

Capítulo 18

Presença do gene *blaZ* em isolados de *Staphylococcus aureus* resistentes a Beta-lactâmicos provenientes de leite e queijo

Laura Francielle Ferreira Borges*¹; Ester Dias Xavier²; Edmara Andrade Macedo Cruz³; Cintya Neves de Souza⁴; Geziella Aurea Aparecida Damasceno Souza⁵; Demerson Arruda Sanglard⁶

Resumo

Responsável por grandes perdas econômicas relacionadas à produção de leite, a mastite bovina possui como um de seus principais causadores da doença a bactéria *Staphylococcus aureus*. Para seu controle são utilizados diversos antibióticos, destacando-se o da classe de beta-lactâmicos, que quando aplicados de maneira indiscriminada podem levar seus resíduos para o leite e conferir resistência bacteriana. Assim, objetivou-se rastrear o gene *blaZ* responsável pela resistência a beta-lactâmico em *S. aureus*. Vinte e um *S. aureus* resistentes a beta-lactâmicos oriundos de leite de vacas com mastite subclínica, e três provenientes de amostras de queijo, foram submetidos à verificação da presença do gene de resistência a penicilina (beta-lactâmicos) *blaZ*, por meio da técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). O gene *blaZ* com amplicons de 377 pares de bases esteve presente em 25% das bactérias. O *blaZ* é um dos genes responsáveis pela produção de beta-lactamase, enzima que atua na degradação do anel beta-lactâmico do antibiótico, sendo responsável pela resistência bacteriana. Os resultados sugerem que o gene *blaZ* conduz a resistência de bactérias da espécie *S. aureus* aos antibióticos beta-lactâmicos, porém não é a única forma de detecção genotípica dessa resistência, sendo necessário novas pesquisas de rastreamento de outros genes ou outros mecanismos de resistência microbiana.

Palavras-chave: Beta-lactâmico. Gene de Resistência. PCR.

¹Graduanda em Engenharia de Alimentos, Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais.

²Graduanda Zootecnia, Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais.

³Graduanda Zootecnia, Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais.

⁴Técnica em Laboratório, Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais.

⁵Mestranda em Produção Animal, Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais.

⁶Docente, Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais

*Autor para correspondência: lauraborges4@outlook.com

Introdução

Ocasionalmente severas perdas econômicas para a indústria de laticínios, a mastite bovina tem como um dos principais patógenos a bactéria *Staphylococcus aureus*. Para o controle da doença, são utilizados diversos antibióticos, que utilizados de maneira indiscriminada podem gerar bactérias resistentes com potencial de transferência dessa resistência para outras bactérias, incluindo espécies diferentes.

A maioria dos antibióticos que a bactéria *S. aureus* é resistente pertence à classe dos beta-lactâmicos. Os beta-lactâmicos são uma extensa classe de antibióticos, o qual inclui a penicilina e seus derivados que contêm um anel beta-lactâmico em sua estrutura molecular. Estes medicamentos agem por meio da inibição da síntese da parede celular das bactérias, impedindo a ligação cruzada dos peptidoglicanos, substância que confere proteção ao microrganismo (LEE *et al.*, 2012).

O principal mecanismo de resistência bacteriana a estes antibióticos é através da produção de beta-lactamases, que são enzimas que atuam degradando o antimicrobiano através de uma reação de hidrólise, sendo o gene *blaZ* o responsável pela produção destas enzimas (MACEDO *et al.*, 2005).

A resistência bacteriana aos mais diversos antimicrobianos tem se tornado recorrente e leva a dificuldades no tratamento de enfermidades comuns, sendo assim uma grande preocupação a saúde tanto dos animais quanto dos consumidores de seus produtos (PEREIRA; SCUSSEL, 2017).

O objetivo do presente estudo foi através de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), detectar a presença do gene *blaZ* em *S. aureus* provenientes de leite e queijo.

Material e métodos

Vinte e quatro isolados da bactéria *Staphylococcus aureus* resistentes a diversos antibióticos da classe dos beta-lactâmicos (21 provenientes de amostras de leite de vacas com mastite subclínica e 3 amostras isoladas de queijos), previamente identificados por meio da técnica de PCR (OLIVEIRA *et al.*, 2016; XAVIER *et al.*, 2017) foram ativados em meio TSB e submetidos à extração de DNA pelo método de digestão por proteinase K, seguidas por fenol-clorofórmio conforme protocolo proposto por Gu *et al.*, (2004) e analisados quanto a presença do gene *blaZ*.

Para o rastreamento do gene *blaZ* de resistência a beta-lactâmicos, foram utilizados os primers *blaZF* 5'-TTAAAGTCTTACCGAAAGCAG-3' e *blaZR* 5'-TAAGAGATTTGCCTATGCTT-3', sintetizados pela *Integrad DNA Technology USA* (OLSEN *et al.*, 2006; BAGCIGIL *et al.*, 2012). O controle dos testes foi utilizado a cepa padrão *Staphylococcus aureus* ATCC 43300. As reações foram

realizadas em um mix contendo 3,5µl MgCl₂, 1,0µl DNTP, 0,1µl Taq polimerase Ludwig, 12,9µl H₂O estéril, 1,0µl de cada *primer*, 2,5µl Tris e 3µl de cada DNA bacteriano (50ng/µL), totalizando um volume final de 25,0µl. As condições do termociclador foram utilizadas conforme proposto por Olsen *et al.*, 2006 e Bagcigil *et al.*, 2012 com modificações. A eletroforese do produto da amplificação foi realizada em gel de agarose a 1,5% corado com gel rede os resultados fotodocumentados.

Resultados e discussão

O gene *blaZ* esteve presente em 25% dos *Staphylococcus aureus* resistentes a beta-lactâmicos avaliados. As pequenas diferenças no padrão (tamanho) das bandas quando comparadas ao controle ocorrerem devido a presença de pequenas mutações que podem estar presentes (Figura 1). Porém essa diferença não determina a possibilidade de outro gene que não o *blaZ*.

Figura 1 - PCR para identificação do gene *blaZ* sobre as amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de leite mastítico e queijos.



Legenda: M: Marcador de massa molecular DNA de 100 pares de base (Cellco); Linhas 1 a 21: *S. aureus* provenientes de leite. Linha 22 a 24: *S. aureus* provenientes de amostras de queijo. A linha C+ representa o controle positivo (*S. aureus* ATCC 43300). Gel de agarose a 1,5%.

Fonte: Dos autores, 2019.

A resistência fenotípica previamente detectada nos isolados de *S. aureus* avaliados não está necessariamente ligada a presença do gene *blaZ*, pois não foram todos os isolados que apresentaram

a amplificação de 377pb correspondente ao gene *blaZ*. Martini *et al.* (2017), em seu estudo de caracterização da resistência de *S. aureus* aos antimicrobianos penicilina e tetraciclina, também não encontraram o gene *blaZ* em todos os seus isolados, mas em mais de 90% deles. Já Ferreira *et al.* (2017) detectou o gene em todos os seu isolados de *S. aureus* fenotipicamente resistentes a penicilina.

Quando se trata de resistência a antibióticos, um dos fatores a ser observado, é a presença de genes de resistência nos micro-organismos presentes, que por ventura podem ser expressos e vir a bloquear a ação dos produtos (VIEIRA *et al.*, 2018). A baixa porcentagem de positivos para o gene *blaZ* neste experimento indica que pode-se haver outros genes responsáveis pela resistência bacteriana aos antibióticos beta-lactâmicos.

A resistência fenotípica previamente detectada nos isolados de *S. aureus* pode além de outros genes, também ter sido causada por pontos de mutação ou por formação de biofilmes (YANG *et al.*, 2015)

A detecção do gene *blaZ* foi observada por Olsen *et al.* (2006), em 143 isolados de *S. aureus* resistentes a penicilina. Os mesmos autores sugerem que o gene *blaZ* seria um mecanismo de resistência em *Staphylococcus*, já que ele foi detectado tanto em *S. aureus*, quanto em *Staphylococcus* coagulase negativo. Esse gene pode ainda estar localizado tanto cromossomicamente como em plasmídeos. (BACILGIL *et al.*, 2012).

A importância da identificação de genes de resistências das amostras coletadas de leite e queijo está relacionada à segurança alimentar, pois está ligada a capacidade da bactéria na transferência desses genes. O estudo de Olsen *et al.* (2006), afirmam que as espécies de *Staphylococcus* presentes no mesmo microambiente podem passar o gene *blaZ* uma a outra se os fatores bacterianos forem atendidos. No mesmo estudo é retratado que as *Staphylococcus* coagulase negativa podem ser reservatórios de genes de resistência para *S. aureus* mostrando a importância de estudos de outros genes de resistência em estirpes de *S. aureus* bem como em outras espécies que possam estar presentes no leite e seus derivados.

Conclusão

Com este estudo detectou-se a presença do gene *blaZ* em 25% das cepas de *S. aureus* resistentes a beta-lactâmicos sendo assim, um mecanismo de resistência a essa classe de antibiótico. A ausência do gene nos demais isolados fenotipicamente resistentes a beta-lactâmicos pode ser atribuída a outros mecanismos de expressão de resistência. Os resultados mostram a necessidade de mais pesquisas de rastreamento dos possíveis genes que possam estar relacionados ao mecanismo de

resistência bacteriana a antimicrobianos, já que esses podem ser transferidos por recombinação genética a outras cepas ou espécies.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), pelo apoio financeiro e bolsa concedida. Ao Laboratório de Biotecnologia CPCA – ICA/ UFMG pela disponibilidade dos ambientes e equipamentos para o desenvolvimento deste trabalho.

Referências

- BAGCIGIL, AF *et al.* Genetic basis of penicillin resistance of *S. aureus* in bovine mastitis. *Acta Vet Scand*, 2012.
- FERREIRA, A. M. *et al.* Correlation of phenotypic tests with the presence of the blaZ gene for detection of beta-lactamase. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 159-166, 2017.
- GU, J. *et al.* Bacterial insertion sequence IS256 as a potential molecular marker to discriminate invasive strains from commensal strains of *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of Hospital Infection**, v. 61, n. 4, p. 342-348, 2005.
- LEE, S. H. I. *et al.* Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates in milk and the milking environment from small-scale dairy farms of São Paulo, Brazil, using pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of dairy Science**, v. 95, n. 12, p. 7377-7383, 2012.
- MACEDO, M. L. A. P. *et al.* Mecanismos de resistência e detecção das beta-lactamases. **Revista UNOPAR Científica: ciências biológicas e da saúde**. Londrina, v. 7, n. 1, p. 59-63, 2005.
- MARTINI, C. L. *et al.* Characterization of penicillin and tetracycline resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk samples in Minas Gerais, Brazil. **Journal of Dairy Research**, v. 84, n. 2, p. 202-205, 2017.
- OLSEN, J. E. *et al.* Diversity and evolution of blaZ from *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *staphylococcus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, n. 3, p. 450-460, 2006.
- PEREIRA, M. N.; SCUSSEL, V. M. Resíduos de antimicrobianos em leite bovino: fonte de contaminação, impactos e controle. **Revista de Ciências Agro veterinárias**, v. 16, n. 2, p. 170-182, 2017.
- VIEIRA, D S. *et al.* Atividade antimicrobiana in vitro do extrato etanólico bruto da folha da *Hymenaeamartiana* Hayne frente à *Staphylococcus* spp. e avaliação de seu potencial como desinfetante em cabras. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, p. 462-469, 2018.
- YANG, Feng *et al.* Prevalence of blaZ gene and other virulence genes in penicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis cases in Gansu, China. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v. 39, n. 5, p. 634-636, 2015