

Resumo 108 - DETECÇÃO DO GENE *blaZ* E DE BETALACTAMASE EM
Staphylococcus aureus ISOLADOS DE MASTITE BOVINA.

blaZ GEN AND BETALACTAMASE DETECTION OF *Staphylococcus aureus*
ISOLATED FROM BOVINE MASTITIS.

Caroline Lopes Martini¹; Deividly Kellvy Barreto²; Alessandra Pereira Sant'Anna Salimena³;
Carla Christine Lange⁴; Eliana Knackfuss Vaz⁵; Marcos Aurélio Souto Silva⁶

¹ Doutoranda em Ciências (Microbiologia), Microbiologia Médica, UFRJ/Rio de Janeiro, carolinemartinivet@gmail.com
² Aluno de IC, UNIPAC- EMBRAPA/Juiz de Fora, deividlybarreto@gmail.com ³ Doutoranda em Microbiologia Agrícola,
UFLA/Lavras-MG, alessandrasalimena@yahoo.com.br ⁴ Pesquisadora, Laboratório de Microbiologia do Leite,
EMBRAPA/Juiz de Fora-MG, carla.lange@embrapa.br ⁵ Professora do departamento de Medicina
Veterinária, UDESC/Lages-SC, eliana@cav.udesc.br ⁶ Técnico em Laboratório, Laboratório de Microbiologia do Leite,
EMBRAPA/Juiz de Fora-MG, marcos.souto@embrapa.br

Introdução: *Staphylococcus aureus* é o principal agente causador de mastite bovina, principal doença que acomete bovinos leiteiros e para o seu tratamento, o uso de antimicrobianos é recomendado. A penicilina foi o primeiro antimicrobiano desenvolvido sendo amplamente usado na medicina humana e veterinária. Conquanto, imediatamente no ano de 1942 foram relatados *S. aureus* resistentes ao princípio ativo devido à produção de betalactamases. A resistência ocorre devido à aquisição de genes de resistência em populações de bactérias inicialmente sensíveis ao antimicrobiano, gerando cepas resistentes emergentes. A produção de enzima betalactamase é um dos mecanismos que geram resistência aos betalactâmicos. Além desse mecanismo, a resistência pode ser gerada devido à expressão de proteínas ligadoras de penicilina secundárias e a impossibilidade da droga alcançar seu sítio alvo devido características estruturais, principalmente em Gram negativas. As enzimas betalactamases geram resistência aos antibióticos betalactâmicos, pois interagem com as moléculas betalactâmicas cataliticamente rompendo o anel betalactâmico, formando um composto peniciloil- β -lactamase, que é hidrolisado, gerando antibiótico inativo com o anel betalactâmico aberto e a betalactamase. O gene *blaZ* em *S. aureus* é responsável pela codificação de betalactamases e a detecção do gene (PCR) e da enzima (teste fenotípico) permite fornecer informações importantes de caráter clínico e epidemiológico, permitindo esclarecer resultados de testes de susceptibilidade em amostras limítrofes (CIM 0,06 – 0,25 $\mu\text{g/mL}$) para penicilina.

Materiais e Métodos: Noventa amostras de *Staphylococcus aureus* foram selecionadas com base no perfil de susceptibilidade à ampicilina e penicilina (disco-difusão em ágar), de um total de 266 amostras isoladas de quartos mamários de vacas de dez propriedades leiteiras da Zona da Mata de Minas Gerais, entre os anos de 2008 a 2010. Das 90 amostras apenas oito apresentavam susceptibilidade aos antimicrobianos penicilina e ampicilina. Os procedimentos de isolamento e identificação das amostras seguiram os métodos fenotípicos clássicos (coloração de Gram e testes bioquímicos). A confirmação da espécie foi feita pela amplificação de um fragmento do gene *femA* específico para *S. aureus* pela reação de PCR. Para tal foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores descritos por Mehrotra et al. (2000), que amplificam um fragmento do gene *femA* de 132 pares de bases (pb). A determinação da produção da enzima betalactamase foi realizada com o uso de discos de Cefinase™ (BBL™ Cefinase™ Discs, Franklin Lates, New Jersey, USA). E seguindo as recomendações da American Society of Microbiology, todas as amostras que apresentaram resultado negativo foram incubadas com discos de oxacilina (1 μg) em ágar Mueller-Hinton por 24 horas a 35°C, para observar a produção indutiva de betalactamase. Foi realizado a extração de DNA genômico das amostras foi realizada de acordo com Hesselbarth e Schwarz (1995). O DNA

foi quantificado em espectrofotômetro (Thermo Scientific NanoDrop 2000c) e as quantidades ajustadas para a reação de PCR (50-100 ng/μl). Dessa forma, as amostras foram submetidas à reação de PCR para identificação do marcador molecular de resistência à penicilina, o gene *blaZ*. Um segmento de 518 pb do gene foi amplificado utilizando os primers descritos por Vesterholm-Nielsen et al. (1999). As reações foram realizadas em termociclador (GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystems) e os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados após eletroforese em gel de agarose (1,5%, p/v), corados com solução de brometo de etídio (0,005%, p/v). O registro das imagens foi feito em fotodocumentador (Eagle Eye II, Stratagene). Para confirmação da detecção do gene *blaZ* foi realizado o sequenciamento parcial de um produto do gene amplificado na reação de PCR através do método de dideoxi. As sequências consenso resultantes foram comparadas com sequências bacterianas depositadas no banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information) e analisadas pelo programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*).

Resultados e Discussão: Das 90 amostras testadas, o teste de produção de betalactamase permitiu detectar a enzima em 78 (86,7%) amostras. Destas 78 amostras, sete (7,8%) produziram betalactamase somente após indução com oxacilina. *S. aureus* podem produzir betalactamase constitutivamente, mas algumas cepas só produzem quantidades detectáveis após exposição a um agente indutor (antibiótico betalactâmico). Para classificar amostras de estafilococos como susceptíveis ou resistentes à penicilina, as mesmas podem ser testadas quanto à produção de betalactamase. Desse modo, para atestar a sensibilidade à penicilina é importante verificar as estirpes com resultados CIM limítrofes (0,06 - 0,25 μg/mL). Embora, mesmo amostras que apresentam valores de CIM de < 0,06 μg/mL podem apresentar o gene *blaZ*, que determina a resistência à penicilina. O gene *blaZ* apresentou-se amplamente disseminado entre as amostras, nas quais 88 (97,7%) foram positivas para o gene. O resultado do sequenciamento confirmou a detecção do gene, sendo obtido 100% de similaridade e e-value 0.0 no produto de PCR testado. Dez amostras foram positivas para *blaZ*, mas não foi detectada a produção de betalactamase. Além disso, amostras de *S. aureus* podem ser fenotipicamente sensíveis nos testes laboratoriais (CIM e disco-difusão em ágar) apesar de apresentarem em seu material genético o gene *blaZ*. Múltiplos fatores podem ser responsáveis por estas situações, como a ausência do complexo completo de genes reguladores (*blaZ-blaRI-blaI*), a localização do gene em local de não codificação do cromossomo, e a quantidade produzida de enzima não ser detectável através do teste.

Conclusão: O gene *blaZ* encontra-se amplamente disseminado entre as amostras estudadas e a enzima betalactamase foi detectada em um grande número de amostras. Estudos sobre o caráter fenotípico e molecular de condições que geram a resistência aos antimicrobianos em *S. aureus* devem ser realizados para estabelecer medidas de controle e terapêuticas adequadas.

Referência bibliográfica:

- VESTERHOLM-NIELSEN M, LARSEN MO, OLSEN JE, AARESTRUP FM. Occurrence of the *blaZ* in penicillin resistance *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Denmark. A. Vet.Scand. 1999; 40: 279-86.
- MEHROTRA M, WANG G, JOHNSON W M. Multiplex PCR for the detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin, and methicillin resistance. J. Clin. Microb. 2000; 38: 1032-41.
- HESSELBARTH, J.; SCHWARZ, S. Comparative ribotyping of *Staphylococcus intermedius* from dogs, pigeons, horses and mink. Veterinary Microbiol.1995; 45: 11-7.