

## Caracterização fenotípica e genotípica da resistência à eritromicina em linhagens de *Streptococcus agalactiae* isoladas de amostras de leite bovino em Minas Gerais<sup>1</sup>

Bianca de Oliveira Hosken<sup>2</sup>, Paula Aparecida Azevedo Almeida<sup>3</sup>, Maria Aparecida V. P. Brito<sup>4</sup>, Daniele Ribeiro de Lima Reis<sup>5</sup>, Letícia Caldas Mendonça<sup>5</sup>, Guilherme Nunes de Souza<sup>4</sup>, Marco Antônio Machado<sup>4</sup>, João Batista Ribeiro<sup>4</sup>, Marcio Roberto Silva<sup>4,6</sup>

<sup>1</sup>O presente trabalho foi realizado com o apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil: Parte do projeto MP3 “ResisLeite”, Código 03.13.14.006.00.00, liderado por João Batista Ribeiro.

<sup>2</sup>Graduanda em Farmácia – UFJF, Juiz de Fora, MG. Bolsista do PIBIC/CNPq. E-mail: biancahosken@gmail.com

<sup>3</sup>Mestranda do Curso Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados - UFJF.

<sup>4</sup>Pesquisador, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, /MG. E-mail: marcio-roberto.silva@embrapa.br

<sup>5</sup>Analista, Embrapa Gado de Leite

<sup>6</sup>Orientador

**Resumo:** *Streptococcus agalactiae* é um dos agentes patogênicos da mastite bovina que mais prejudica a qualidade do leite. Embora a antibioticoterapia seja inevitável para a erradicação desta bactéria dos rebanhos, esta pode levar ao surgimento de cepas resistentes e deixar resíduos de antimicrobianos no leite. Os objetivos deste estudo foram investigar o perfil de susceptibilidade e a presença de determinantes genéticos da resistência à eritromicina em *S. agalactiae* e avaliar o potencial desses genes como marcadores moleculares da resistência a este antibiótico. O perfil de susceptibilidade foi avaliado por teste de difusão em ágar e a detecção de genes foi realizada por PCR. A identidade dos fragmentos de DNA amplificados foi confirmada por sequenciamento. O potencial dos genes como marcadores foi avaliado por análises *in silico* (detecção e comparação de seqüências de genes) e com base nos perfis de resistência fenotípica e genotípica da população de *S. agalactiae* avaliada *in vitro* no presente trabalho. Das 74 estirpes de *S. agalactiae* analisadas, 39 (52,7%) foram consideradas resistentes à eritromicina. Os genes *ermA* e *ermC* não foram detectados *in vitro* no genoma de nenhuma das cepas de *S. agalactiae* analisadas. Os genes *ermA*, *ermB* e *ermC* foram detectados *em silico* em genomas de diferentes espécies bacterianas depositados no NCBI, incluindo *S. agalactiae* e outros patógenos de mastite bovina. As análises de comparação de seqüências apresentaram alta similaridade (> 99%) para os genes *ermB* e *ermC*, mesmo entre espécies taxonomicamente não relacionadas, o que não foi observado para o gene *ermA*. Esses achados confirmam as indicações anteriores do gene *ermB* como o marcador mais adequado para a resistência à eritromicina em *S. agalactiae*.

**Palavras-chave:** Eritromicina, genes *erm*, mastite bovina, resistência a antibiótico *Streptococcus agalactiae*.

## Phenotypic and Genotypic characterization of resistance to erythromycin in *Streptococcus agalactiae* strains isolated from bovine milk samples in Minas Gerais

**Abstract:** *Streptococcus agalactiae* is one of the bovine mastitis pathogens that most impairs milk quality. Although the antibiotherapy is inevitable for the eradication of this bacterium from the herds, it can lead to the emergence of resistant strains and leave antibiotics residues in milk. The objectives of this study were to investigate the susceptibility profile and the presence of genetic determinants of erythromycin resistance in *S. agalactiae* and evaluate the potential of these genes as molecular markers of the resistance to this antibiotic. The susceptibility profile were assessed by agar diffusion test and gene detection was performed by PCR. The amplicons identity was confirmed by sequencing. The potential of the genes as markers was evaluated by *in silico* analyses (detection and comparison of gene sequences) and based on phenotypic and genotypic resistance profiles of the *S. agalactiae* population evaluated *in vitro* in the present

work. Of the 74 *S. agalactiae* strains analyzed, 39 (52.7%) were considered resistant to erythromycin. The *ermA* and *ermC* genes were detected *in vitro* in the genome of none of the *S. agalactiae* strains analyzed. *ermA*, *ermB*, and *ermC* genes were detected *in silico* in genomes of different bacterial species deposited in NCBI, including *S. agalactiae* and other bovine mastitis pathogens. Sequence comparison analyses showed high similarity (>99%) for the *ermB* and *ermC* genes even among taxonomically unrelated species, what was not observed for the *ermA* gene. These findings confirm previous indications of the *ermB* gene as the most suitable marker for erythromycin resistance in *S. agalactiae*.

**Keywords:** antibiotic resistance, bovine mastitis, *erm* genes, erythromycin *Streptococcus agalactiae*.

## 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 (SEEGERS et al., 2003). 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. No Brasil, pouco se sabe sobre os perfis e os mecanismos moleculares de resistência a este antimicrobiano em patógenos da mastite. 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.

## Material e Métodos

Foram utilizadas 74 linhagens de *S. agalactiae* 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 que emprega o 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.

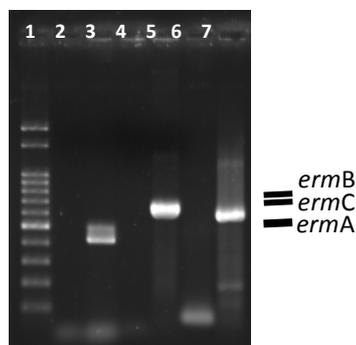
## Resultados e Discussão

Dentre as 74 linhagens de *Streptococcus agalactiae* analisadas no presente trabalho, 35 (47,3%) foram consideradas susceptíveis e 39 (52,7%) apresentaram resistência à eritromicina no teste fenotípico realizado por antibiograma. Duarte et al. (2004) verificaram em um estudo realizado no Brasil que 10,5% das linhagens de *S. agalactiae* isoladas bovinos eram resistentes à eritromicina e Gao et al. (2012) relataram uma taxa de 23,5% de resistência em isolados de rebanhos bovinos na China. Isso demonstra que o nível de resistência a esse antimicrobiano nas linhagens de *S. agalactiae* isoladas de rebanhos bovinos na região da Zona da Mata Mineira 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). Para todas as linhagens supramencionadas foram obtidas ampliações específicas dos fragmentos de DNA de 421pb e 572pb correspondentes aos genes *ermA* e *ermC*, respectivamente (Figura 1). Análises das sequências de nucleotídeos destes *amplicons* demonstraram 100% de identidade com genes *ermA* e *ermC* depositados no NCBI. Estas linhagens foram utilizadas como controles positivos e na otimização das PCRs nas análises subsequentes.

Não foram observadas ampliações dos genes *ermA* e *ermC* para nenhuma das linhagens de *S. agalactiae* analisadas, sugerindo que tais bactérias não carregam estes genes. Considerando que todas as amostras de DNA usadas como controle positivo eram provenientes 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 *in silico* nos genomas de diferentes espécies bacterianas (*S. agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus spp.*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus uberis*, entre outros) depositados no NCBI, utilizando os mesmos conjuntos de oligonucleotídeos usados no presente trabalho e outros descritos na literatura. As análises de comparação de sequências para o genes *ermB* e *ermC* evidenciaram um elevado grau de similaridade (>90%) entre os genes detectados mesmo quando obtidos de espécies pouco relacionadas do ponto de vista taxonômico.

Em um estudo prévio de nossa equipe foi verificada a presença do gene *ermB* em todas essas linhagens, o que provavelmente explica a resistência à eritromicina nestes isolados (comunicação pessoal). Um resultado semelhante foi relatado por Dogan et al. (2005) estudando *S. agalactiae* de bovinos em Nova York onde se constatou que 100% dos isolados resistentes carregavam o gene *ermB*. O fato de não se ter detectado o gene *ermC* no presente trabalho pode ser explicado pela sua provável ausência no genoma das linhagens de *S. agalactiae* analisadas, enquanto que para o gene *ermA*, será necessário realizar novas buscas usando outros conjuntos de oligonucleotídeos para descartar a possibilidade da presença do gene no genoma dessas linhagens. Este resultado corrobora os dados da literatura de que a resistência à 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 o momento em *Staphylococcus spp.*



**Figura 1.** Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de amplificação dos genes *erm*. Marcador 100pb (1), controles negativos (2, 4 e 6), gene *ermA* - 421 pb (3), gene *ermC* - 572 pb (5) e gene *ermB* - 639 pb (7).

## Conclusões

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*.

## Agradecimentos

Ao CNPq (Processo 578430/2008-8), à Fapemig (Processo PPM-00406-14), à Embrapa (Projeto MP3 Código 03.13.14.006.00.00) e ao técnico do Laboratório de Microbiologia do Leite, Marcos A. S. Silva.

## Referências

- DOGAN, B., SCHUKKEN, Y. H., SANTISTEBAN, C., BOOR, K. J. Distribution of serotypes and antimicrobial resistance genes among *Streptococcus agalactiae* isolates from bovine and human hosts. **J. Clin. Microbiol.** 43, 5899–5906, 2005.
- DUARTE, R. S., MIRANDA, O. P., BELLEI, B. C., BRITO, M. A. V. P.; TEIXEIRA, L. M. 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., YU, FU-QING, LUO, L. P., JIAN-ZHONG H., RONG-GUANG H., HAN-QI, Z., SHU-MEI, L. C., SU., J. L., HAN, B. Antibiotic resistance of *Streptococcus agalactiae* from cows with mastitis. **The Vet. J.**, 194:423-424, 2012.
- LINA, G.; QUAGLIA, A.; REVERDY, M. E.; LECLERCQ, R.; VANDENESCH, F.; ETIENNE, J. Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins among staphylococci. **Antimicrob. Agents Chemother.** 43:1062-1066, 1999.
- PINTO, T. C.; COSTA, N.S.; VIANNA, A.R.; SILVA, L.G.; CORRÊA, A.B.; FERNANDES, F.G.; OLIVEIRA, I.C.; MATTOS, M.C.; ROSADO, A.S; BENCHETRIT, L.C. Distribution of serotypes and evaluation of antimicrobial susceptibility among human and bovine *Streptococcus agalactiae* strains isolated in Brazil between 1980 and 2006. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 17, n. 2, p. 131-136, Mar./Apr. 2013.
- SEEGERS, H.; FOURICHON, C.; BEAUDEAU, F. Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. **Vet. Res.**, 34:475-491, 2003.