

**Resumo 146 - PADRONIZAÇÃO DE UM MÉTODO BASEADO EM PCR PARA DETECÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA A ERITROMICINA E TETRACICLINA DIRETAMENTE EM AMOSTRAS DE LEITE BOVINO<sup>1</sup>.**

***STANDARDIZATION OF A PCR BASED METHOD FOR DETECTION OF ERYTHROMYCIN AND TETRACYCLINE RESISTANCE GENES DIRECTLY IN BOVINE MILK SAMPLES<sup>1</sup>***

João Batista Ribeiro<sup>2\*</sup>; Márcio Roberto Silva<sup>2</sup>; Alessandro de Sá Guimarães<sup>2</sup>; Letícia Caldas Mendonça<sup>3</sup>; Guilherme Nunes de Souza<sup>2</sup>; Paula Aparecida Azevedo<sup>4</sup>; Carla Christine Lange<sup>2</sup>; Maria Aparecida Vasconcelos Paiva Brito<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Auxílio Pesquisa: Embrapa (Cód. 03.13.14.006.00.00) <sup>2</sup>Pesquisador, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. E-mail\*: joao-batista.ribeiro@embrapa.br <sup>3</sup>Analista, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. <sup>4</sup>Graduada em Biomedicina, UNIPAC, Juiz de Fora, MG.

**Introdução:** A mastite bovina é considerada a principal enfermidade de rebanhos leiteiros no mundo, sendo a que causa as maiores perdas econômicas ao setor lácteo. No Brasil, estimam-se perdas de produção entre 12 e 15% devido a essa doença, o que representa mais de três bilhões de litros de leite por ano. Além disso, a mastite oferece riscos à saúde pública, pela possibilidade de contaminação do leite com resíduos de antibióticos ou com microrganismos e suas toxinas. A bactéria *Streptococcus agalactiae* está frequentemente associada à mastite subclínica e é o patógeno que mais contribui para a elevação da CCS e contagem de bactéria total (CBT) no leite. Dessa forma, é considerada um dos principais agentes responsáveis pela redução da produção e da qualidade do leite, além do risco de disseminação da doença para outros animais do rebanho. Embora *S. agalactiae* seja erradicável por antibioticoterapia e exista vários relatos de países que obtiveram grandes avanços em programas de erradicação desse patógeno, no Brasil, essa bactéria está presente em 60% dos rebanhos. Considerando a necessidade do uso dos agentes antimicrobianos como uma das ferramentas empregadas no controle da mastite bovina na maioria nas propriedades de produção leiteira no Brasil e que esses agentes inevitavelmente levam à emergência de patógenos resistentes nos rebanhos, é imprescindível o desenvolvimento de métodos confiáveis, rápidos e de baixo custo para realizar o monitoramento e avaliação da resistência nesses rebanhos. Apesar da vantagem óbvia do monitoramento da resistência por meio da detecção de genes de resistência por PCR multiplex diretamente em amostras de leite, ainda não há relato do uso dessa estratégia de modo direcionado para a realidade brasileira, ou seja, considerando as frequências de genes de resistência observadas em cepas isoladas de rebanhos brasileiros. Assim, o objetivo do presente trabalho foi padronizar um método baseado em PCR multiplex para amplificação, diretamente em amostras de leite, dos genes *ermB*, *tetO* e *tetM*, principais mediadores da resistência aos antimicrobianos eritromicina e tetraciclina em *S. agalactiae* de origem bovina.

**Material e Métodos:** Foram utilizadas linhagens de *S. agalactiae* mantidas na Coleção de Microrganismos de Interesse da Agroindústria e Pecuária da Embrapa previamente caracterizadas (fenotipicamente e genotipicamente) quanto à resistência aos antimicrobianos eritromicina e tetraciclina (Ribeiro et al., 2013). As bactérias foram recuperadas em ágar BHI e cultivadas em 6 mL de caldo BHI sob agitação rotacional de 200 rpm a 35°C por 16 horas. Em seguida, 10<sup>6</sup> a 10<sup>8</sup> células foram inoculadas artificialmente em 1 ml de leite bovino não mastítico. A extração de DNA diretamente de amostras de leite foram realizadas com emprego de SDS, proteinase K, mutanolisina e fenol/clorofórmio conforme Meiri-Bendek. A detecção dos genes foi feita por PCR (monoplex, duplex ou tríplice) utilizando as mesmas condições de amplificação dos genes de resistência em cultura puras de *S. agalactiae* (Ribeiro et al., 2013). A corrida eletroforética foi realizada em gel de agarose 2% (p/v) a 100V e os

produtos de amplificação, visualizados sob luz ultravioleta após coloração do gel com brometo de etídeo.

**Resultados e Discussão:** No presente trabalho, o método de extração e purificação de DNA com emprego de fenol e clorofórmio mostrou-se eficiente para a obtenção de amostras de DNA de *S. agalactiae* a partir de amostras de leite com pureza suficiente para amplificação por PCR. Observou-se a presença de bandas específicas correspondentes aos fragmentos de DNA de 359, 1723 e 1862 pb, conforme esperados para os produtos de amplificação dos genes *ermB*, *tetO* e *tetM*, respectivamente. Para os controles positivo (amplificação espécie específica da região V1/V2 do rDNA de *S. agalactiae*) e negativo (mistura contendo todos os componentes da PCR, exceto DNA) também foram observados os resultados esperados, tendo sido visualizada uma única banda de 122 pb nas reações em que os primer V1 e V2 foram adicionados e ausência de banda na mistura de PCR desprovida de DNA. Foi verificada a amplificação simultânea dos genes *ermB*, *tetO* e *tetM* em uma única mistura de reação em “tríplice” sendo os genes *tet* e *ermB* facilmente separados por eletroforese em gel de agarose 2%. No entanto, a separação dos fragmentos de DNA correspondentes aos amplificados dos genes *tetO* e *tetM* entre si exigiu um tempo de corrida muito longo devido à pequena diferença de tamanho entre os amplificados. Por isso, novas combinações de primers deverão ser testadas visando conciliar a PCR “tríplice” com a praticidade na separação eletroforética. Considerando, o alto nível de associação entre genótipo e fenótipo da resistência bacteriana aos antimicrobianos, o desenvolvimento de métodos que possibilitem a detecção em massa de genes de resistência de modo rápido e de menor custo pode ser considerado muito útil. Uma limitação dos métodos baseados em PCR convencional para monitoramento da resistência aos antimicrobianos é que a presença do gene não garante a sua expressão, não permitindo assim, a obtenção de respostas conclusivas concernentes ao fenótipo da resistência ou à viabilidade dos patógenos portadores dos genes alvos. Contudo, em se tratando de resistência a antimicrobianos, a presença do gene mesmo que livre no ambiente já pode ser considerada uma ameaça digna de precaução, visto que o mesmo pode ser incorporado em um patógeno por transferência horizontal de modo intra ou interespecífico e conferir o fenótipo de resistência.

**Conclusões:** O método de extração de DNA utilizando o fenol/clorofórmio possibilitou a obtenção de DNA diretamente de amostras de leite bovino para a amplificação dos genes de resistência aos antimicrobianos eritromicina (*ermB*) e tetraciclina (*tetO* e *tetM*). A amplificação simultânea dos três genes em uma única reação evidenciou a possibilidade do desenvolvimento de um método baseado em PCR multiplex para monitoramento da resistência aos antimicrobianos diretamente em amostras de leite bovino. Estudos adicionais são necessários visando o estabelecimento de conjuntos de primers específicos compatíveis na PCR e que gerem amplificados facilmente separáveis por eletroforese em géis de agarose.

#### **Referência Bibliográfica:**

Ribeiro, J. B.; Pinto, L. E.; Araújo, M. A. S.; Mendonça, L. C.; Santos, F. F.; Lange, C. C.; Brandão, H. M.; Guimaraes, A. S.; Brito, M. A. V. P. Evaluation of Tetracycline and Erythromycin Resistance in *Streptococcus agalactiae* Isolated from Bovine Subclinical Mastitis. In: 27º SBM - Congresso Brasileiro de Microbiologia. 2013, Anais. Natal - Rio Grande do Norte. Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2013. 1p.