

**RESUMO 85 - CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE LINHAGENS DE *Streptococcus agalactiae* RESISTENTES À GENTAMICINA ISOLADAS DE AMOSTRAS DE LEITE BOVINO**

Junnia Luisa Pena<sup>1</sup>, Paula Aparecida Azevedo Almeida<sup>2</sup>, Bianca de Oliveira Hosken<sup>2</sup>, Maria Aparecida Vasconcelos Paiva e Brito<sup>3</sup>, Maurílio Lopes Martins<sup>4</sup>, Guilherme Nunes de Souza<sup>3</sup>, Márcio Roberto Silva<sup>3</sup>, João Batista Ribeiro<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Medicina Veterinária, Viçosa, Minas Gerais, Brazil,

<sup>2</sup>Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil,

<sup>3</sup>Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil, <sup>4</sup>Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Rio Pomba, Minas Gerais, Brazil

**INTRODUÇÃO:**

*Streptococcus agalactiae* está frequentemente associado à mastite subclínica, redução da produção de leite e risco de disseminação para os outros animais do rebanho. O conhecimento do perfil fenotípico e genotípico da resistência antimicrobiana em linhagens de *S. agalactiae* presentes nos rebanhos pode contribuir para o seu controle.

Embora *S. agalactiae* seja um patógeno passível de erradicação dos rebanhos, o uso indiscriminado de antimicrobianos no tratamento da mastite pode aumentar a pressão seletiva levando à emergência de linhagens com resistência múltipla. A resistência à gentamicina tem sido relatada em cepas de *Streptococcus* do grupo B, isoladas de humanos de peixes e de bovinos com mastite.

Considerando a escassez de dados sobre resistência à gentamicina em patógenos da mastite no Brasil, o objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil de susceptibilidade à gentamicina em cepas de *S. agalactiae* isoladas de mastite bovina, bem como identificar os determinantes genéticos envolvidos na resistência a aminoglicosídeos neste patógeno.

**MATERIAIS E MÉTODOS:**

Foram utilizadas 74 linhagens de *S. agalactiae* isoladas a partir de amostras de leite bovino provenientes de 10 rebanhos bovinos da região da Zona da Mata Mineira (de 2009 a 2011) e quatro linhagens de *Staphylococcus spp.*, pertencentes à Coleção de Microrganismos de Interesse da Agroindústria e Pecuária da Embrapa sediada na Embrapa Gado de Leite.

A avaliação do fenótipo de resistência à gentamicina foi realizada pelo método de difusão em discos sendo as bactérias classificadas como resistentes ou susceptíveis ao antimicrobiano de acordo com as medidas dos halos de inibição do crescimento bacteriano ao redor dos discos do antibiótico (CLSI, 2013). A extração de DNA das linhagens resistentes à gentamicina foi realizada por protocolo interno utilizando fenol/clorofórmio.

Os genes *aacA-aphD*, *ant(4')-Ia*, *aph(3')-IIIa*, *aac(6')/aph(2')* e *aad(6')* de resistência a aminoglicosídeos foram detectados, por PCR, em linhagens de *S. aureus* e *S. epidermidis* previamente caracterizadas como multirresistentes e, em seguida, amostras de DNA das mesmas foram utilizadas como controle positivo na investigação da presença destes genes nas linhagens de *S. agalactiae* consideradas resistentes à gentamicina. A composição e as condições das reações foram previamente descritas por Strommenger et al. 2003, Schmitz et al. 1999, Laplana et al. 2007 e Poyart et al. 2003. Para determinar as sequências de nucleotídeos dos fragmentos de DNA foi utilizada a técnica de terminação da cadeia de Sanger.

**RESULTADOS E DISCUSSÃO:**

Das 74 linhagens de *S. agalactiae* analisadas, 25(33,78%) foram consideradas fenotipicamente susceptíveis e 49(66,21%) resistentes à gentamicina. Num estudo realizado na China com 55 amostras de *S. agalactiae* isolados de bovinos com mastite, verificou-se que 29,4% eram resistentes à gentamicina (GAO et al., 2012). Rato et al. (2013) relataram 93,3% de resistência a esse antimicrobiano numa população de *S. agalactiae*

(n=60) isolada de bovinos em Portugal. Um relato recente demonstrou que todas as 27 linhagens dessa bactéria isoladas na Polônia eram resistentes a este antimicrobiano (KACZOREK et al.,2017). Isso confirma a grande variação nas taxas de resistência a gentamicina em *S.agalactiae* de origem bovina conforme a região, ressaltando a necessidade de estudos espacialmente planejados com foco em resistência bacteriana a antibióticos.

Todas 49 bactérias resistentes à gentamicina foram avaliadas quanto à presença dos genes *aacA-aphD*, *ant(4')-Ia*, *aph(3')-IIIa*, *aac(6')/aph(2')* e *aad(6')* sendo identificado apenas o gene *aacA-aphD* em 21(42,86%) das linhagens, sugerindo que a resistência à gentamicina pode ser devida à atividade de acetiltransferase e/ou fosfotransferase da enzima bifuncional codificada pelo gene *aacA-aphD*. Todos genes supramencionados foram amplificados em amostras de DNA de linhagens de *Staphylococcus* spp. e utilizadas como controles positivos nas análises.

As sequências nucleotídicas dos amplicons correspondentes aos genes obtidos para *Staphylococcus* spp. e para linhagens representativas de *S.agalactiae* apresentaram 100% de identidade com genes (*aacA-aphD*, *ant(4')-Ia*, *aph(3')-IIIa*, *aac(6')/aph(2')* e *aad(6')*) depositados no NCBI. Ao que nos consta, este é o primeiro relato da presença do gene *aacA-aphD* em estirpes de *S.agalactiae* isoladas de mastite bovina no Brasil. Entretanto, a presença desse gene em *S.agalactiae* de origem bovina já foi relatada em outros países. O fato de nenhum dos genes investigados ter sido detectado em 28 linhagens resistentes à gentamicina indica a existência de outros mecanismos de resistência nos isolados investigados neste trabalho, além da provável ação da enzima bifuncional (acetiltransferase e/ou fosfotransferase). Estudos adicionais serão realizados para melhor compreensão do *background* genético da resistência à gentamicina nessas linhagens.

### CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Das 74 linhagens de *S. agalactiae* analisadas, 49 (66,21%) foram consideradas resistentes à gentamicina. Os genes *ant(4')-Ia*, *aph(3')-IIIa* e *aad-6* não foram detectados e o gene *aacA-aphD* foi detectado em 42,86% (n=21) das linhagens de *S. agalactiae* resistentes à gentamicina (n=49). Além da provável atuação da enzima bifuncional (acetiltransferase/fosfotransferase), algum(ns) outro(s) mecanismo(s) molecular(es) deve(m) estar associado(s) a resistência à gentamicina em linhagens *S. agalactiae* causadoras de mastite em rebanhos bovinos na região da Zona da Mata Mineira.

### AGRADECIMENTOS

À EMBRAPA (Projeto 03.13.14.006.00.00) e ao CNPq (Processo 578430/2008-8).

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- STROMMINGER,B., KETTLITZ,C., WERNER,G., WITTE,W; Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *S.aureus* **J Clin Microbiol**; 41(9):4089-94,2003.
- LAPLANA,L.M., et al.; Molecular typing of *S.aureus* clinical isolates by pulsed-field gel electrophoresis, staphylococcal cassette chromosome mec type determination and dissemination of antibiotic resistance genes. **J Antimicrob Agents**; 30(6):505-13,2007.
- POYART,C., et al.; Genetic Basis of Antibiotic Resistance in *S.agalactiae* Strains Isolated in a French Hospital; **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 47(2):794-7,2003.