

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE MORCEGOS E VERIFICAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE À METICILINA

MAURO CEZAR MAYATO NETO¹; JULIANE LEITE ALVES²; DÉBORA RODRIGUES SILVEIRA³; THAMÍRIS PEREIRA DE MORAES⁴; ANA MARIA RUI⁵; CLÁUDIO DIAS TIMM⁶.

¹Universidade Federal de Pelotas – maurocmayato@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – julianemv31@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – debora.rsilveira@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – mirismoraes@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – ana.rui@ufpel.edu.com.br

⁶Universidade Federal de Pelotas – claudiotimm@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

As infecções hospitalares ou doenças associadas ao cuidado humano são comuns e problemáticas devido à sua frequência, morbidade e mortalidade. A frequência de infecções ocasionadas por *Staphylococcus aureus* metilina resistentes (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, MRSA) tem apresentado crescimento contínuo em instituições hospitalares a nível mundial (BURKE, 2003; COHEN et al., 2008; De LENCASTRE et al., 2007).

Inicialmente, a terapia antimicrobiana para infecções por esse microrganismo era simples. As penicilinas funcionaram de forma satisfatória até a década de 1960, quando passaram a ser identificados isolados resistentes a esse antimicrobiano. Para contornar o problema, foi criado o beta-lactâmico sintético metilina, resistente à ação das beta-lactamases produzidas por *S. aureus*. Entretanto, cepas resistentes também a esse antimicrobiano foram identificadas com o passar do tempo. Essas cepas foram denominadas MRSA e são resistentes aos antimicrobianos beta-lactâmicos (LOWY, 1998). Para a identificação de MRSA, o método mais utilizado é o teste de disco difusão, podendo ser utilizados os antibióticos oxacilina e cefoxitina, uma vez que a metilina não é mais produzida pela indústria farmacêutica (MIMICA e MENDES, 2007; ZURITA et al., 2010).

Com a destruição de habitats naturais e devido à constante substituição da área rural por áreas urbanas, muitas espécies de morcegos encontraram nas cidades um excelente local para conseguirem abrigo, especialmente em construções humanas, visto que há alimento em abundância. A iluminação concentra grande quantidade de insetos, favorecendo a permanência dos morcegos insetívoros neste ambiente. *Tadarida brasiliensis* pode ser considerada a espécie mais comumente encontrada em ambientes urbanos no Brasil, seguida de *Molossus molossus*. *Histiotus velatus* é de baixa ocorrência (PACHECO et al., 2010). Os morcegos, como a maioria dos mamíferos, podem servir como perpetuadores e disseminadores de uma série de agentes patogênicos zoonóticos (ACHA e SZYFRES, 2003).

Considerando-se a carência de estudos relacionados ao isolamento de *Staphylococcus aureus* no Brasil, a ampla variedade de espécies de morcegos e a proximidade com os humanos, este trabalho teve como objetivo verificar a presença de MRSA em isolados de fezes de morcegos que habitam construções humanas na região de Pelotas.

2. METODOLOGIA

Foram utilizados isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva obtidos no trabalho de Moraes et al. (2018) a partir de amostras de fezes de morcego. Os isolados foram recuperados do estoque passando-se 100 µL de cada para tubos contendo 3 mL de caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI, Acumedia, Michigan, USA) e incubados a 36 °C por 24 h. Os *pellets* das culturas foram submetidos à 100 µL de lisostafina à 36 °C por 1 h. Foi realizada a extração do DNA dos isolados conforme Sambrook e Russel (2001) e, após, foi realizada a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), pesquisando a presença do gene *nuc* com uso dos *primers* au-F3 e au-nucR (TAKASHI et al., 2010) para identificação da espécie *S. aureus*.

As cepas confirmadas como *S. aureus* foram submetidas ao teste de disco difusão em Ágar Müeller-Hinton, utilizando o disco de cefoxitina 30 µg (SKOV et al., 2003) para a identificação de MRSA. Os resultados obtidos foram avaliados segundo o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2015), que considera o microrganismo resistente quando o halo possuir diâmetro menor ou igual a 21 mm e sensível halo com diâmetro maior ou igual a 22 mm.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 21 isolados obtidos por Moraes (2018) a partir de morcegos das espécies *Tadarida brasilienses* (18) , *Molossus molossus* (2) e *Histiatus velatus* (1) e classificados como *Staphylococcus* coagulase positiva, todos (100%) foram identificados como pertencentes à espécie *Staphylococcus aureus* pela PCR e 16 (76,19%) foram resistentes à cefoxitina, dentre os quais 8 haviam sido isolados da espécie *Tadarida brasilienses* , 2 da *Molossus molossus* e 1 da *Histiatus velatus*.

Historicamente, o gênero *Staphylococcus* abrange uma porção muito considerável de patógenos de relevância veterinária. Uma importante característica é sua resistência à meticilina, devido à presença, em seu DNA, do gene *mecA* que codifica um dos principais mecanismos de resistência descritos (AARESTRUP et al., 2001). Curiosamente MRSA era encontrado antigamente apenas em seres humanos, emergindo posteriormente para a área veterinária, o que trouxe questionamentos acerca da contaminação de animais pelo patógeno, sendo o transmissor o ser humano (WEESE & DUIJKEREN, 2010).

Em Londres detectou-se MRSA em 17,9% dos funcionários de um hospital veterinário e em 9% dos cães internados, relacionadas a isolados de hospitais humanos (LOEFFLER et al., 2005). Na Alemanha, 869 amostras provenientes de pequenos animais de uma faculdade de medicina veterinária foram estudadas, detectando-se MRSA em aproximadamente 3% dos mamíferos, dentre eles um morcego. (WALTHER et al., 2008). Em nosso estudo foram identificados morcegos que albergam o mesmo patógeno, levantando a possibilidade de que esses animais foram contaminados devido ao contato com seres humanos expostos anteriormente ao microrganismo em regiões urbanas. Estes resultados indicam a necessidade de maiores estudos em relação à dinâmica de população das espécies de morcego que habitam construções humanas e dos microrganismos que albergam, bem como ressaltam a importância de cuidados que possam minimizar os riscos de transmissão de patógenos de humanos para morcegos e vice-versa.

A presença destes morcegos albergando MRSA em construções humanas e liberando nas fezes é um problema para saúde pública, pois implica em

preocupações acerca da possibilidade de contaminação de humanos e perpetuação do patógeno pelos morcegos.

4. CONCLUSÕES

Tadarida brasilienses, *Molossus molossus*, *Histiotus velatus*, podem albergar *Staphylococcus aureus* resistente à metilina e eliminá-lo nas fezes, oferecendo risco de disseminação e perpetuação desse microrganismo no ambiente, constituindo possíveis fontes de contaminação para humanos e outros animais.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARESTRUP, F.M.; SEYFARTH, A.M.; EMBORG, H.D., PEDERSEN, K.; HENDRIKSEN, R.S.; BAGER, F. Effect of abolishment of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal Enterococci from food animals in Denmark. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.45, n.7, p.2054-2059, 2001.

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 3ª Ed. Washington DC, 2003. 3 v.

BURKE, J. Infection control - A problem for patient safety. **The New England journal of medicine**, v.348, n.7, p.651, 2003.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. Twenty Fourth Informational Supplement. CLSI document M100-S24. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015.

COHEN, E.C; AUSTIN, J.; WEINSTEIN, M.; MATLOW, A.; REDELMEIER, D.A. Cohort Study Care of Children Isolated for Infection Control: A Prospective Observational. **Pediatrics**, v.122, n.2, p.e411-e415, 2008.

De LENCASTRE, H.; OLIVEIRA, D.; TOMAS, A. Antibiotic resistant *Staphylococcus aureus*: a paradigm of adaptive power. **Current Opinion in Microbiology**, v.10, n.5, p.428-35, 2007.

LOEFFLER, A.; BOAG, A.K.; LINDSAY, J.A.; GUARDABASSI, L.; DALSGAARD, A.; SMITH, H.; STEVENS, K.B.; LLOYD, D.H. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among staff and pets in a small animal referral hospital in the UK. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v.56, n.4, p.692-697, 2005.

LOWY, F.D. *Staphylococcus aureus* infections. **The New England Journal of Medicine**, v.339, n.8, p.520-532, 1998.

MIMICA, M.J.; MENDES, C.M.F. Diagnóstico laboratorial da resistência à oxacilina em *Staphylococcus aureus*. **Brazilian Journal of Pathology and Laboratory Medicine**, v.43, n.6, p.399-406, 2007.

MORAES, T.P.; SILVEIRA, D.R.; BACH, L.G.; FRANCO, A.D.; RUI, A.M.; TIMM, C.D. isolamento de *Staphylococcus* coagulase positiva de morcegos. Anais 2018 XXI Encontro de Pós-Graduação. 2018. Acessado em 30 ago. 2019. Online. Disponível em: http://cti.ufpel.edu.br/siepe/arquivos/2018/CA_01344.pdf

PACHECO, S.M.; SODRÉ, M.; GAMA, A.R.; BREDT, A.; CAVALLINI, E.M.; MARQUES, R.V.; BIANCONI, G. Morcegos urbanos: status do conhecimento e plano de ação para a conservação no Brasil. **Chiroptera neotropical**, v.16, n.1, p.629-647, 2010.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3ªed. Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 999 p.

SKOV, R.; SMYTH, R.; CLAUSEN, M.; LARSEN, A.R.; FRIMODT-MOLLER, N.; OLSSON-LIJEQUIST, B.; KAHLMETER, G. Evaluation of a cefoxitin 30 microg disc on Iso-Sensitest agar for detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **J Antimicrob Chemother**, v.52, n.2, p.204-7, 2003.

TAKASHI, S., TSUBAKISHITA, S., TANAKA, Y., SAKUSABE, A., OHTSUKA, M., HIROTAKI, S., KAWAKAMI, T., FUKATA, T., HIRAMATSU, K. Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive *Staphylococci*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.48, n.3, p.765-769, 2010.

WALTHER, B.; WIELER, L.H.; FRIEDRICH, A.W.; HANSSEN, A.; KOHN, B.; BRUNNBERG, L.; LÜBKEBECKER, A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from small and exotic animals at a university hospital during routine microbiological examinations. **Veterinary Microbiology, Amsterdam**, v.127, n.1, p.171-178, 2008.

WEESE, J. S.; VAN DUIJKEREN, E. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudointermedius* in veterinary medicine. **Veterinary Microbiology, Amsterdam**, v. 140, n. 3, p. 418-429, 2010.

ZURITA, J.; MEJIA, C.; GUZMÁN- BLANCO, M. Diagnóstico e teste de sensibilidade para *Staphylococcus aureus* resistente à metilina na América Latina. **Brazilian Journal Infectious Diseases**, v.14, n.2, p.97-107, 2010.