

DIVERSIDADE MOLECULAR, FORMAÇÃO DE BIOFILME E RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS DE *Staphylococcus aureus* ASSOCIADOS A BOVINOS

Aline Leandra Carvalho Ferreira¹, Ana Cláudia Dumont Oliveira², José Ferronato², Fernando Souza^{1,2}, Eduardo Milton Ramos Sanchez^{5,6}, Alessandro Guimarães^{3,4}, Sérgio Caldas⁷, Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira¹

¹Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil. ²Veterinary Clinical Immunology Research Group, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. ³EMBRAPA-Gado de Leite, Juiz de Fora, Brasil. ⁴Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Brasil. ⁵Department of Public Health, School of Health Sciences, National University Toribio Rodriguez de Mendoza of Amazonas, Chachapoyas, Peru. ⁶Laboratório de Sorologia e Imunobiologia, Instituto de Medicina Tropical, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. ⁷Fundação Ezequiel Dias

INTRODUÇÃO

Mastite é a doença que mais impacta os rebanhos leiteiros no Brasil e em todo o mundo. Entre os patógenos causadores da mastite bovina, *Staphylococcus aureus* se destaca. Embora a principal fonte de *S. aureus* nas infecções intramamárias (IIM) em bovinos seja o úbere, este patógeno pode também ser isolado também de de sítios extra mamários, como fossas nasais. Nesse sentido a presença de *S. aureus* em rebanhos bovinos representa um risco à saúde pública, pois os bovinos são considerados o principal reservatório para o aparecimento de novos clones epidêmicos de *S. aureus*.

O uso extensivo ou a má gestão do uso de antimicrobiano no tratamento da mastite bovina pode representar desafio para a saúde pública, devido ao potencial de seleção de bactérias resistentes e seu impacto na saúde única. Outro aspecto importante refere-se à formação de biofilmes que representa um dos fatores que protege *S. aureus* contra um ambiente hostil, possibilitando a evasão do sistema imune e da terapia antimicrobiana. Neste contexto, o *quorum sensing* pelo sistema *agr* representa papel importante na formação de biofilmes (Toledo-Silva et al., 2021), que também foi investigado no presente estudo.

Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar e comparar os *spa* tipos de *S. aureus* isolados de leite e de fossas nasais (*swab nasal*), associados ao fenótipo e genótipo de formação de biofilme e de resistência aos antimicrobianos.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização do presente trabalho foram incluídos 218 isolados de *S. aureus* (212 amostras de leite e seis amostras de *swab* nasal) proveniente de quatro rebanhos leiteiros (Fazendas A, B, C e D), entre 2013 e 2015 (Ladeira et al., 2017; Santos et al., 2020). Os isolados foram previamente identificados por testes bioquímicos e confirmados por MALDI-Tof MS e pela presença do gene *nuc* (Ladeira et al., 2017; Santos et al., 2020). A produção de biofilme foi mensurada *in vitro* pelo teste de aderência em placa de poliestireno, e a qPCR para identificação dos genes associados a produção de biofilme (*icaABCD* e *bap*). Também foi pesquisada a presença do gene *agr* que é considerado um regulador do sistema *quorum sensing* e que possui correlação com a produção de biofilme e resistência aos antimicrobianos.

Para a avaliação do fenótipo e genótipo associados à resistência antimicrobiana foi realizado o teste de concentração inibitória mínima (CIM) para os seguintes antimicrobianos, incluindo aqueles criticamente importantes de acordo com a categorização da União Europeia: Ampicilina (AMP), Ceftiofur (CEF), Ciprofloxacina (CIP), Eritromicina (ERI), Florfenicol (FFC), Gentamicina (GEN), Novobiocina (NOV), Oxacilina (OXA), Sulfametoxazol+trimetoprima (SUT) e Tetraciclina (TET). Para a

realização da genotipagem alguns genes de resistência antimicrobiana entre os isolados resistentes e indeterminados foram testados para os seguintes antimicrobianos: ciprofloxacino (CIP), gentamicina (GEN), oxacilina (OXA) e tetraciclina (TET). Para a identificação dos *spa* tipos presentes realizou-se a amplificação da região repetida (X) da proteína A. Foram realizadas análises descritivas das variáveis incluídas no estudo, com a determinação de suas frequências absolutas e relativas. Para verificação de possíveis associações entre as variáveis foi realizado o Teste Exato de Fisher considerando-se um nível de significância estatística de 5% ($P \leq 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O fenótipo fracamente aderente foi predominante (82,68%) em todos os isolados. Em relação aos genes associados à formação do biofilme, o gene *icaABCD* foi amplificado em 100% dos isolados dos rebanhos A, B e D, e no rebanho C houve amplificação para *icaA* de 92,20%, *icaBC* 94,10%, e *icaD* 96,10%. Por outro lado, o gene *bap* esteve presente em 7,9%, 1,2%, 1,77% e 2,17% nos rebanhos A, B, C e D, respectivamente. O fenótipo moderadamente aderente, frequente em 8,71% dos isolados (19/218), foi associado à presença do gene *bap* (16/218) ($P \leq 0,05$). Estudos anteriores têm demonstrado que a expressão do gene *bap* é altamente correlacionada com a produção de biofilme fortemente aderente, mesmo na ausência do *icaABCD*.

Os *spa* tipos foram relacionados às respectivas fazendas e ao total de isolados encontrados em cada rebanho. Entre os 216 isolados, 86% apresentaram os *spa* tipos t605, t267 e t6861. O t605 foi identificado em 91/97 (93,81%) dos isolados estudados, sendo o único genótipo presente no rebanho D, e em 88,24% dos isolados no rebanho C. O rebanho B apresentou oito diferentes *spa* tipos, e o mais comum foi o t267. O t098 foi identificado no presente estudo, em quatro isolados coletados de *swab* nasal de animais do rebanho B. Já no rebanho A o *spa* tipo mais comum foi o t6861. Este trabalho foi o primeiro a reportar o *spa* tipo t6861 no Brasil.

Número de isolados de *Staphylococcus aureus* resistentes no teste de concentração inibitória mínima, distribuição entre os *spa* tipos e identificação de genes de resistência estão descritos na tabela 1.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A distribuição e prevalência dos distintos *spa* tipos em diferentes rebanhos destaca a importância de se conhecer melhor quais cepas estão circulantes e as implicações de sua presença na ocorrência de mastite, suas formas de prevenção e tratamento. Além disso, nosso estudo foi o primeiro a descrever a presença do *spa* t6861 no Brasil.

A frequência de amplificação dos genes *bap* foi associada ao fenótipo fracamente aderente e pode estar associada à resistência dos isolados

A multirresistência foi encontrada em 20% dos isolados e representam uma preocupação, uma vez que oito destes antimicrobianos fazem parte da lista da OIE como criticamente importantes

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Toledo-Silva, B., Souza F. N., Piepers, S., Mertens, K., Haesebrouck, F., De Vliegher, S. Metabolites of bovine-associated non-aureus staphylococci influence expression of *Staphylococcus aureus* agr-related genes in vitro. **Veterinary Research**, 52(1):62,2021.
- LADEIRA, C. V. G. **Perfil genotípico de *Staphylococcus aureus* e variáveis zootécnicas e climáticas associadas à mastite em vacas mestiças**. Tese (Doutorado pelo Departamento de Tecnologia e Inspeção). Escola de Veterinária da UFMG. Belo Horizonte, p. 63. 2017.
- Santos, R. P. et al. Molecular typing and antimicrobial susceptibility profile of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from bovine mastitis and nasal samples. **Animals**, v. 10, n. 11, p. 1–9, 2020.

Tabela 1 - Número de isolados de *Staphylococcus aureus* resistentes no teste de concentração inibitória mínima, distribuição entre os spa tipos e identificação de genes de resistência

Rebanho A			Rebanho B			Rebanho C			Rebanho D		
Resistência ATM %	spa tipo (nº de isolados)	Gene de resistência (nº de isolados)	Resistência ATM %	spa tipo (nº de isolados)	Gene de resistência (nº de isolados)	Resistência ATM %	spa tipo (nº de isolados)	Gene de resistência (nº de isolados)	Resistência ATM %	spa tipo (nº de isolados)	Gene de resistência (nº de isolados)
AMP (79,5)	t002 (3); t6861 (26); Unknowns (2)		AMP (86,42)	t1200 (1); t1236 (3); t127 (6); t267 (56); t306 (1); t359 (1); t7433 (1)		AMP (64,0)	t605 (30); t189 (2)		AMP (89,13)	t605 (41)	
CEF (0)			CEF (0)			CEF (0)			CEF (2,17)	t605 (1)	
CIP (7,69)	t6861 (3)	mepA (3)	CIP (0)			CIP (4,0)	t605 (2)	mepA (2)	CIP (0)		
ERI (2,56)	t6861 (1)		ERI (0)			ERI (6,0)	t605 (3); t098 (3); t605(14); t189 (2)		ERI (2,17)	t605 (1)	
FFC (35,89)	t002 (1); t6861 (12); Unknown (1)		FFC (32,1)	t1200 (1); t127 (4); t267 (19); t306 (1); t7433 (1)		FFC (38,0)	t605(28)		FFC (43,48)	t605 (20)	
GEN (20,51)	t6861 (5); t002(3)	aacA-aphD (4)	GEN (9,87)	t127 (1); t267 (6)		GEN (56,0)	t605(28)	aacA-aphD (27)	GEN (10,87)	t605 (5)	aacA-aphD (1)
NOV (76,92)	t002 (3); t6861 (26); Unknown (1)		NOV (55,56)	t1236 (2); t127 (4); t267 (36); t306 (1) t267 (1)		NOV (24,0)	t605(9); t189 (1); t098 (2)		NOV (50,0)	t605 (23)	
OXA (5,13)	t002 (1); t6861 (1)		OXA (1,23)			OXA (0)			OXA (6,52)	t605 (3)	
SUT (2,56)	t6861 (1)		SUT (5,0)	t127 (3); t267 (1)		SUT (8,0)	t605(2); t189 (1); t098(1)		SUT (10,87)	t605 (5)	
TET (38,46)	t6861 (15)	tet(K) (15)	TET (2,5)	t1236 (1); t267 (1)	tet(K) (1)	TET (58,0)	t605(29)	tet(L) (28)	TET (6,52)	t605 (3)	tet(K) (1) tet(L) (1)

Legenda: Ampicilina (AMP), ceftiofur (CEF), ciprofloxacina (CIP), eritromicina (ERI), florfenicol (FFC), gentamicina (GEN), novobiocina (NOV), oxacilina (OXA), sulfametoxazol+trimetoprima (SUT) e tetraciclina (TET).