

Capítulo 19

Uso da PCR para detecção dos genes *mecA* e *mecA*_{LGA251} em *Staphylococcus aureus* isolados de leite mastítico no norte de Minas Gerais

Laura Francielle Ferreira Borges^{*1}; Edmara Andrade Macedo Cruz²; Ester Dias Xavier³; Cintya Neves de Souza⁴; Geziella Aurea Aparecida Damasceno Souza⁵, Demerson Arruda Sanglard⁶

Resumo

O uso de antibióticos é um método para o controle de doenças intramamárias, porém o uso indiscriminado destes medicamentos pode selecionar cepas resistentes prejudicando a eficiência do tratamento. Apesar de não ser comumente aplicada ao tratamento de mastites, a metilina têm sido identificadas em rebanhos leiteiros, tornando-se alerta para a saúde pública. A identificação fenotípica de resistência à metilina é realizada com testes de sensibilidade à oxacilina e cefoxitina e genotipicamente utilizando a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR). O presente estudo verificou a presença dos genes *mecA* e *mecA*_{LGA251} em 19 isolados de *Staphylococcus aureus* provenientes de amostras de leite mastítico de rebanhos do norte de Minas Gerais. Os isolados previamente identificados e resistentes a oxacilina e cefoxitina foram submetidos à extração de DNA. Após a extração os DNAs foram submetidos à reação em cadeia polimerase (PCR) para pesquisa dos genes *mecA* e *mecA*_{LGA251}. Os amplicons foram visualizados em gel de agarose a 1,5% e fotodocumentados. Os genes não foram identificados nos isolados em estudo, no entanto a ausência destes não descarta a possibilidade da presença de outros genes de resistências nas propriedades em estudo, bem como a possibilidade de veiculação de clones resistente para humanos.

Palavras-chave: Resistência. Beta-lactâmicos. Identificação Molecular.

Introdução

A mastite bovina é caracterizada como processo inflamatório da glândula mamária, considerada como principal doença que gera prejuízos econômicos à pecuária leiteira, em virtude da

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

redução da quantidade e pela alteração na qualidade do leite produzido, ou até pela perda total da capacidade secretora da glândula mamária (SILVA, 2008). O uso de antibióticos no controle das infecções intramamárias e na eliminação de prováveis fontes de infecção nas fazendas leiteiras constitui uma importante método de controle. Entretanto, o uso inadequado de antibióticos no tratamento da doença pode selecionar cepas resistentes e prejudicar a eficiência do tratamento (MENDONÇA *et al.*, 2012).

Staphylococcus aureus é o principal agente etiológico identificado em maior frequência como causador de mastite bovina e é considerado um patógenos que apresentam um grande risco a saúde pública, com capacidade de acumular diversos mecanismos de resistência a muitos compostos disponíveis clinicamente, incluindo os antibióticos do grupo beta-lactâmicos.

A metilina, um dos compostos do grupo beta-lactâmicos, que apesar de não ser geralmente utilizadas no tratamento de mastites, cepas de *S. aureus* resistentes a metilina (MRSA) têm sido identificadas em fazendas leiteiras (PATERSON; HARRISON; HOLME, 2014) tornando-se preocupante em termos de saúde pública, pois cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina (MRSA) são comumente identificadas como causadoras de infecções hospitalares, até mesmo nas unidades de terapia intensiva (UTI) (SILVA; ALCÂNTARA; MOTA, 2018). A transmissão horizontal de MRSA entre bovinos leiteiros e trabalhadores das fazendas relatado na literatura sugere que o contato entre seres humanos e animais e vice-versa pode favorecer a transmissão de tais cepas (SILVA; ALCÂNTARA; MOTA, 2018).

A resistência de *Staphylococcus* spp. à beta-lactâmicos, a exemplo da metilina, ocorre pela produção de beta-lactamase ou pela modificação no sítio de ação dos beta-lactâmicos (SILVA; ALCÂNTARA; MOTA 2018). A identificação fenotípica de resistência à metilina é realizada em testes de sensibilidade à oxacilina e cefoxitina (CLSI, 2015). A nível molecular a resistência à metilina pode ser detectada utilizando a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) por meio da amplificação dos genes *mecA* e *mecC* (SILVA; ALCÂNTARA; MOTA 2018), recentemente foi detectado um homólogo do *mecA*, o *mecALGA251* (GARCÍA-ÁLVAREZ *et al.*, 2011).

Objetivou-se no presente estudo verificar a presença dos genes *mecA* e *mecAL251* em *Staphylococcus aureus* provenientes de amostras de leite mastítico de rebanhos do norte de Minas Gerais.

Material e métodos

Foram utilizados 19 isolados de *Staphylococcus aureus*, oriundas de amostras de leite de vacas com diagnosticadas com mastite subclínica, coletadas de acordo com os princípios éticos de Ética e Experimentação Animal (CEUA) com o protocolo °145/2013 da Universidade Federal de Minas Gerais, pertencentes à bacterioteca do Laboratório de Sanidade Animal localizado no Centro de Pesquisa em Ciências Agrárias da UFMG (CPCA– ICA/UFMG).

Os isolados utilizados foram previamente identificados por análise proteômica MALDI TOF (ASSIS *et al.*, 2017) e PCR (XAVIER *et al.*, 2017) e testados quanto ao perfil de sensibilidade aos antibióticos oxacilina (1µg) (Cecon) e cefoxitina (30µg)(Laborclin) (CLSI, 2015). Os isolados foram ativados em meio TSB a 37 °C por 24 horas e, após verificada a sua pureza, foram submetidas à extração de DNA pelo método de digestão por proteinase K, seguidas por fenol-clorofórmio conforme protocolo proposto por Gu *et al.*, (2004) com adaptações.

A presença dos genes *mecA* e *mecA*_{LGA251} foram determinados pela técnica de PCR utilizando os primers sintetizados pela *Integrad DNA Technology* USA. As reações foram realizadas em um mix contendo 1x Tampão da Taq do kit Kappa PCR, 3,5 µL de MgCl₂ (2,5mM), 2,5 µL de Tris, deoxinucleotídeos (1µM), 0,1 µl de Taq Polimerase Kappa (0,5U), 1,0 µL de cada primer e 3 µL (50ng/µL) de DNA bacteriano em um volume final de reação de 25 µL.

Para verificar a presença do gene *mecA* utilizou-se os primers MECAF 5'-AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC-3' e MECAR 5'-AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC-3', resultando em um amplicon de 533 pares de base. As reações ocorreram em termociclador, com um ciclo inicial de desnaturação a 94°C durante 3 minutos, seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, temperatura de anelamento a 55°C por 1 minuto, e uma extensão a 72°C por 10 minutos e uma extensão final de 10 minutos (SILVA, 2008).

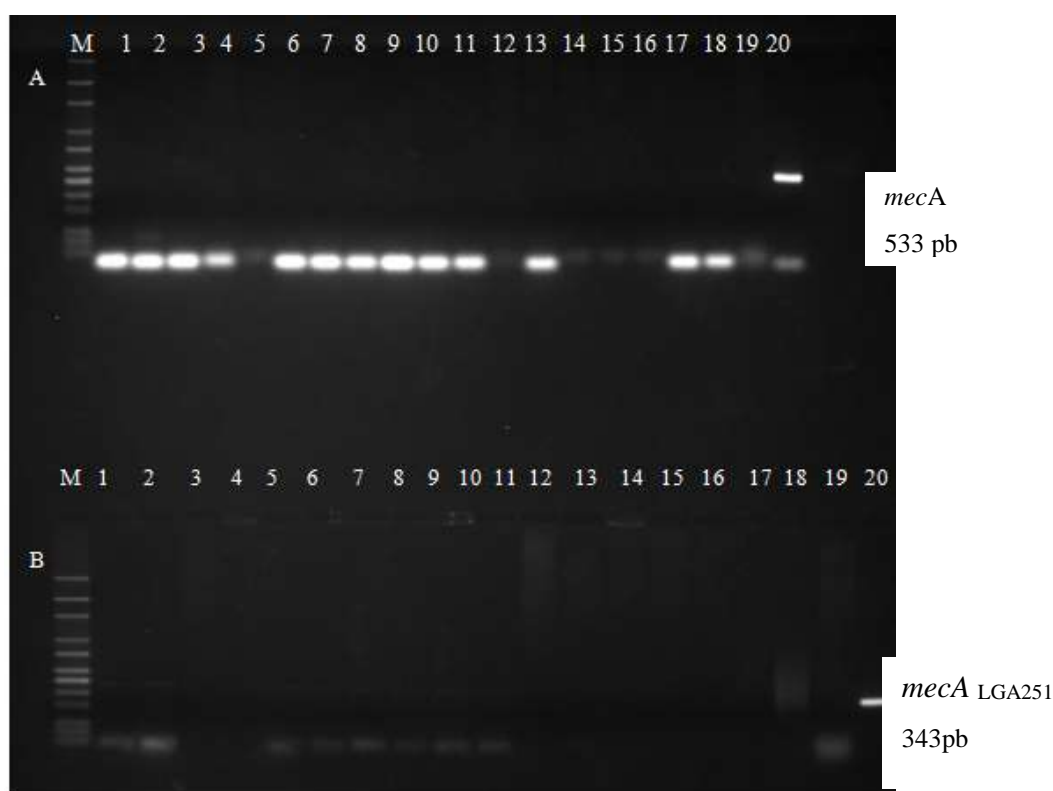
Para o gene *mecA*_{LGA251} utilizou-se os primers MECALG251F 5'-TCACCAGGTTCAAC[Y]CAAAA-3' e MECALG251R 5'-CCTGAATC[W]GCTAATAATATTTTC-3', amplificando uma banda de 344 pares de base. As condições de amplificação foram as seguintes: um ciclo de desnaturação inicial a 94°C durante 5 minutos seguidos de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, temperatura de anelamento a 55°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 2 minutos e uma extensão final de 5 minutos (GARCÍA-ÁLVAREZ *et al.*, 2011).

A bactéria utilizada como controle para ambos os genes foi *S. aureus* ATCC 43300. Os amplicons dos genes descritos foram visualizados em gel de agarose a 1,5% corados com Gel Red e fotodocumentados.

Resultados e discussão

Embora fenotipicamente tenha sido observado que as cepas foram resistentes a oxacilina e cefoxitina, a presença dos genes *mecA* e *mecA*_{LGA251} não foram verificados nas análises efetuadas conforme a Figura 1. A partir da PCR 16S rDNA ribossomal de bactéria verificou-se que o DNA extraído apresentava qualidade, certificando que não ocorreu falhas técnicas durante a extração de DNA, bem como a presença dos genes nos controles positivos validam a PCR realizada

Figura 1 – Detecção dos genes *mecA*(A) e *mecA*_{LGA251} (B) por PCR em *Staphylococcus aureus* isoladas de leite mastítico no norte de Minas Gerais



Legenda: M: Marcador de massa molecular DNA de 100 pares de base (Cellco); Linhas 1 a 19: Isolados de leite de vacas diagnosticadas com mastite subclínica. A linha 20 representa o controle positivo (cepa *S. aureus* ATCC 43300). Gel de agarose a 1,5%.

Fonte: Dos autores, 2019

Os resultados obtidos são compatíveis com os descritos por Mendonça *et al.*, (2012) que não observaram na presença do gene *mecA* em 250 cepas de *Staphylococcus* sp. isolados de tetos com mastite subclínica no Brasil, resistentes a meticilina. Os autores citam que não tem sido observada correlação entre os perfis fenotípicos de resistência e a detecção gênica, sendo necessário investigar os processos de regulação e transcrição gênica do *mecA*, bem como do produto dessa expressão, PBP 2a e PBP 2b proteínas ligantes de penicilina de baixa afinidade, responsáveis pela resistência antimicrobiana. No entanto, Dias, Silva e Oliveira (2011), encontraram este gene em 11% de isolados MRSA provenientes de tanque de refrigeração em Minas Gerais. A divergência de resultados também foi observada por Kulangara *et al* (2017), que estudaram leite de vacas cinco dias após a secagem e observaram nove isolados que apresentavam gene *mecA* fenotipicamente susceptível a oxacilina, enquanto a resistência fenotípica para oxacilina foi observada em sete isolados que não foram positivos para *mecA*. Estes autores destacam a necessidade de considerar conjuntamente o nível perfil molecular e perfil antimicrobiano de estafilococos em bovinos leiteiros como um aspecto importante dos estudos epidemiológicos para o manejo terapêutico em bovinos e em humanos.

Nenhum trabalho no Brasil relatou a pesquisa do gene *mecA*_{LGA251}, não sendo possível confrontar os resultados entre estudos. Diaz *et al.* (2016) publicaram estudo de metanálise indicando uma baixa prevalência deste gene entre os MRSA e destacam a importância de monitorar a epidemiologia dessa forma variante emergente, já que ela é resistente a praticamente todos os antibióticos beta-lactâmicos.

Conclusão

Os gene *mecA* e *mecA*_{LGA251} não foram identificados nos isolados em estudo, no entanto, a ausência destes não descarta a possibilidade da presença de outros genes de resistência nas propriedades em estudo, bem como a possibilidade de veiculação de clones resistentes para humanos.

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

- ASSIS, G. B. N. *et al.* Use of MALDI-TOF mass spectrometry for the fast identification of gram-positive fish pathogens. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 1492, 2017.
- DIAS N. L.; SILVA D. C. B.; OLIVEIRA D. C. B. S. Detecção de genes de *Staphylococcus aureus*, enteroxinas e de resistência à meticilina em leite. **Arq Bras Med Vet Zootec.** v. 63, n.1, p. 1547-52, 2011.
- DIAZ, R. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the new mecC gene—a meta-analysis. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 84, n. 2, p. 135-140, 2016.
- GARCÍA-ÁLVAREZ, L. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel mecA homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. **The Lancet infectious diseases**, v. 11, n. 8, p. 595-603, 2011.
- 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.
- KULANGARA, V. *et al.* Genotypic and phenotypic β -lactam resistance and presence of PVL gene in *Staphylococci* from dry bovine udder. **PLoS one**, v. 12, n. 11, p. e0187277, 2017.
- MENDONÇA, E. C. L. *et al.* Caracterização fenotípica da resistência antimicrobiana em *Staphylococcus* spp. isolados de mastite bovina. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 32, n. 9, p. 859-864, set. 2012.
- PATERSON, G. K.; HARRISON, E. M.; HOLMES, M. A. The emergence of mecC methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Trends in microbiology**, v. 22, n. 1, p. 42-47, 2014.
- SILVA M.A. **Utilização de PCR Multiplex para o diagnóstico etiológico da mastite bovina.** 2008. 32 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Animal). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2008.
- SILVA, J. G.; ALCÂNTARA, A. M.; MOTA, R. A. Mastite bovina causada por *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina: revisão de literatura. **Pesqui. vet. bras.**, v. 38, n. 2, p. 223-228, 2018.
- WAYNE, P. A (2016). **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** 26th informational supplement (CLSI document M100S).
- XAVIER, A. R. E. O. *et al.* Phenotypic and genotypic characterization of *Staphylococcus aureus* isolates in milk from flocks diagnosed with subclinical mastitis. Genetics and molecular research: **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 2, 2017.