

**RESUMO 113 - INVESTIGAÇÃO DA RESISTÊNCIA À ERITROMICINA EM LINHAGENS DE *Streptococcus agalactiae* ISOLADAS DE CASOS DE MASTITE BOVINA**

Bianca Hosken<sup>1</sup>, Paula Almeida<sup>1</sup>, Maria Aparecida Brito<sup>2</sup>, Daniele Reis<sup>2</sup>, Guilherme Souza<sup>2</sup>, Marco Antonio Machado<sup>2</sup>, Marcio Roberto Silva<sup>2</sup>, João Batista Ribeiro<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brazil, <sup>2</sup>EMBRAPA Gado de Leite, Juiz de Fora, Brazil

**INTRODUÇÃO:**

*Streptococcus agalactiae* está presente na maioria dos rebanhos bovinos leiteiros do Brasil e é um dos patógenos que mais contribui para o aumento da contagem de células somáticas e contagem total de bactérias no leite, reduzindo sua qualidade. Embora inevitável para a erradicação de *S. agalactiae* dos rebanhos, o uso de antibióticos pode levar à emergência de linhagens resistentes, sendo necessário então, que estes medicamentos sejam usados de forma racional.

Um dos antimicrobianos utilizados no tratamento da mastite bovina é a eritromicina, um macrolídeo que inibe a síntese proteica através da sua ligação reversível à subunidade ribossomal 50S. Pouco se sabe sobre os perfis e os mecanismos moleculares de resistência a este antimicrobiano em patógenos da mastite isolados de rebanhos bovinos leiteiros do Brasil. Pinto *et al.* (2013) caracterizaram a resistência à eritromicina em *S. agalactiae* de origem bovina, provenientes dos estados do Rio de Janeiro, Santa Catarina e São Paulo mostrando que houve um aumento da resistência a este antibiótico de 10,5% (entre 1987 e 1988) para 60% (entre 2003 e 2006).

Em *Streptococcus* spp. a resistência à eritromicina é mediada predominantemente por metilases codificadas por genes *erm*, as quais modificam o sítio de ligação do antibiótico nos ribossomos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil de susceptibilidade e investigar a presença de determinantes genéticos da resistência à eritromicina (*ermA* e *ermC*) em *S. agalactiae* e avaliar o potencial dos genes *ermA*, *ermB* e *ermC* como marcadores moleculares de resistência.

**MATERIAIS E MÉTODOS:**

Foram utilizadas 74 linhagens de *S. agalactiae* geneticamente distintas, isoladas de 10 rebanhos bovinos leiteiros da Zona da Mata Mineira durante 2 coletas distintas com intervalo de 18 meses (de 2009 a 2011), e 7 de *Staphylococcus* spp. pertencentes à Coleção de Microrganismos de Interesse da Agroindústria e Pecuária da Embrapa sediada na Embrapa Gado de Leite. A extração de DNA dos isolados foi realizada por protocolo interno utilizando fenol/clorofórmio. O perfil de susceptibilidade à eritromicina foi determinado por meio do método de difusão em ágar Mueller Hinton (CLSI, 2013). Primeiramente, os genes *ermA* e *ermC* foram pesquisados em linhagens de *Staphylococcus* spp. multirresistentes visando identificar bactérias portadoras dos mesmos para uso como controle positivo das reações. Para determinar as sequências de nucleotídeos dos fragmentos de DNA foi utilizada a técnica de terminação da cadeia. Em seguida amostras de DNA das linhagens de *S. agalactiae* consideradas resistentes à eritromicina foram avaliadas por meio de PCRs individuais quanto à presença dos genes supracitados. As sequências dos primers utilizados, as composições das reações e as condições de termociclagem para padronização das reações foram realizadas conforme previamente descrito (Lina, et al. 1999).

Visando avaliar o potencial dos genes como marcadores moleculares da resistência à eritromicina foram realizadas análises *in silico* para detecção de genomas portadores dos genes *ermA*, *ermB* e *ermC* e feitos os isolamentos (também *in silico*) destes a partir dos genomas de diferentes linhagens e espécies de patógenos da mastite bovina utilizando a ferramenta "Pick Primers" do Centro Nacional de Informação Biotecnológica (NCBI). Em seguida essas sequências de nucleotídeos foram comparadas entre si utilizando o software CLUSTALW visando avaliar o grau de similaridade das mesmas entre as diferentes espécies. Finalmente, foram considerados os perfis fenotípicos e genotípicos de resistência da população de *S. agalactiae* avaliada no presente estudo.

SP 7505

## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Dentre as 74 linhagens de *Streptococcus agalactiae* analisadas 35 (47,3%) foram consideradas susceptíveis e 39 (52,7%) apresentaram resistência à eritromicina no teste fenotípico realizado por antibiograma. Em comparação a resultados anteriores (Duarte *et al*, 2004; GAO *et al*, 2012), o nível de resistência a eritromicina nas linhagens de *Streptococcus agalactiae* analisadas no presente estudo pode ser considerado elevado.

Foram identificadas três linhagens de *Staphylococcus spp.* portadoras dos genes *ermC* (CT141, CI8969 e CT225) e uma carregando o gene *ermA* (CI8970), as quais amplificaram fragmentos de DNA de 421pb e 572pb, correspondentes aos genes *ermA* e *ermC*, respectivamente. O sequenciamento destes amplicons demonstraram 100% de identidade com genes *ermA* e *ermC* depositados no NCBI. Amostras de DNA destas linhagens foram utilizadas como controles positivos e na otimização das PCRs nas análises subsequentes.

Os genes *ermA* e *ermC* não foram detectados nas linhagens de *Streptococcus agalactiae* analisadas, sugerindo que tais bactérias não carregam estes genes. Considerando que as amostras de DNA usadas como controle positivo eram do gênero *Staphylococcus*, foram realizadas análises *in silico* para verificar o nível de similaridade desses genes entre as diferentes linhagens e espécies de patógenos da mastite bovina. As sequências de nucleotídeos dos genes *ermA*, *ermB* e *ermC* foram detectadas nos genomas de diferentes espécies bacterianas depositados no NCBI. As análises de comparação de sequências para *ermB* e *ermC* evidenciaram elevado grau de similaridade (>90%) entre os genes detectados.

Em um estudo prévio de nossa equipe o gene *ermB* foi verificado em todas essas linhagens, o que provavelmente explica a resistência à eritromicina. O fato do gene *ermC* não ter sido detectado pode ser explicado pela sua provável ausência no genoma das linhagens de *Streptococcus agalactiae* analisadas, enquanto que para o gene *ermA*, serão necessárias novas buscas usando outros conjuntos de oligonucleotídeos para descartar a possibilidade da presença do gene nessas linhagens. Este resultado corrobora os dados da literatura de que a resistência a eritromicina nesta bactéria é comumente mediada pelo gene *ermB*, o qual é muito disseminado entre patógenos da mastite bovina, enquanto o gene *ermC* só foi encontrado até então, em *Staphylococcus spp.*

## CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Das 74 linhagens de *S. agalactiae* analisadas, a maioria (52,7%) foi considerada resistente à eritromicina. Os genes *ermA* e *ermC* não foram detectados *in vitro* em nenhuma das linhagens. O gene *ermB* foi confirmado como o mais indicado para uso como marcador da resistência à eritromicina em *S. agalactiae*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- DUARTE, R. *et al*. Phenotypic and molecular characteristics of *Streptococcus agalactiae* isolates recovered from milk of dairy cows in Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, 42 (9):4214-4222, 2004.
- GAO, J. *et al*. Antibiotic resistance of *Streptococcus agalactiae* from cows with mastitis. **The Vet. J.**, 194:423-424, 2012.
- LINA, G. *et al*. Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins among staphylococci. **Antimicrob. Agents Chemother.** 43:1062-1066, 1999.



**Anais do VII Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite**  
**28 e 29 de setembro de 2017 – Curitiba-PR**

## **VII CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE**

28 e 29 de setembro de 2017

Centro de Eventos Sistema FIEP – Campus da Indústria

Av. Comendador Franco, 1341, Jardim Botânico

Curitiba, Paraná, Brasil

Evento organizado e promovido pelo CBQL – Conselho Brasileiro de Qualidade do Leite (Gestão 2015/2017)

### **Diretoria Executiva**

Presidente: Rodrigo de Almeida

Vice-Presidente: José Augusto Horst

Diretor Administrativo: André Thaler Neto

Diretor Tesoureiro: Laerte Dagher Cassoli

Diretor Secretário: Bruno Garcia Botaro

### **Conselho Fiscal Efetivo**

Altair Antonio Valloto

Marcos Veiga dos Santos

Rodrigo Balduino Soares Neves

### **Conselho Fiscal Suplente**

Carlos Bondan

Henrique Costales Junqueira

Ronei Volpi

### **Secretaria**

Cláudia Helenice Zwicker Mavirl