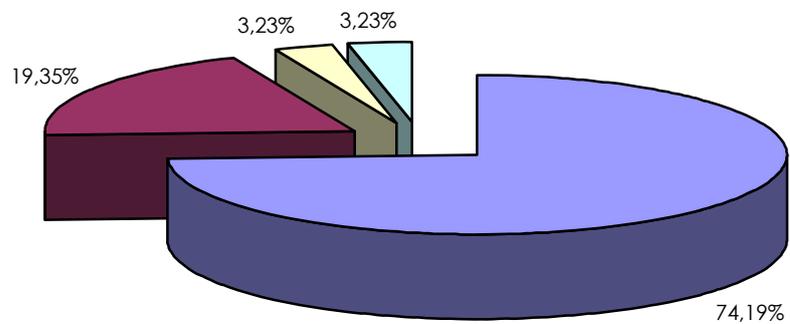
O isolado 1440/C, isolado de vacas com mastite clínica, apresentou resistência à tilosina, mas não foi detectada a presença do gene *ermC* neste isolado (Quadro 4). Provavelmente, outro mecanismo de resistência está presente. Liu e Douthwaite (2002) relatam um mecanismo de resistência sinérgico específico para tilosina e micinamicina. Este mecanismo envolve a adição de um único grupo metil nos nucleotídeos A2058 e G748 do rRNA 23S. As metiltransferases responsáveis pela metilação dos nucleotídeos G748 e A2058 são codificadas, respectivamente pelos genes *trlB* e *trlD*. A metiltransferase TlrB foi identificada pela primeira vez em *Streptomyces fradiae*, bactéria Gram positiva produtora de tilosina (Cundliffe, 1989). Uma proteína semelhante a TlrB foi observada em *Escherichia coli* (Liu e Douthwaite, 2002).

O isolado 226/C do presente estudo apresentou uma CIM de 2 µg/ml para tilosina, o que configura a sensibilidade do isolado ao antimicrobiano (Quadro 4). Entretanto, a presença do gene *ermC* representa um potencial para expressar resistência a outros macrolídeos, como por, exemplo a eritromicina). Conforme verificado previamente em estudo sobre resistência aos β-lactâmicos, este

isolado caracteriza-se como um MRSA. Estafilococos resistentes à meticilina são frequentemente resistentes a uma ampla variedade de agentes antimicrobianos incluindo macrolídeos, cloranfenicol, tetraciclina e fluoroquinolonas (Mandell et al., 1995).

O conjunto dos resultados mostrados nos quadros 4, 5, 6 e 7 são apresentados na Figura 15. Entre os 31 isolados estudados, 74,19% apresentaram sensibilidade à tilosina, porém, com expressão de resistência a MLS possivelmente induzível, uma vez que são portadores do gene *ermC*; 19,35% foram sensíveis à tilosina e não apresentam o gene *ermC*; 3,23% foram resistentes, mas não apresentaram o gene *ermC* e 3,23% apresentaram resistência e presença do gene *ermC*, possivelmente com expressão constitutiva.

A classificação de resistente foi feita com base na CIM determinada para fins de uso terapêutico. As estirpes denominadas sensíveis são, entretanto, resistentes a concentrações de tilosina até 2,0 µg/ml. Isso significa que o gene *ermC*, presente na maioria das linhagens pode estar respondendo por uma resistência basal.



- Sensível com expressão de resistência induzida a MLS
- Sensível sem o gene ermC
- Resistente sem o gene ermC
- Resistente com gene ermC e possível expressão constitutiva a MLS

Figura 15- Distribuição de resistência de *S. aureus* à tilosina dos 31 isolados de gado com mastite clínica, subclínica e crônica.

5.6. Seqüência e análise filogenética de *ermC*

Seqüências do gene *ermC* de *S. aureus* de cinco isolados de diferentes casos de mastite foram obtidas e comparadas por alinhamento com a seqüência de *ermC* de *S. aureus* pE5 de origem humana. A árvore filogenética reconstruída utilizando o método da Máxima Parcimônia mostra quatro agrupamentos de acordo com a semelhança entre os genes *ermC* de diferentes isolados (Figura 16). O primeiro grupo é representado pelos isolados 230/C e 2238/SN, originários respectivamente de animais com mastite clínica e subclínica, mostrando-os muito próximos. Embora pertencentes a localidades diferentes, esses isolados apresentam seqüências muito semelhantes do gene *ermC*. O segundo grupo, representado pelo isolado 247/R, de mastite crônica, está mais próximo do primeiro grupo do que do terceiro e quarto, representados, respectivamente pelos isolados 2727/SP e 2314/SP. Essa variação apresentada pelos genes em tão pouco isolados pode indicar uma grande diversidade genética entre os genes *ermC* de diferentes isolados. Existem evidências que sustentam a transferência horizontal do gene *mecA* entre *Staphylococcus*, embora o mecanismo ainda não esteja esclarecido (Hiramatsu, et al., 2001). É possível que um evento semelhante aconteça na transferência de *ermC*. A tilosina é utilizada na terapêutica de mastite bovina e pode ter pressionado a seleção desses genes.

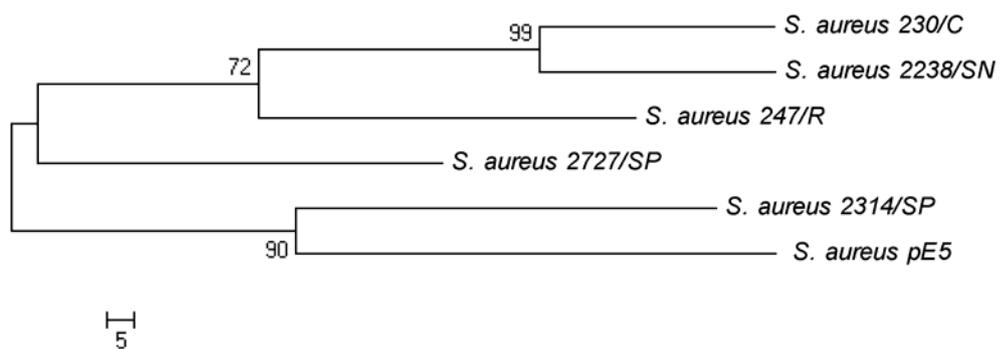


Figura 16- Árvore filogenética reconstruída com sequências do gene *ermC*. As relações filogenéticas foram inferidas utilizando o método da Máxima Parcimônia. Análises filogenéticas foram conduzidas no MEGA4.

6. CONCLUSÕES

As sequências de rRNA 16S de *S. aureus* provenientes de casos de mastite clínica, subclínica e crônica de diferentes localidades da Zona da Mata Mineira mostraram diversidade entre os isolados.

Dois dos nove isolados de mastite bovina subclínica distinguem-se dos outros por mostrarem-se filogeneticamente mais próximos a uma das linhagens de origem humana do que às outras sete linhagens bovinas.

Os isolados provenientes de vacas com casos clínicos de mastite distinguem-se filogeneticamente com nitidez dos isolados de origem clínica humana.

Isolados de casos de mastite crônica oriundos do mesmo rebanho apresentam grande proximidade entre si e agrupam-se com *S. aureus* de origem humana.

Entre os isolados estudados, 48% mostram-se sensíveis aos antimicrobianos ampicilina e penicilina e 97% mostraram-se sensíveis a oxacilina.

A presença dos genes *blaZ* e *mecA* foi detectada em 16% e 13% nos 31 isolados estudados, respectivamente.

Dos solados que apresentaram resistência a ampicilina e penicilina, 31% e 25%, apresentaram o gene *blaZ* e *mecA*, respectivamente.

O isolado 226/C, proveniente de mastite clínica, foi caracterizado como MRSA, uma vez que apresentou uma CIM de 4,0 µg/ml e presença do gene *mecA*.

A análise das sequências dos genes *blaZ* de cinco isolados estudados mostrou que existe uma distância filogenética entre eles e o *blaZ* de *S. aureus* pSAS de origem humana.

A seqüência do gene *mecA* do isolado 226/C, originário de mastite clínica mostrou uma grande distância filogenética com as seqüências de *S. aureus* provenientes de casos clínicos humanos.

Dentre os isolados de *S. aureus* estudados apenas dois (6,5%) apresentaram resistência à tilosina com valores de CIM igual 4,0 µg/ml.

Apenas o isolado 247/R, proveniente de mastite crônica, e caracterizado como resistente, com CIM de 4,0 µg/ml, apresentou o gene *ermC*.

As diferenças observadas entre as sequências do gene *ermC* em isolados de diferentes casos de mastite, indicam uma grande diversidade genética entre os genes *ermC*.

Constata-se diversidade genética entre isolados de *S.aureus* provenientes de vacas com mastite na zona da Mata Mineira, bem como diversidade entre os modelos e entre os genes de resistência a antimicrobianos. Estas conclusões são importantes para delineamento de estratégias de monitoramento dessa bactéria em rebanhos leiteiros na região.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARESTRUP, F.M. **Antimicrobia Resistance in Bacteria of Animal Origin**. ASM Press, Washington, DC, USA, 2006.

AARESTRUP, F.M.; DANGLER, C.A.; SORDILLO, C.M. Prevalence of coagulase gene polymorphism in *Staphylococcus aureus* isolates causing bovine mastitis. **Canadian Journal of Veterinary Research.**, v.59, n.2, p. 124-128, apr., 1995.

AMBLER, R.P. The structure of beta-lactamases. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Série B, Biological Sciences**, v.289, n.1036, p.321-31, 1980.

ANDERSSON, J.O.; ANDERSSON, S.G. Insights into the evolutionary process of genome degradation. **Current Opinion in Genetics & Developmen**, v. 9, p.664-671, 1999.

ARDIC, N.; OZYURT, M.; SAREYYUPOGLU, B.; HAZNEDAROGLU, T. Investigation of erythromycin and tetracycline resistance genes in methicillin-resistant staphylococci. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.26, p. 213-218, 2005.

ARDIC, N.; SAREYYUPOGIU, B.; OZYURT, M.; HAZNEDAROGIU, T.; ILGA, U. Investigation of aminoglycoside enzyme genes in methicillin-resistant staphylococci. **Microbiological Research**, v.161, p.49-54, 2006.

BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; SILVA, M.A.S.; CARMO, R.A. Concentração mínima inibitória de dez antimicrobianos para amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de infecção intramamária bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.53, n.5, out., p. 531-537, 2001.

BUESCHER, E.S. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pediatrics. **Infectious Diseases and immunization Current Opinion in Pediatrics**, v.17, n.1, feb., 2005.

BUSH, K.; JACOBY, G.A.; MEDEIROS, A.A. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.39 p.1211-33, 1995.

CEFAI, C.; ASHURST, S.; OWENS, C. Human carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* linked with pet dog. **Lancet**, v.344, p.539-540, 1994.

CHAMBERS, H.F. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. **Clinical Microbiology Reviews**, v.10. p.781-791, 1997.

CHAMPNEY, W.S.; BURDINE, R. Macrolide antibiotics inhibit 50S ribosomal subunit assembly in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.39, n.9, p.2141-2144, sept., 1995.

CHAMPNEY, W.S.; TOBER, C.L. Inhibition of translation and 50S ribosomal subunit formation in *Staphylococcus aureus* cells by eleven different ketolide antibiotics. **Current Microbiology**, v.37, p.412-417, 1998.

CLARRIDGE, J.E. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious disease. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 4, p. 840-862, Oct., 2004.

COHAN, F. M. What are bacterial species? **Annu Reviews Microbial**, v. 56, p.457-487, 2002.

COHAN, F.M. Bacterial species and speciation. **Syst. Biol**, v. 50, p.513-524, 2001.

COSTA, E. O. Importância da mastite na produção leiteira do país. **Revista Educação Continuada**. CRMV-SP, v.1, n.1, p.3-9, 1998.

CUNDLIFFE, E. How antibiotic-producing organisms avoid suicide. **Annual Review of Microbiology**, v.43, p.207-233, 1989.

D'COSTA, V. M.; MCGRANN, K. M.; HUGHES, D. W.; WRIGHT, G. D. Sampling the antibiotic resistome. **Science**, v. 311, p. 374-377, 2006.

DYKHUIZEN, D. E. Santa Rosalia revisited: why are there so many species of bacteria? **Antonie van Leeu Weenhoek**, v. 73, p. 25-33, 1998.

EAST, A.K.; DYKE, K.G.H. Cloning and sequence determination of six *Staphylococcus aureus* β -Lactamases and their expression in *Escherichia coli* and *S. aureus*. **Journal of General Microbiology**, v.135, p.1001-1015, 1989.

ELLIS, M.W.; HOSPENTHAL, D.R.; DOOLEY, D.P.; GRAY, P.J.; MURRAY, C.K. Natural history of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization and infection in soldiers. **Clinical Infectious Diseases**, v.39, p.971-979, 2004.

FENLON, D.R.; LOGUE, D.N.; GUNN, J.; WILSON, J. A study of mastitis bacteria and herd management practices to identify their relationship to high SCCs in bulk tank milk. **Br. Vet. J.**, v.151, p.17-25, 1995.

FOX, L.K.; GERSHMAN, M.; HANCOCK, D.D.; HUTTON, C.T. Fomites and reservoirs of *Staphylococcus aureus* causing intramammary infections as determined by phage typing: the effect of milking time hygiene practices. **Cornell Veterinary**, v.81, p.183-193, 1991.

FUDA, C.C.J.; FISHER, J.F.; MOBASHERY, S. β -Lactam resistance in *Staphylococcus aureus*: the adaptive resistance of a plastic genome. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.62, p.2617-2633, 2005.

FUIT, A.D.C.; MAARTEN, R.V.; SCHIMITZ, F.J. Molecular detection of antimicrobial resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, p. 836-871, oct., 2001.

GABASHVILI, I.S.; GREGORY, S.T.; VALLE, M.; GRASSUCCI, R.; WORBS, M.; WAHL, M.C.; DAHLBERG, A.E.; FRANK, J. The Polypeptide Tunnel System in the Ribosome and Its Gating in Erythromycin Resistance Mutants of L4 and L22. **Molecular Cell**, v. 8, n.1, p.181-188, jul., 2001.

GARAU, G.; BEBRONE, C.; ANNE, C.; GALLEN, M.; FRERE, J.M.; DIDEBERG, O. A metallo-beta-lactamase enzyme in action: crystal structures of the monozinc carbapenemase CphA and its complex with biapenem, **Journal of Molecular Biology**, v. 345, p.785-795, 2005.

GARAU, J.; XERCAVINS, M.; RODRÍGUEZ-CARBALLEIRA, M.; GOMÉZ-VERA, J.R.; COLL, I.; VIDAL, D.; LLOVET, T.; RUÍZ-BREMÓN, A. Emergence and dissemination of quinolone-resistant *Escherichia coli* in the community. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.43, n.11, p.2736-2741, nov., 1999.

GAYNOR, M.; MANKIN, A.S. Macrolide antibiotics: binding site, mechanism of action, resistance. **Frontiers in Medicinal Chemistry**, v.2, p.21-35, 2005.

GENTILINI, E.; DENAMIEL, G.; BETANCOR, A. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis in Argentina. **Journal of Dairy Science**, v.85, p.1913-1917, 2002.

GEVERS, D.; VANDEPOELE, K.; SIMILLION, C.; VAN DE PEER, Y. Gene duplication and biased functional retention of paralogs in bacterial genomes. **Trends in Microbiology**, v.12, p.148-155, 2004.

GHUYSEN, J.M. Molecular structures of penicillin-binding proteins and β -lactamases. **Trends in Microbiology**, v.2, p.372-380, 1994.

GIOVANETTI, E.; MONTANARI, M.P.; MINGOIA, M.; VARALDO, P.E. Phenotypes and genotypes of erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* strains in Italy and heterogeneity of inducibly resistant strains. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.43, p.1935-1940, 1999.

GLAZER, A.N.; NIKAIDO, H. **Microbial Biotechnology-Fundamentals of applied microbiology**. 2. ed. Cambridge University Press, 2007. 554p.

GOLEMI-KOTRA, D.; CHA, J.Y.; MEROUEH, S.O.; VAKULENKO, S.B.; MOBASHERY, S. Resistance to b-lactam antibiotics and its mediation by the sensor domain of the transmembrane BlaR signaling pathway in *Staphylococcus aureus*. **The Journal of Biological Chemistry**, v.278, p. 18419–18425, 2003.

GOPAL RAO; G., MICHALCZYK; P. NAYEEM, N.; WALKER, G.; WIGMORE, L. Prevalence and risk factors for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in adult emergency admissions – a case for screening all patients? **J Journal of Hospital Infection**, v. 66, p.15–21, 2007.

GUARDABASSI, L.; SCHWARZ, S.; LLOYD, D.H. Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria: review. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.54, p.321–332, 2004.

GUTIÉRREZ-MARTÍN, C.B.; BLANCO, N.G.; BLANCO, M.; NAVAS, J.; RODRÍGUEZ-FERRI, E.F. Changes in antimicrobial susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from pigs in Spain during the last decade. **Veterinary Microbiology**, v.115, p. 218-222, 2006.

HANSEN, J. L.; IPPOLITO, J.A. The structure of four macrolide antibiotics bound to the large ribosomal subunit. **Molecular Cell**, v.10, p.117-128, 2002.

HARDT, K.; JORIS, B.; LEPAGE, S.; BRASSEUR, R.; LAMPEN, J.O.; FRERE, J. M. et al. The penicillin sensory transducer, BlaR, involved in the inducibility of beta-lactamase synthesis in *Bacillus licheniformis* is embedded in the plasma membrane via a four-alpha-helix bundle. **Molecular Microbiology**, v.23, p. 935–944, 1997.

HAVERI, M.; SUOMINEN, S.; RANTALA, L.; HONKANEN-BUZALSKY, T.; PYORALA, S. Comparison of phenotypic detection of penicillin G resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infection. **Veterinary Microbiology**, v.106, p. 97-102, 2005.

HEINZ, U.; ADOLPH, H.W. Metallo-beta-lactamases: two binding sites for one catalytic metal ion? **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.61, p.2827–2839, 2004.

HIRAMATSU, K.; CUI, L.; KURODA, M.; ITO, T. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Trends in Microbiology**, v. 9, n.10, p. 486-493, oct., 2001.

HONG, S.H.; KIM, T.Y.; LEE, S.Y. Phylogenetic analysis based on genome-scale metabolic pathway reaction content. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, p.203–210, 2004.

HOOPER, S.D; BERG, O.G. On the nature of gene innovation: duplication patterns in microbial genomes. **Molecular Biology and Evolution**, v. 20, p. 945–954, 2003.

HÜRLIMANN-DALEL, R.L.; RYFELL, C.; KAYSER, F.H.; BERGER-BÄCHI, B. Survey of the methicillin-resistant associated genes *mecA*, *MecR1-mecI*, and *femA-femB* in clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.36, p.2617-2621, 1992.

JANDA, J. M; ABBOTT, S. L. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils and pitfalls. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 9, p.2761-2764, Sept., 2007.

JÁNOSI, L., NAKAJIMA, Y., HASHIMOTO, H. Characterization of plasmids that confer inducible resistance to 14-membered macrolides and streptogramin type B antibiotics in *Staphylococcus aureus*. **Microbiology and Immunology**, v.34, n.9, p.723-735, 1990.

JENSEN, L.B.; AARESTRUP, F.M. Regulation of the *ermC* gene in *Staphylococcus aureus* from reservoir with different usage of macrolides. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.46, p.163-166, 2005.

JORDAN, I.K.; MAKAROVA, K.S.; SPOUGE, J.L.; WOLF, Y.I.; KOONIN, E.V. Lineage-specific gene expansions in Bacterial and Archaeal genomes. **Genome Research**, v.11, p.555-565, 2001.

JUNIOR, E.V.H.; MADALENA, F.E.; HOLANDA, E.D.; MIRANDA, W.M.; SOUZA, M.R. Impacto econômico da mastite em seis fazendas de Araxá-Minas Gerais, Brasil. **Asociación Latinoamericana de Producción Animal**, v.13, n.2, p.63-69, 2005.

KERFF, F.; CHARLIER, P.; COLOMBO, M. L.; SAUVAGE, E.; BRANS, A.; FRERE, J. M. et al. Crystal structure of the sensor domain of the BlaR penicillin receptor from *Bacillus licheniformis*. **Biochemistry**, v.42, p.12835-12843, 2003.

KLASSON, L.; ANDERSSON, S.G.E. Evolution of minimal gene-sets in host-dependent bacteria. **Trends in Microbiology**, v. 12, p. 37-43, 2004.

KOLBERT, C.P.; ARRUDA, J.; VARGA-DELMORE, P.; ZHENG, X.; LEWIS, M.; KOLBERG, J.; PERSING, D.H. Branched-DNA assay for detection of the *mecA* gene in oxacillin-resistant and oxacillin-sensitive staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, p.2640-2644, 1998.

KOLSTO, A.B. Dynamic bacterial genome organization. **Molecular Microbiology**, v. 24, p. 241-248, 1997.

KOTRA, L.P.; SAMAMA, J.; MOBASHERY, S. Beta-lactamases and resistance to beta-lactam antibiotics. In: Lewis K, Salyers AA, Taber HW, Wax RG, eds. **Bacterial resistance to antimicrobials**. New York: Marcel Decker, p.123-60, 2002.

KUNIN, V.; OUZOUNIS, C.A. The balance of driving forces during genome evolution in prokaryotes. **Genome Research**, v. 13, p.1589-1594, 2003.

LAMPSON, B.C.; VON DAVID, W.; PARIS, J.T.; Novel mechanism for plasmid mediated erythromycin resistance by pNE24 from *Staphylococcus epidermidis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.30, p.653-658, 1986.

LAWRENCE, J.G.; HENDRIX, R.W.; CASJENS, S. Where are the pseudogenes in bacterial genomes. **Trends in Microbiology**, v.9, p. 535– 540, 2001.

LEE, J.H. Methicillin (oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p. 6489-6494, 2003.

LECLERCQ, R.; COURVALIN, P. Bacterial resistance to macrolide, lincosamide, and atreptogramin antibiotics by target modification. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.35, p. 1267-1272, 1991.

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

LIU, M.; DOUTHWAITE, S. Resistance to the macrolide antibiotic tylosin is conferred by single methylations at 23S rRNA nucleotides G748 e A2058 acting in synergy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.99, n.23, p.14658-14663, 2002.

LODDER, G.; WERCKENTHIN, C.; SCHWARZ, S.; DYKE, K. Molecular analysis of naturally occurring *ermC*-encoding plasmids in staphylococci isolated from animals with and without previous contact with macrolide/lincosamide antibiotics. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.18, p.7-15, 1997.

LOEFFLER, A.; BOAG, A. K.; SUNG, J.; LINDSAY, J. A.; GUARDABASSI, L.; DALSGAARD, A.; SMITH, H.; STEVENS, K. B.; LLOYD, D. H. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among staff and pets in a small animal referral hospital in the UK. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, p.692–697, 2005.

LOWY, F.D. "*Staphylococcus aureus* infections". **New England Journal of Medicine**, v.339, p. 520-532, 1998.

LOWY, F.D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Investigation**, v.111, p.1263-1265, 2003.

LÜTHJE, P.; SCHWARZ, S. Molecular analysis of constitutively expressed (*ermC*) genes selected in vitro in presence of the non-inducers pirimycin, spiramycin and tylosin. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.59, p.97-101, 2007.

MANDELL, G.; J. DOUGLAS; R. BENNETT. **Principles and practices of infectious disease diseases**. 4th ed. Churchill Livingstone, Edinburgh, UK, 1995.

MANIAN, F.A. Asymptomatic nasal carriage of mupirocin-resistant, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a pet dog associated with MRSA

infection in household contacts. **Clinical Infectious Diseases**, v.36, p.e26-e28, 2003.

MAO, J.C.; ROBISHAW, E.E. Erythromycin, a peptidyltransferase effector. **Biochemistry**, v.11, n.25, p.4864–4872, dec., 1972.

MARTINY, J.B.; BOHANNAN, B.J.; COLWEL, R. K. Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. **Nature Review Microbiology**, v.4, p. 102-112, 2006.

MAURELLI, A.T.; FERNANDEZ, R.E.; BLOCH, C.A.; RODE, C.K.; FASANO, A. Black holes and bacterial pathogenicity: a large genomic deletion that enhances the virulence of *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli*. **The Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 95, p. 3943–3948, 1998.

MAYR, E. Species concepts and definitions. In The Species Problem. **American Association for the Advancement of Science**, Washington, D.C.: E. Mayr Ed., 1957. p. 371-388.

MCALLISTER, T.A.; YANKE, L.J.; INGLIS, G.D.; OLSON, M.E. Is antibiotic use in dairy cattle causing antibiotic resistance? **Advances in Dairy Technology**, v.13, p.229-147, 2001.

MCDUGALL, S.; AGNEW, K.E.; CURSONS, R.; HOU, X.X.; COMPTON, C.R.W. Parenteral treatment of clinical mastitis with tylosin base or penethamate hydriodide in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.90, p. 779-789, 2007.

MENNINGER, J.; OTTO, D. Erythromycin, carbomycin and spiramycin inhibit protein synthesis by stimulating the dissociation of peptidyl-tRNA from ribosomes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p.811-818, may, 1982.

MIRA, A.; OCHMAN, H.; MORAN, N.A. Deletional bias and the evolution of bacterial genomes. **Trends in Genetics**, v. 17, p.589– 596, 2001.

MOREIRA, M.A.S.; OLIVEIRA, J.A.; TEIXEIRA, L.M.; MORAES, C.A. Detection of a chloramphenicol efflux system in *Escherichia coli* isolated from poultry carcass. **Veterinary Microbiology**, V. 109, Issues 1-2, p.75-81, aug., 2005.

MYLLYS, V.K.; ASPLUND, K.; BROFELDET, E.; HIVERLÄ-KOSKI, V.; HONKANEN-BUZALSKI, T.; JUNTILA, L.; MYLLYKANGAS, O.; NISKANEN, M.; SANDHOLM, M.; SARAMPAA, T. Bovine mastitis in Finland in 1988 and 1995-Changes in prevalence and antimicrobial resistance. **Acta Veterinaria**, v.39, p.119-126, 1998.

National Committee for Clinical Laboratory Standards, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility testing; Twelfth informational supplement M100-512, v.22, n° 01., 2001. – NCCLS.

NETTO, D.P.; LOPES, M.O.; OLIVEIRA, M.C.S.; NUNES, M.P.; MACHINSKI JUNIOR, M.; BOSQUIROLI, S.L.; BENATTO, A.; BENINI, A.; BOMBARDELLI, A.L.C.; FILHO,

D.V.; MACHADO, E.; BELMONTE, I.L.; ALBERTON, M.; PEDROSO, P.P.; SCUCATO, E.S. Levantamento dos principais fármacos utilizados no rebanho leiteiro do Estado do Paraná. **Acta Scientiarum. Animal Sciences** Maringá, v.27, n.1, p.145-151, Jan./March, 2005.

O'MAHONY, R.; ABBOTT, Y.; LEONARD, F.C.; MARKEY, B.K.; QUINN, P.J.; POLLOCK, P.J.; FANNING, S.; ROSSNEY, A.S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from animals and veterinary personnel in Ireland. **Veterinary Microbiology**, v.109, p. 285-296, 2005.

OCHMAN, H.; LAWRENCE, J.G.; GROISMAN, E.A. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. **Nature**, v. 405, p. 299–304, 2000.

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 of Dairy Science**, v. 83, p. 855-862, 2000.

OLSEN, G. J. The earliest phylogenetic branchings: comparing rRNA-based evolutionary trees inferred with various techniques. **Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology**, v. 52, p. 825-838, 1987.

OLSEN, G. J.; WOESE, C. R. A briefnote concerning archaebacterial phylogeny. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 35, p.119-123, 1989.

OLSEN, G. J.; WOESE, C. R. Ribosomal RNA: a key to phylogeny. **The FASEB Journal**, v.7, p.113-123, 1993.

OLSEN, J.E.; CHRISTENSEN, H.; AARESTRUP, F.M. Diversity and evolution of *blaZ* from *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.57, p.450-460, jan., 2006.

PAGE, M.I. Understanding metallo- β -lactamases. **American Society of Microbiology News**, v.68, p.217-21, 2002.

PHILLIPS, I.; CASEWELL, M.; COX, T.; DE GROOT, B.; FRIIS, C.; JONES, R.; NIGHTINGALE, C.; PRESTON, R.; WADDELL, J. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.53, p.28–52, 2004.

POULSEN, S. M.; KOFOED, C.; VESTER, B. Inhibition of the ribosomal peptidyl transferase reaction by the mycarose moiety of the antibiotics carbomycin, spiramycin and tylosin. **Journal of Molecular Biology**, v.304, n.3, p.471-481, 2000.

PROSSER, J. I.; BOHANNAN, B. J. M.; CURTIS, T. P.; ELLIS, R. J.; FIRESTONE, M. K.; RECKLETON, R. P.; GREEN, J. L.; GREE, L. E.; HILLHAM, K.; LENNON, J. K.; OSBORN, A. M.; SOLAN, M.; VAN DER GAST, C. J.; YOUNG, J. P. W. The role of ecological theory in microbial ecology. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, p.384-392, 2007.

- RETSEMA, J.; FU, W. Macrolides: structures and microbial targets. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.18, p.3-10, 2001.
- ROBERSON, J.R.; FOX, L.K.; HANCOCK, D.D.; GAY, J.M.; BESSER, T.E. Ecology of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on dairy farms. **Journal of Dairy Science**, v.77, p.3354-3364, 1994.
- ROBERTS, M.; SUTCLIFFE, J.; COURVALIN, P.; JENSE, L.B.; ROOD, J.; SEPALLA, H. Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p.2823-2830, dec., 1999.
- ROSS, J.I.; EADY, E.A.; COVE, J.H.; CUNLIFFE, W.J.; BAUMBERG, S.; WOOTTON, J.C. Inducible erythromycin resistance in staphylococci is encoded by a member of the ATP-binding transport super-gene family. **Molecular Microbiology**, v.4, n.7, p.1207–1214, jul., 1990.
- ROSS, J.I.; FARREL, A.M.; EADY, E.A.; COVE, J.H.; CUNLIFFE, W.J. Characterization and molecular cloning of the novel macrolide-streptogramin B resistant determinant from *Staphylococcus epidermidis*. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.24, p.851-862, 1989.
- SAMAHA-KFOURY, J.; ARAJ, G.F. Recent developments in β lactamases and extended spectrum β lactamases. **British Medical Journal**, v. 327, n.7425, p.1209–1213, nov., 2003.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a laboratory Manual**. 2nd ed. Cold Spring Harbor Press, New York, 1989.
- SCHABERG, D. R.; CLEWELL, D. B.; GLATZER, L. Conjugative transfer of R-plasmids from *Streptococcus faecalis* to *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 22, n. 2, p. 204-207, 1982.
- SCHLÜNZEN, F.; ZARIVACH, R.; HARMS, J.; BASHAN, A.; TOCILJ, A.; ALBRECHT, R.; ADA YONATH, A.; FRANCESC'HI, F. Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria. **Nature**, v.413, p.814-82, 2001.
- SCHMITZ, F.J.; PETRIDOU, J.; ASTFALK, N.; KÖHRER, K.; SCHERING, S.; SCHAWARZ, S. Molecular analysis of constitutively expressed (*ermC*) genes selected in vitro by incubation in the presence of the non-inducers quinupristin, telithromycin, or ABT-773. **Microbial Drug Resistance**, v.8, p.171-177, 2002.
- SMITH, D.L.; DUSHOFF, J.; MORRIS, J.G. Agricultural antibiotics and human health. **PLoS Medicine**, v.2, n.8 e232, p.731-735, aug., 2005.
- SNEL, B., BORK, P.; HUYNEN, M.A. Genomes in flux: the evolution of archaeal and proteobacterial gene content. **Genome Research**, v. p. 12, 17–25, 2002.

SOGIN, M. L.; MORRISON, H.G. HUBER J.A.; WELCH, D. M.; HUSE, S. M.; NEAL, P.R.; ARRIETA, J. M.; HERNDL, G, J. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". **Proceeding Natl. Acad. Sci. USA**. v. 103, p. 12115-12120, 2006.

SORENSEN, S.J.; SORENSEN, A.H.; HANSEN, L.H.; OREGAARD, G.; VEAL, D. Direct detection and quantification of horizontal gene transfer by using flow cytometry and gfp as a reporter gene. **Current Opinion In Microbiology**, v. 47, p. 129–133, 2003.

STACKEBRANDT, E.; FREDERIKSEN, W.; GARRITY, G.M.; GRIMONT, P.A.; KAMPFER, P.; MAIDEN, M.C.; NESME, X.; ROSSELLO-MORA, R.; SWINGS, J.; TRUPER, H.G.; VAUTERIN, L.; WARD, A.C.; WHITMAN, W.B. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.52, p.1043–1047, 2002.

STRATTON, C.W. Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. **The Lebanese Medical Journal**, v.48, p.186-98, 2000.

SUNG, J. M. L.; LLOYD, D. H.; LINDSAY, J. A. *Staphylococcus aureus* host specificity: comparative genomics of human versus animal isolates by multi-strain microarray. **Microbiology**, v. 154, p. 1949-1959, 2008.

SUYAMA, M.; BORK, P. Evolution of prokaryotic gene order: genome rearrangements in closely related species. **Trends Genetics**, v. 17, p.10–13, 2001.

TAIT-KAMRADT, A.; DAVIES, T.; APPELBAUM, P.C.; DEPARDIEU, F.; COURVALIN, P.; PETITPAS, J.; WONDRACK, L.; WALKER, A.; JACOBS, M.R.; SUTCLIFFE, J. Two New Mechanisms of Macrolide Resistance in Clinical Strains of *Streptococcus pneumoniae* from Eastern Europe and North America. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.44, n.12, p.3395-3401, dec., 2000.

TAKARASHI, T.; SATOH, I.; KIKUCHI, N. Phylogenetic relationships of 38 of the genus *Staphylococcus* based on 16S rRNA gene sequence analysis. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49, p. 725-728, 1999.

TAMURA, K; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics analysis (MEGA) software version 4.0 **Molecular Biology and Evolution**, v.24, p.1596-1599, 2007.

TEKAIA, F.; GORDON, S.V.; GARNIER, T.; BROSCHE, R.; BARRELL, B.G.; COLE, S.T. Analysis of the proteome of *Mycobacterium tuberculosis* in silico. **Tubercle and Lung Disease**, v. 79, p. 329–342, 1999.

THRELFALL, E.J. Antimicrobial drug resistance in *Salmonella*: problems and perspectives in food- and water-borne infections. **FEMS Microbiology Reviews**, v.26, p.141–148, 2002.

TIKOFKY, L.L.; LOCH, I.M.; ZADOKS, R.N. Molecular Methods in Antimicrobial Resistance of Mastitis Pathogens. In: ZADOKS, R.N. **Molecular Methods in Milk Quality. Milk Quality Production Services**, Cornell University, Ithaca, NY, 2004.

VAN BERKUN, P.; FUHRMANN, J. J.; EARDLY, B.D. Phylogeny of Rhizobia. In: PEDROSA, F.O.; HUNGRIA, M.; YATES, G.; NEWTON, W.E. **NITROGEN FIXATION: FROM MOLECULES TO CROP PRODUCTIVITY**. Foz do Iguaçu: Kluwer Academic Publishers, p 3-8, 2000.

VAN DUIJKEREN, E.; WOLFHAGEN, M.J.H.M.; BOX, A.T.A.; HECK, M.E.O.C.; WANNET, W.J.B.; FLUIT, A.C. Human-to-dog transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Emerging Infectious Diseases**, v.10, p.2235-2237, 2004.

VAN GRIETHUYSEN, A.; VAN LOO, I.; VAN BELKUM, A.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C.; WANNET, W.; VAN KEULEN, P.; KLUYTMANS, J. Loss of the *mecA* gene during storage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.3, p. 1361-1365, mar., 2005.

VAN HOUWELING, C.D.; KINGMA, F.J. The use of drugs in animals raised for food. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.155, n.12, p. 2197-2200, dec., 1969.

VANDEPOELE, K.; DE VOS, W.; TAYLOR, J.S.; MEYER, A.; VAN DE PEER, Y. Major events in the genome evolution of vertebrates: paranome age and size differs considerably between fishes and land vertebrates. **The Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.101, p. 1638-1643, 2004.

VAZQUEZ, D. The macrolide antibiotics. In J. W. Corcoran, and F. E. Hahn (ed.), Antibiotics III. **Mechanism of action of antimicrobial and antitumor agents**. Springer-Verlag, New York, N.Y., p.459-479, 1975.

VETER, B.; DOUTHWAITE, S. Macrolide resistance conferred by base substitutions in 23S rRNA. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.45, n.1, p.1-12, jan., 2001.

VOLANDRI, R.K.; KERNODLE, D.S. Characterization of a chromosomal gene encoding type B beta-lactamase in phage group II isolates of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.42, p.3163-3168, 1998.

WALSH, C. **Antibiotics: actions, origins, resistance**. Washington, DC: ASM Press, 2003, 335p.

WARD, D.M. A natural species concept for prokaryotes. **Current Opinion In Microbiology**, v. 1, p. 271-277, 1998.

WATANAKUNAKORN, C. Clindamycin therapy of *Staphylococcus aureus* endocarditis. Clinical relapse and development of resistance to clindamycin, lincomycin, and erythromycin. **The American Journal of Medicine**, v.60, p.419-425, 1976.

WEESE, J. S.; ARCHAMBAULT, M.; WILLEY, B. M.; HEARN, P.; KREISWIRTH, B. N.; SAID-SALIM, B.; MCGEER, A.; LIKHOSHVAY, Y.; PRESCOTT, J. F.; LOW, D. E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in horses and horse personnel, 2000–2002. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, p.430–435, 2005.

WEESE, J.S.; CALDWELL, F.; WILLEY, B.M.; KREISWIRTH, B.N.; MCGEER, A.; ROUSSEAU, J.; LOW, D.E. An outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin infections resulting from horse to human transmission in a veterinary hospital. **Veterinary Microbiology**, v.114, p.160-164, 2006a.

WEESE, J.S.; DICK, H.; WILLEY, B.M.; MCGEER, A.; KREISWIRTH, B.N.; INNIS, B.; LOW, D.E. Suspected transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between domestic pets and humans in veterinary clinics and in the household. **Veterinary Microbiology** v.115, p.148-155, 2006b.

WEISBLUM, B. Insights into erythromycin action from studies of its activity as inducer of resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p.797-805, apr., 1995.

WERCKENTHIN, C.; SCHWARZ, S.; WESTH, H. Structural alterations in the translational attenuator of constitutively expressed *ermC* genes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p.1681-1685, jul., 1999.

WILKE, M.S.; HILLS, T.L.; ZHANG, H.Z.; CHAMBERS, H.F.; STRYNADKA, N.C. Crystal structures of the Apo and penicillinacylated forms of the BlaR1 β -lactam sensor of *Staphylococcus aureus*. **The Journal of Biological Chemistry**, v.279, p.47278–47287, 2004.

WILKE, M.S.; LOVERING, A.L.; STRYNADKA, N.C.J. β -Lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. **Current Opinion in Microbiology**, v.8, Issue 5, p.525-533, oct., 2005.

WOESE, C. R. Bacterial Evolution. **Microbiological Reviews**, v. 51, n. 2, p 221-271, 1987.

WOESE, C.R.; STACKEBRANDT, E.; LUDWIG, W. What are Mycoplasmas – the relationship of tempo and mode in bacterial evolution. **Journal of Molecular Evolution**, v. 21, p. 305–316, 1985.

WOMMER, S.; RIVAL, S.; HEINZ, U.; GALLEN, M.; FRERE, J.M.; FRANCESCHINI, N.; AMICOSANTE, G.; RASMUSSEN, B.; BAUER, R.; ADOLPH, H.W. Substrate-activated zinc binding of metallo-beta-lactamases: physiological importance of mononuclear enzymes, **The Journal of Biological Chemistry**, v.277, p.24142–24147, 2002.

WRIGHT, G. D. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, p. 175-186, mar., 2007.

YOSHIMURA, H.; ISHIMARU, M.; KOJIMA, A. Minimum inhibitory concentrations of 20 antimicrobial agents against *Staphylococcus aureus* isolated from

bovine intramammary infections in Japan. **Journal of Veterinary Medicine**, série B, v.49, p. 457-460, 2002.

YOUNG, J. P. W. Taxonomy and Evolution of Diazotrophs. In: PEDROSA, F.O.; HUNGRIA, M.; YATES, G.; NEWTON, W.E. **NITROGEN FIXATION: FROM MOLECULES TO CROP PRODUCTIVITY**. Foz do Iguaçu: Kluwer Academic Publishers, 2000.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)