

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

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 sequências 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.