

AVALIAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DA RESISTÊNCIA AO TRIMETOPRIM EM *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE LEITE DE VACAS COM MASTITE

GUSTAVO AFRA MAZZA¹; KAUANA DOS SANTOS SOARES²; GABRIELA PEIL DA SILVA²; ISABELA SCHNEID KRONING²; LOUISE HAUBERT²; WLADIMIR PADILHA DA SILVA³

¹Universidade Federal de Pelotas – gugamazza@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – kauana_soares@hotmail.com; gabriela.peil19@gmail.com; isabelaschneid@gmail.com; louisehaubert@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – wladimir.padilha2011@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Staphylococcus aureus é uma bactéria patogênica, capaz de causar intoxicação alimentar em humanos. A intoxicação alimentar estafilocócica ocorre devido a ingestão dessas enterotoxinas pré-formadas no alimento, sendo comumente associada a produtos de origem láctea e ao leite *in natura*, cujos principais sintomas são náuseas, vômitos, cãibras abdominais e diarreia (LANCETTE; TATINI, 1992; PARK; AKTAR; RAYMAN, 1992; WONG; BERGDOLL, 2002).

Dentre as formas de veiculação deste patógeno para o leite, a mais relevante é a mastite, que é uma inflamação da glândula mamária, comumente causada por micro-organismos, entre os quais, *S. aureus* apresenta grande importância, tanto pela ocorrência como pela dificuldade no tratamento (LOPES; LACERDA, 2014). Além da preocupação com a contaminação do leite em si, este micro-organismo pode se tornar resistente aos antimicrobianos utilizados no tratamento da mastite, incluindo os antimicrobianos pertencentes a classe dos inibidores da síntese do folato, como o trimetoprim (LÓPEZ et al., 2012).

O antimicrobiano trimetoprim foi lançado em 1968 e seu mecanismo de ação ocorre pela inibição da enzima di-hidrofolato redutase. Foi o último antibiótico aprovado, até a liberação do linezolid, nos anos 2000. Quando ocorrem mutações no gene que codifica a enzima di-hidrofolato redutase, pode ocorrer superexpressão de outras enzimas que têm reduzida afinidade ao trimetoprim, resultando em resistência a esse antimicrobiano (ALEKSHUN; LEVY, 2007). Como exemplo da ocorrência de mutações devido a presença de genes de resistência, se destacam os genes *dfrA*, *dfrG* e *dfrK*, que codificam resistência ao trimetoprim e podem ser transferidos através de elementos genéticos móveis, como plasmídeos e *transposons* (NURJADI et al., 2014).

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar o fenótipo de resistência ao trimetoprim em 31 isolados de *S. aureus* oriundos de leite de vacas com mastite, bem como avaliar a presença dos genes de resistência *dfrA*, *dfrG* e *dfrK*.

2. METODOLOGIA

Foram avaliados 31 isolados de *S. aureus* provenientes de leite de vacas com mastite. Primeiramente, procedeu-se a avaliação fenotípica de resistência ao trimetoprim através do teste de disco difusão em ágar, utilizando-se ágar Mueller-Hinton (MH, Oxoid®), de acordo com as normas preconizadas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015). Os isolados foram cultivados em

ágar Triptona de Soja (TSA, Acumedia[®]) durante 24 horas a 37 °C. Após esse período, foram diluídos em solução salina 0,85% até a escala de turbidez 0,5 de McFarland. O inóculo foi semeado com o auxílio de um *swab* sobre placas de Petri contendo ágar MH. Em seguida, foram adicionados discos impregnados com o antimicrobiano trimetoprim, adquiridos da empresa Laborclin[®], e as placas foram incubadas por 24 horas a 37 °C. Os halos de inibição foram medidos, sendo os isolados considerados resistentes, sensíveis, ou apresentando resistência intermediária, de acordo com as normas do CLSI. O teste foi realizado em duplicata e, como controle da técnica, foi utilizada a cepa padrão *S. aureus* ATCC[®] 25923.

A extração do DNA genômico foi realizada segundo o protocolo descrito por GREEN et al. (2012) com adaptações. O DNA foi quantificado por espectrofotometria, utilizando-se o Eppendorf BioSpectrometer kinetic[®] (Eppendorf). Após a quantificação do DNA, a amostra foi submetida à técnica de PCR em termociclador MJ Research PTC 100.

Para cada reação, foram adicionados 12,5 µL de 2x GoTaq[®] Green Master Mix (Promega), 10 pmol dos primers *dfrA* e *dfrG* e 20 pmol dos primers *dfrK*, 10 ng de DNA e água ultrapura para um volume final de 25 µL. Na Tabela 1 estão apresentados os primers bem como os programas utilizados na PCR.

Tabela 1. Sequência dos primers, tamanho do fragmento e condições de PCR utilizados para avaliação dos genes de resistência ao trimetoprim (genes *dfrA*, *dfrG* e *dfrK*)

Primers	Sequência (5'-3')	Pb	Programa	Referência
<i>dfrA</i>	fw:CCTTGGCACTTACCAATG	350	P1	PERRETE et al. (2005)
	rv:CTGAAGATTGACTTCCC			
<i>dfrG</i>	fw:TTTCTTGATTGCTGCGATG	422	P2	BERTSCH et al. (2013)
	rv:CCCTTTGGGCAAATACCT			
<i>dfrK</i>	fw:GAGAATCCCAGAGGATTGGG	422	P3	LÓPEZ et al. (2012)
	rv:CAAGAAGCTTTCGCTCATAAA			

P1=95 °C por 5 min, 30 ciclos de 95 °C por 1 min, 50 °C por 1 min, 75 °C por 1 min, 75 °C por 5 min; P2= 95 °C por 5 min, 30 ciclos de 95 °C por 1 min, 52 °C por 1 min, 72 °C por 1 min, 72 °C por 5 min; P3= 95 °C por 1 min, 25 ciclos de 95 °C por 30 s, 55 °C por 30s, 68 °C por 1 min, 68 °C por 5 min

Os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% e visualizados em transiluminador (Loccus[®]).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os isolados de *S. aureus* (100%) apresentaram suscetibilidade ao trimetoprim, formando halos superiores a 16 mm, o que confirma o perfil de suscetibilidade frente a esse antimicrobiano, segundo as normas do CLSI para o grupo *Staphylococcus* spp. (CLSI, 2015).

O trimetoprim foi efetivo frente aos isolados avaliados, entretanto, o número de bactérias que têm apresentado perfil de resistência a antimicrobianos está aumentando, devido a utilização destes agentes em larga escala, bem como sua administração de forma empírica, ou seja, sem uma investigação prévia do antimicrobiano de maior efetividade frente à infecção a ser combatida (BERTSCH et al., 2013).

Dos 31 isolados avaliados, três (S10, S13 e S14) carreavam os genes *dfrG* (S10) e *dfrA* (S13 e S14), apesar de terem apresentado perfil fenotípicos de

susceptibilidade ao trimetoprim. Segundo MICHALOVA et al. (2004), estes resultados podem ocorrer, pois a presença de um gene de resistência não garante a sua expressão. As discrepâncias entre o fenótipo e o genótipo de resistência podem estar relacionadas com a interpretação errônea dos testes de susceptibilidade realizados *in vitro*, bem como há a possibilidade dos genes de resistência serem expressos apenas *in vivo*. Além disso a técnica de PCR pode ter detectado um único gene dentro de um *operon*, não detectando outros genes que são necessários para a expressão fenotípica (FRAZZON et al., 2010; CHAJECKA-WIERZCHOWSKA et al., 2014).

CHAJECKA-WIERZCHOWSKA et al. (2014) avaliaram isolados de *Staphylococcus* spp. provenientes de alimentos cárneos, lácteos e vegetais, e verificaram que estes apresentavam perfil de sensibilidade à tetraciclina, entretanto, alguns isolados carreavam os genes *tetM* e *tetK*, resultados que vão ao encontro dos obtidos neste estudo.

A presença dos genes *dfrA*, *dfrG* e *dfrK* em isolados de *S. aureus* oriundos de leite de vacas com mastite é digno de preocupação, haja vista a possibilidade de transferência horizontal desses genes de resistência entre bactérias, pois são genes comumente localizados em elementos genéticos móveis, o que facilita a sua disseminação (NURJADI et al., 2014).

4. CONCLUSÕES

Apesar da susceptibilidade dos isolados de *S. aureus* provenientes de leite de vacas com mastite ao trimetoprim, a presença dos genes *dfrA* e *dfrG* causa preocupação, pois estes podem ser transferidos entre bactérias. A disseminação de genes de resistência a antimicrobianos na cadeia produtiva de alimentos é um problema de saúde pública. Destaca-se que as técnicas feno e genotípicas devem ser utilizadas em associação para melhor monitorar os padrões de resistência em isolados de *S. aureus*. Novos estudos devem ser realizados a fim de verificar o potencial de transferência desses genes de resistência entre isolados de *S. aureus*, bem como para outros gêneros bacterianos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEKSHUN, M.; LEVY, S. Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. **CELL**, EUA, v. 128, n. 6, p.1037-1050, 2007.
- BERTSCH, D.; URUTY, A.; ANDEREGG, J.; LACROIX, C.; PERRETTEN, V.; MEILE, L. Tn6198, a novel transposon containing the trimethoprim resistance gene *dfrG* embedded into a Tn916 element in *Listeria monocytogenes*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, EUA, v. 68, p. 986-991, 2013.
- CHAJECKA-WIERZCHOWSKA, W. Retail Ready-to-Eat Food as a Potential Vehicle for *Staphylococcus* spp. Harboring Antibiotic Resistance Genes. **Journal of Food Protection**, EUA, v. 77, n. 6, p. 993-998, 2014.
- CLSI, M100-S25. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**, Twenty-Fifth Informational Supplement, 2015.
- FRAZZON, A. P.G.; GAMA, B. A.; HERMES, V.; BIERHALS, C. G.; PEREIRA, R. I.; GUEDES, A.G.; D'AZEVEDO, P.A.; FRAZZON, J. Prevalence of antimicrobial resistance and molecular characterization of tetracycline resistance mediated by

tet(M) and *tet(L)* genes in *Enterococcus spp.* isolated from food in Southern Brazil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, EUA, v. 26, n. 2, p. 365-370, 2010.

GREEN, M. R.; SAMBROOK, J. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2012. 4 edição.

LANCETTE, G. A; TATINI, S. R. *Staphylococcus aureus*. In: VANDRZANT, C. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 3. ed. Washington: American Public Health Association, 1992.

LOPES, L. O.; SANTOS LACERDA, M.; BÉRGAMO, J.. CONTROLE E PROFILAXIA DE MASTITE CAUSADA POR STAPHYLOCOCCUS SP. EM VACAS LEITEIRAS: REVISÃO DE LITERATURA. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Brasil, v.22, n.1, 2014.

LÓPEZ, M.; KADLEC, K.; SCHWARZ, S.; TORRES, C. First Detection of the Staphylococcal Trimethoprim Resistance Gene *dfrK* and the *dfrK*-Carrying Transposon Tn559 in Enterococci. **Microbial Drug Resistance**, EUA, v. 18, n. 1, p. 13-18, 2012.

MICHALOVA, E.; NOVOTNA, P.; SCHLEGELOVA, J. Tetracyclines in veterinary medicine and bacterial resistance to them. **Veterinary Medicine**, Czech Republic, v. 49, p. 79-100, 2004.

NURJADI, D.; OLALEKAN, A.; LAYER, F.; SHITTU, A.; ALABI, A.; GHEBREMEDHIN, B.; SCHAUMBURG, F.; HORFMANN, J.; VAN GENDEREN, P.; CAUMES, E.; FLECK, R.; MOCKENHAUPT, F.; HERRMANN, M.; KERN, W.; ABDULLA, S.; GROBUSCH, M.; KREMSNER, P.; WOLZ, C.; ZANGER, P.; Emergence of trimethoprim resistance gene *dfrG* in *Staphylococcus aureus* causing human infection and colonization in sub-Saharan Africa and its import to Europe. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Reino Unido, v. 69, n. 9, p. 2361-2368, 2014.

PARK, C. E.; AKTAR, M.; RAYMAN, K. Nonespecific reactions of a commercial enzyme-linked immunoabsorbent assay kit (Tecra) for detection of staphylococcal enterotoxins in foods. **Applied and Environmental Microbiology**, EUA, v. 58, n. 8, p. 2509-2512, 1992.

PERRETTEN, V.; VORLET-FAWER, L.; SLICKERS, P.; EHRICT, R.; KUHNERT, R. FREY, J. Microarray-Based Detection of 90 Antibiotic Resistance Genes of Gram-Positive Bacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, EUA, v. 43, n. 5, p. 2291-2302, 2005.

TRABULSI, L.R; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

WONG, A.C.L.; BERGDOLL, M.S. Staphylococcal food poisoning. In: CLIVER, D.O.; RIEMANN, H.P. **Foodborne Diseases**. Amsterdam: Academic Press, p. 231- 248., 2002. 2 edição.