

## Uso de PCR Duplex para detecção dos genes *femA* e *mecA* e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) em *Staphylococcus aureus* isolados de leite cru

Detection of *femA* and *mecA* genes in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine raw milk using duplex PCR and determination of the minimum inhibitory concentration of the isolates

RIALA6/1615

Junia Pacheco TEIXEIRA<sup>1\*</sup>, Nivaldo da SILVA<sup>1</sup>, Leorges Moraes da FONSECA<sup>2</sup>, Geraldo Marcio da COSTA<sup>3</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Laboratório de Pesquisa e Diagnóstico em Doenças Infecciosas (LPDDI), Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Av. Presidente Antônio Carlos 6627, CEP 30161-970, Pampulha, Belo Horizonte, MG. E-mail: junia\_pacheco@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Laboratório de Análise da Qualidade do Leite (LabUFMG), Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais

<sup>3</sup>Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras (UFV)

Recebido: 09.07.2014 - Aceito para publicação: 30.09.2014

### RESUMO

O objetivo deste trabalho foi de identificar *Staphylococcus aureus* e as linhagens resistentes à meticilina (MRSA) em amostras de leite cru bovino, por meio de métodos moleculares, e de determinar a concentração inibitória mínima (CIM) dos isolados. *S. aureus* pode apresentar linhagens resistentes à meticilina e a outros antimicrobianos utilizados na prática médico-veterinária. Foram analisadas 251 amostras de leite cru de tanques de expansão, procedentes de cinco mesorregiões produtoras de leite de Minas Gerais – Brasil. Por meio de PCR foi identificada a presença do gene *femA* em 278 isolados de *S. aureus*; e as linhagens MRSA foram determinadas pela presença do gene *mecA*. Os ensaios de PCR foram positivos para gene *femA* em 100 % dos isolados testados; e entre essas amostras 11 (3,95 %) apresentaram produto amplificado de 533 pb correspondente ao gene *mecA*. Para analisar a susceptibilidade dos isolados foi realizado o teste de CIM para nove substâncias antimicrobianas. Foram identificados 149 isolados de *S. aureus* que apresentaram CIM ≤ 4 µg/mL para enrofloxacin, com 92,54 % de susceptibilidade, e 55 isolados testados para sulfametoxazol+trimetoprima, apresentaram CIM ≤ 2 µg/mL com 83,33 % de susceptibilidade. Estes antimicrobianos foram considerados os mais eficazes.

**Palavras-chave.** concentração inibitória mínima, *femA*, *mecA*, *Staphylococcus aureus*, resistência à meticilina.

### ABSTRACT

This study identified *Staphylococcus aureus* and the methicillin-resistant (MRSA) strains in raw milk samples using molecular methods, and their minimum inhibitory concentrations (MIC) were evaluated. Two hundred fifty-one samples of raw milk samples from bulk tanks, collected in the state of Minas Gerais, Brazil were analyzed using polymerase chain reaction (PCR) to investigate the presence of *femA* gene in 278 *S. aureus* isolates. Furthermore, MRSA strains were investigated for detecting *mecA* gene. All of 278 isolates contained the *femA* gene (132 bp), and in 11 samples (3.95 %) the *mecA* gene (533 bp) was identified. The minimum inhibitory concentration against *S. aureus* was determined using enrofloxacin, trimethoprim-sulfamethoxazole, gentamicin, azithromycin, tetracycline, cephalothin, amoxicillin, penicillin G and lincomycin. Enrofloxacin and trimethoprim-sulfamethoxazole showed to be the most effective inhibitors, as this study identified 149 of 161 isolates (92.5 % of susceptibility) with MIC ≤ 4 mg/mL, and 55 of 66 isolates (83.3 % of susceptibility) with MIC ≤ 2 mg/mL, for the first antimicrobial drug and the second one, respectively.

**Keywords.** minimum inhibitory concentration, *femA*, *mecA*, *Staphylococcus aureus*, methicillin resistance.

## INTRODUÇÃO

*Staphylococcus aureus* destaca-se como um dos agentes etiológicos mais frequentemente associados à mastite bovina, fato que representa sério risco para a saúde pública. Além disso, a inflamação da glândula mamária bovina ocasiona problemas de sabor e aroma no leite e seus derivados, menor rendimento na fabricação de queijos e perda de gordura e caseína no soro<sup>1,2</sup>. Existe ainda, o risco de a bactéria chegar aos alimentos já processados, seja por contaminação cruzada, que pode ser de origem animal, principalmente o gado leiteiro, ou pela ação dos manipuladores, na maioria, portadores assintomáticos. Um ponto crítico de controle que deve ser observado é a produção de enterotoxinas (SEs) que, por serem termotolerantes, podem permanecer no produto final após o processamento térmico<sup>3,4</sup>.

A rotina de diagnóstico microbiológico para o *S. aureus* está baseada em culturas bacteriológicas, nas características fenotípicas e morfotintoriais, bem como na sua identificação por técnicas bioquímicas. Estes métodos, porém, possuem baixa sensibilidade, sendo necessária a aplicação de testes mais sensíveis e que tenham maior especificidade e rapidez, como a reação em cadeia da polimerase-PCR, realizada diretamente em isolados bacteriológicos e em materiais clínicos, como o leite<sup>5,6</sup>.

A identificação de *S. aureus* por PCR pode ser feita pela detecção do gene *femA*, que tem como produto uma proteína de 48-50kDa, reconhecida como um fator específico e codificada cromossomicamente neste patógeno, sendo envolvido na estrutura da parede celular bacteriana<sup>2-11</sup>.

Amostras de *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA) são reconhecidamente um dos principais problemas de infecção hospitalar no homem e em animais. Nos últimos anos, o aumento de estirpes resistentes à meticilina tornou-se um sério problema clínico e epidemiológico. Mais uma vez, com a utilização da PCR é possível identificar isolados MRSA utilizando a detecção do gene *mecA*<sup>5,10,12</sup>. Considerado padrão ouro para diagnóstico, o gene *mecA* pode ser utilizado como um indicador de virulência dos isolados, uma vez que estirpes MRSA são frequentemente resistentes à maioria dos agentes antimicrobianos, incluindo aminoglicosídeos, macrolídeos, cloranfenicol, tetraciclina e fluorquinolonas<sup>13</sup>. O tipo de resistência dos MRSA é intrínseca, não sendo devida à destruição do antibiótico por lactamases, e sim, por modificações na estrutura-alvo do antimicrobiano.

A utilização de antimicrobianos é um componente importante dos programas de controle da mastite bovina. Assim, a seleção do antimicrobiano apropriado é essencial, tanto do ponto de vista da saúde do animal, quanto da produtividade da glândula mamária; os resultados dos testes de susceptibilidade a antimicrobianos ajudam o médico veterinário clínico na escolha dos medicamentos apropriados<sup>7,14,15</sup>. No caso das infecções estafilocócicas da glândula mamária, porém, a eficiência destes tratamentos é variável (3,6 % a 92 %), segundo Owens et al<sup>16</sup>. Nestes casos, para aumentar a eficiência dos tratamentos destas infecções, a alternativa é a utilização de dosagens maiores que as encontradas nos produtos comerciais. Isto pode ser avaliado, “in vitro”, por meio da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) considerada uma importante ferramenta para o controle das infecções estafilocócicas<sup>17,18</sup>. Este método está padronizado, possui detalhamento técnico bem definido e apresenta a vantagem de fornecer dados quantitativos que podem ser interpretados considerando as características farmacológicas e farmacocinéticas dos antimicrobianos e a concentração mínima a ser alcançada no úbere bovino<sup>15,19-21</sup>.

Este trabalho teve por objetivo identificar por métodos moleculares amostras de *S. aureus* e de MRSA isoladas de leite cru e determinar a concentração inibitória mínima (CIM) como uma contribuição aos estudos das infecções causadas por este micro-organismo.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostras de leite

As amostras de leite, de tanques de resfriamento, foram obtidas do Laboratório de Qualidade de Leite-LabUFMG, na Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (EV-UFMG)/Brasil. Foram obtidas 251 amostras de leite cru, procedentes de cinco microrregiões produtoras de leite de Minas Gerais (Central Mineira, Noroeste de Minas, Vale do Mucuri, Região Metropolitana, Vale do Rio Doce). Uma alíquota de 10µl de leite<sup>7</sup> foi plaqueada em placas de ágar seletivo Baird-Parker (BP) (M043 HIMEDIA Laboratories, Índia) suplementado com gema de ovo e de telurito de potássio (LaborClin®). Após este procedimento, as placas foram incubadas a 37 °C durante 24 horas. Após observação de colônias típicas e atípicas para *S. aureus* foi realizada identificação fenotípica com coloração de Gram, teste de coagulase em tubo, hidrólise da uréia e fermentação dos açúcares manitol, trealose, e sacarose<sup>22</sup>. No total de 278

colônias de *S. aureus* foram isoladas com confirmação posterior por teste de genotipagem pela amplificação do gene *femA* em PCR. Os isolados foram inoculados em caldo infusão de cérebro e coração (BHI), com 20 % de glicerol (v/v) e congelados a -20 °C, em tubos eppendorf, em triplicata, para utilização posterior.

### Extração de DNA para amplificação

Os isolados de *S. aureus* obtidos de amostras de leite foram submetidos à extração de DNA pelo método de lavagem alcalina<sup>6,9,23</sup>. O DNA foi quantificado por densidade óptica em espectrofotômetro (NanoDrop® ND-1000 UV-Vis) e mantidos a -20 °C, até utilização. Foram utilizadas amostras de *S. aureus* ATCC 25923 como controle positivo.

### Detecção dos genes *femA* e *mecA* pela PCR Duplex

Segundo Dias<sup>9</sup>, os iniciadores utilizados para a amplificação de fragmento de 132 pb (pares de bases) do gene *femA* foram: fem-A1 5' AAAAAGCACATAACAAGCG 3' e fem-A2 5' GATAAAGAAGAAACCAGCAG 3'. Para o gene *mecA* foram amplificados fragmentos de 533 pb, usando os iniciadores mec-A1 (5' AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC 3') e mec-A2 (5' AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC 3'). De acordo com metodologia adaptada<sup>9,24</sup> o volume final da reação da PCR duplex foi de 50 µL. Foram utilizados 2,5 µL de tampão 10X (Phoneutria®), 10 µL de dNTP (0,2 mM), 0,25 µL de cada iniciador (25 pmol / L), 2,0 U de Taq polimerase (Phoneutria®) e 5 µL de DNA molde (50-100 ng). A amplificação foi realizada em um termociclador (Mini Cycler, MJ Research), com os seguintes ciclos: desnaturação inicial a 94 °C durante 5 minutos, seguido por 35 ciclos de amplificação (desnaturação a 94 °C durante 1 minuto, hibridação a 57 °C durante 2 minutos e extensão a 72 °C, durante 2 minutos), terminando com a extensão final a 72 °C durante 10 minutos. O tampão de corrida utilizado foi o Tris-borato-EDTA gel (TBE) a 0,5X em gel de agarose a 2 % a correr a 100 volts durante 90 minutos. Como marcador molecular foi utilizado 100 bp DNA Ladder Promega®. O gel de eletroforese foi fotografado usando o programa Image LPix através do aparelho de Biotecnologia Loccus L.Pix® Imagem Molecular.

### Testes de Susceptibilidade aos Antimicrobianos

Foram testados todos os isolados de *S. aureus*, segundo o método de difusão em disco interpretados

segundo CLSI<sup>25</sup>. Foram utilizados os seguintes antimicrobianos (Cecon®): amoxicilina - 10 µg (AMOX), azitromicina - 15 µg (AZIT), cefalotina - 30 µg (CFL), enrofloxacin - 5 µg (ENO), gentamicina - 10 µg (GEN), lincomicina - 2 µg (LIN), penicilina G - 10 UI (PEN), sulfametoxazol + trimetoprima -25 µg (SUT) e tetraciclina - 30 µg (TET).

### Testes CIM - Concentração Inibitória Mínima

Para a determinação da CIM foram adquiridos os mesmos antimicrobianos em pó (Sigma-Aldrich® - E.U.A). Tanto as suspensões, como placas de ágar de Muller-Hinton (HIMEDIA Lab., India), contendo estes antimicrobianos, foram preparadas de acordo com as instruções do CLSI<sup>26</sup>. As concentrações variaram de 0,125 a 256 µg de cada antimicrobiano. Em todos os testes foram utilizadas amostras controle American Type Culture Collection (ATCC): *S. aureus* ATCC 25923, *S. epidermidis* ATCC 12228. Placas sem antimicrobianos foram usadas como controle de crescimento bacteriano.

Os isolados de *S. aureus* foram plaqueados em ágar Baird Parker (HIMEDIA Lab., India) e mantidos a 37 °C por 18-24 horas. Após crescimento 3-5 colônias foram homogeneizadas em 2 mL de PBS estéril (pH 7,2) até turbidez equivalente a padrão 0,5 da escala de McFarland de acordo com CLSI<sup>26</sup>. Cada cultura em suspensão foi transferida para o replicador de Steer<sup>27</sup> e as placas foram inoculadas com 1 µL da suspensão bacteriana, não excedendo em 20 minutos o tempo entre a preparação do inóculo e a incubação por 24 h/37 °C.

A interpretação dos resultados foi de acordo com CLSI<sup>28</sup>. O CIM dos isolados de *S. aureus* foi definido como a concentração mais baixa à qual não foi observado nenhum crescimento bacteriano visível a olho nu. Além disso, as concentrações capazes de inibir 50 % e 90 % dos isolados, designados CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub>, respectivamente, foram determinadas conforme CLSI<sup>28</sup>. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

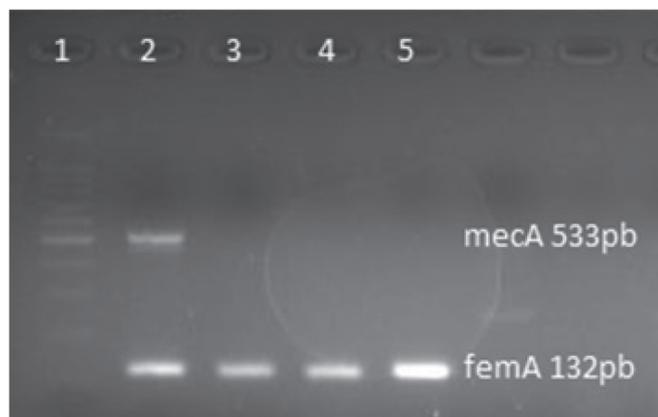
### ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados de susceptibilidade obtidos dos testes de difusão em ágar foram tabulados de acordo com CLSI<sup>25</sup> e correlacionados pelo qui-quadrado ( $\chi^2$ ) e teste de Fisher através do programa Graph Pad versão 3.06,32-2003. Comparações com valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. Os testes de MIC para susceptibilidade do *S. aureus* aos antimicrobianos testados foram avaliados de acordo com CLSI<sup>19,28</sup>.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Detecção dos genes *femA* e *mecA*

Das 251 amostras de leite cru foram obtidas 278 colônias isoladas de *S. aureus* identificadas por métodos fenotípicos e microbiológicos<sup>22</sup>. Todas as 278 colônias (100 %) foram positivas para a presença do gene *femA* por apresentarem um produto amplificado de 132 pb (Figura 1). Destes, foram encontradas por PCR 11 amostras (3,95 %) que apresentaram um produto amplificado de 533 pb correspondente ao gene *mecA*. Deste total, sete isolados foram obtidos a partir da região metropolitana de Belo Horizonte/MG, um isolado a partir da região Central Mineira/MG, um isolado da região do Vale do Rio Doce/MG, um isolado da Região Noroeste/MG e um isolado do Vale do Mucuri/MG. Pela pesquisa do gene *mecA*, estas amostras foram consideradas resistentes à meticilina ou MRSA.



**Figura 1.** Reação em cadeia pela polimerase-PCR - para detecção dos genes *femA* e *mecA*

Canaleta 1- PAD-padrão de peso molecular 100 pb; Canaleta 2-gene *mecA* 533pb + *femA* 132pb; Canaletas 3, 4 e 5- apenas gene *femA* (*Staphylococcus aureus*). Testes visualizados sob luz U.V. em gel de agarose 2 %, corados com brometo de etídio (1mg/mL). Gel fotografado com a utilização do programa LPix Image através do aparelho L.Pix Molecular Imaging Loccus Biotecnology®

O trabalho de Mehrotra et al<sup>29</sup> mostrou uma correlação de 100 % entre a presença do gene *femA* e os isolados de *S. aureus* MRSA, semelhantes a este trabalho uma vez que, o gene *femA* é reconhecido como um fator naturalmente codificado no cromossomo do *S. aureus*, tem como produto uma proteína de 48 kDa, está relacionada com o metabolismo da parede celular bacteriana e pode ser encontrado em culturas

de crescimento ativo. Dias et al<sup>10</sup> após analisarem 200 amostras obtidas de leite de outras regiões leiteiras de Minas Gerais para detecção do gene *femA* por PCR diretamente do leite cru, encontraram 145 (72,5 %) amostras positivas para a presença de *S. aureus*.

MRSA estão presentes em diversas propriedades produtoras de leite, distribuídas em diferentes regiões, com diferentes percentuais<sup>31</sup> e a presença do gene *mecA* é considerada um pré-requisito para a identificação de *S. aureus* MRSA de acordo com Mehrotra et al<sup>29</sup> que ao examinaram 19 linhagens obtidas de amostras de MRSA conhecidas, encontraram 18 (94,73 %) eram positivas para a presença do gene *mecA*, responsável pela resistência à meticilina.

No presente trabalho, 11 amostras de *S. aureus* (3,95 %), apresentaram um produto amplificado de 533 pb correspondente ao gene *mecA* e foram consideradas resistentes à meticilina ou MRSA, resultados semelhantes segundo segundo Moon et al<sup>32</sup> que, ao avaliarem 140 propriedades produtoras de leite na Korea, identificaram 696 amostras de *S. aureus* e destes, 19 (2,7 %) foram resistentes à meticilina. Por outro lado, em Minas Gerais, Dias et al<sup>10</sup> encontraram 18 amostras de leite (11,0 %) 200 isolados de *S. aureus* como portadoras do gene *mecA*. Na obra de Huletsky et al<sup>33</sup>, testes feitos com uma variedade de estirpes de *Staphylococcus* spp. e *S. aureus*, pelo método de PCR multiplex, detectaram que em 1.657 estirpes testadas, 1636 (98,7 %) foram identificados como MRSA.

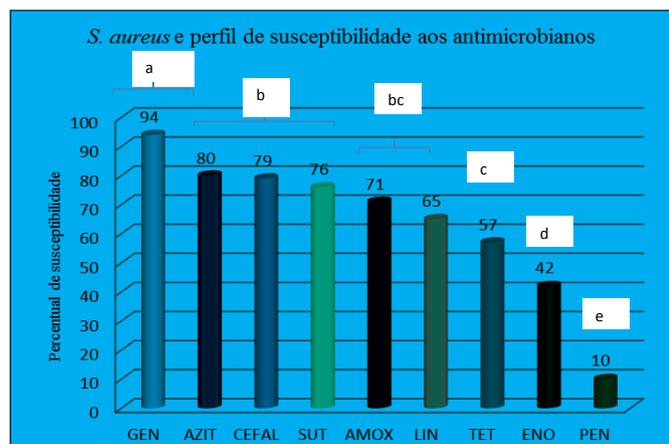
A resistência dos *Staphylococcus* spp. à meticilina pode ser mediada por um determinante que transporta o gene *mecA* estrutural, que por sua vez, codifica uma proteína de ligação à penicilina (PBP) ligada à afinidade da PBP para beta-lactâmicos<sup>33,34</sup>. O provável uso indiscriminado dos antimicrobianos disponíveis no mercado e a alta capacidade adaptativa dos *S. aureus* podem possibilitar a seleção de linhagens resistentes a diversos antimicrobianos<sup>14</sup>, o que justifica os diferentes percentuais de amostras de MRSA positivos encontrados. Da mesma forma, amostras clínicas de *S. aureus* ou estafilococos coagulase negativos (SCN) também podem transportar o gene *mecA*, muitas vezes sem expressá-lo<sup>34</sup>.

### Teste de Concentração Inibitória Mínima-CIM

Inicialmente foram realizados testes de difusão em ágar de acordo com CLSI<sup>25,26</sup> em todas as amostras de *S. aureus* isoladas de leite cru para conhecer o nível de susceptibilidade aos diferentes antimicrobianos.

Das 278 colônias de *S. aureus* isoladas, foram

encontradas 263 amostras (94,0 %) susceptíveis a gentamicina; 222 (80,0 %) a azitromicina; 220 (79,0 %) a cefalotina; 212 (76,0 %) a sulfametoxazol-trimetoprima (SUT); 197 (71,0 %) a amoxicilina; 181 (65,0 %) a lincomicina; 159 (57,0 %) a tetraciclina; 117 (42,0 %) a enrofloxacina e 29 amostras (10,0 %) susceptíveis a penicilina (Figura 2).



**Figura 2.** Perfil de susceptibilidade (método de difusão em ágar) frente aos antimicrobianos testados das colônias de *S. aureus* isoladas a partir de leite de cinco microrregiões do estado de Minas Gerais. a; b; c; d; e; com  $p < 0,0001$ ;

Assim as provas de concentração inibitória mínima foram realizadas nos isolados resistentes onde CIM foi definida como a menor concentração em que não foi observado nenhum crescimento bacteriano visível a olho nu<sup>25</sup>. Este teste apresenta a vantagem de fornecer dados quantitativos<sup>19</sup> sendo que CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> indicam a menor concentração capaz de inibir o crescimento de 50 % e 90 % dos isolados, respectivamente (Tabela 1).

Para analisar o perfil de susceptibilidade das amostras, pelo método CIM, os dados foram confrontados com parâmetros de CLSI<sup>28</sup>. Somente com a utilização deste foi possível fazer a caracterização das amostras como sensível (S) ou resistente (R) frente ao antimicrobiano testado.

Portanto, os parâmetros para avaliar a resposta das amostras às diferentes concentrações, pelo método CIM, foram: para amoxicilina,  $\leq 0,25$  (S) a  $\geq 0,5$   $\mu\text{g/mL}$  (R); azitromicina,  $\leq 2,0$  (S) a  $\geq 8$   $\mu\text{g/mL}$  (R); cefalotina,  $\leq 8,0$  (S) a  $\geq 32$   $\mu\text{g/mL}$  (R); enrofloxacina,  $\leq 4,0$  (S) a  $\geq 16$   $\mu\text{g/mL}$  (R); gentamicina,  $\leq 4,0$  (S) a  $\geq 16$   $\mu\text{g/mL}$  (R); lincomicina,  $\leq 0,5$  (S) a  $\geq 4$   $\mu\text{g/mL}$  (R); penicilina G,  $\leq 0,12$  (S) a  $\geq 0,25$   $\mu\text{g/mL}$  (R); sulfametoxazol + trimetoprima (SUT)  $\leq 2,0$  (S) a  $\geq 4$   $\mu\text{g/mL}$  (R) e tetraciclina,  $\leq 4,0$  (S) a  $\geq 16$   $\mu\text{g/mL}$  (R).

**Tabela 1.** Concentração inibitória mínima-CIM das amostras de *S. aureus* e respostas de susceptibilidade às diferentes concentrações dos agentes antimicrobianos testados

Antimicrobiano (nº amostras testadas)	Ponto de corte $\mu\text{g/mL}^1$	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )											
		Concentrações dos antimicrobianos testados e											
		número de isolados susceptíveis encontrados em cada concentração											
		0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
Enro (161)	$\leq 4$	23	29	24	28 <sup>A</sup>	32	13 <sup>B</sup>	12					
Sut (66)	$\leq 2$					56 <sup>A</sup>	5 <sup>B</sup>	1	1			3	
Genta (15)	$\leq 4$	1	2	2	2	2 <sup>A</sup>	3		1	1 <sup>B</sup>	1		
Azit (56)	$\leq 2$			7	18	16 <sup>A</sup>	2	2	6 <sup>B</sup>	5			
Tetra (119)	$\leq 4$			39	36 <sup>A</sup>	6	5		3	3	3	18 <sup>B</sup>	6
Cefalo (58)	$\leq 8$	8	9	5	7 <sup>A</sup>	3	1	5	8	9 <sup>B</sup>	3		
Amox (81)	$\leq 0,2$		30	17 <sup>A</sup>	13	8	8 <sup>B</sup>	4			1		
Pen G (249)	$\leq 0,12$	46	22	38	32 <sup>A</sup>	27	16	5	18	18	10 <sup>B</sup>	11	6
Linco (97)	$\leq 0,5$		1	12	26	11 <sup>A</sup>	4	6	12	20 <sup>B</sup>	1		4

Antimicrobiano: Enro = enrofloxacina; Sut = sulfametoxazole + trimethoprim; Genta = gentamicina; Azit =azitromicina; Tetra = tetraciclina; Cefalo =cefalotina; Amox =amoxicilina; Pen G = penicilina G 10 UI; Linco =lincomicina; 1 = Ponto de corte interpretativo de susceptibilidade<sup>28</sup>; A = CIM<sub>50</sub> = Concentração que inibiu 50% das amostras testadas; B = CIM<sub>90</sub> = Concentração que inibiu 90% das amostras testadas<sup>19</sup>

Enrofloxacin e o sulfametoxazol+trimetoprima apresentaram atividade inibitória (CIM<sub>90</sub>) para os isolados de *S. aureus*, em concentrações que variaram entre 1-4 µg/mL e 2-4 µg/mL, respectivamente. Em contraste, os antimicrobianos menos efetivos foram azitromicina com CIM entre ≥ 2 - > 16 µg/mL; cefalotina com CIM entre ≥ 1 - > 32 µg/mL; gentamicina e lincomicina com CIM entre ≥ 2 - > 32 µg/mL; a amoxicilina com CIM entre ≥ 0,5 - > 64 µg/mL; a penicilina G com CIM entre ≥ 1 - > 64 µg/mL e a tetraciclina com CIM entre ≥ 1 - > 128 µg/mL, necessitando de altas concentrações para inibir o crescimento de isolados de *S. aureus*.

Os resultados de susceptibilidade à enrofloxacin são semelhantes aos descritos por outros autores<sup>15,18,35,36</sup> que observaram uma CIM ≥ 2 µg/mL para a enrofloxacin e susceptibilidade de 83 % de isolados bovinos de infecções mamárias causadas por *S. aureus*. Por outro lado, o perfil de susceptibilidade dos isolados de *S. aureus* frente à gentamicina variou de 83 a 100 % com CIM = 0,5 µg/mL, enquanto que frente à associação sulfametoxazol+trimetoprima (SUT) esta susceptibilidade foi de 97,3 %. Desta maneira, pode-se considerar que nestas concentrações estes antimicrobianos seriam mais efetivos para o tratamento da mastite bovina estafilocócica.

Quanto à tetraciclina, além de apresentar um CIM<sub>90</sub> de 128 µg/mL foi possível perceber a presença de linhagens frente aos quais o antimicrobiano foi efetivo somente na concentração de 256 µg/mL. Uma possível explicação é a que os isolados remanescentes podem ter utilizado o mecanismo de efluxo ou outro, onde proteínas citoplasmáticas protegeram o ribossomo bacteriano da ação das tetraciclinas permitiram que a síntese proteica prossiga normalmente<sup>37,39</sup>.

Os isolados de *S. aureus* foram resistentes à amoxicilina, penicilina e lincomicina, apresentando CIM<sub>90</sub> = 4 µg/mL, CIM<sub>90</sub> = 64 µg/mL e CIM<sub>90</sub> = 32 µg/mL, respectivamente. Neste caso em mais uma vez foi possível perceber a presença de linhagens frente aos quais os antimicrobianos mostraram atividade bactericida em concentrações maiores, que variaram entre 8 e 256 µg/mL. O trabalho de Giannechini et al<sup>35</sup> ao avaliarem *S. aureus* encontraram CIM<sub>90</sub> > 8 µg/mL e 56 % de resistência à penicilina.

Outros trabalhos<sup>15,17,18,36</sup> apontaram resultados de resistência à beta-lactâmicos (em especial a penicilina) entre 31 a 63 % com CIM > 8 µg/mL. Mesmo que os valores absolutos de resistência encontrados por estes

autores não estejam próximos a este trabalho, deve-se ter em mente que as infecções causadas por *S. aureus* são normalmente tratadas com antimicrobianos, cujas dosagens são estabelecidas com base nos resultados de susceptibilidade observados *in vitro*, e em dados farmacológicos da droga usada. Fatores inerentes ao animal podem afetar a concentração efetiva da droga no sítio de ação. O uso de antimicrobianos para tratamento da mastite é um passo importante para o controle da doença, mas o amplo uso de penicilinas na Medicina Veterinária pode favorecer o desenvolvimento de resistência e explicar a maior prevalência de amostras resistentes aos beta-lactâmicos<sup>36,38</sup>.

Testes para determinação da CIM foram realizados<sup>17</sup> para analisar 123 amostras de *S. aureus* bovino e evidenciaram 26 % de resistência à penicilina com CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> em concentrações de 0,06 a 0,5 µg/mL. Por outro lado, de acordo com Haran et al<sup>18</sup>, após analisarem 101 amostras de leites crus, coletados de tanque, identificaram apenas dois isolados MRSA, sendo 50 % deles resistentes a enrofloxacin e 100 % resistentes à penicilina. Portanto, não existem parâmetros que possam estabelecer quais os percentuais mínimos e máximos de resistência dos isolados de *S. aureus* de casos clínicos de mastites bovinas, frente aos mais diversos antimicrobianos. Tal fato enseja a necessidade de sempre estabelecer o CIM<sub>90</sub>, quando os testes de susceptibilidade a antimicrobianos disponibilizados no mercado apresentem altos índices de resistência, bem como uma menor disponibilidade de produtos para os tratamentos de mastite. Determinado caso a caso, o CIM<sub>90</sub> pode ser uma ferramenta útil para os tratamentos das mastites estafilocócicas, quando não se dispõe de produtos comerciais em baixas concentrações.

## CONCLUSÃO

A identificação de micro-organismos por meio de métodos moleculares é cada vez mais recomendada. No presente estudo, podemos concluir que as amplificações dos genes *femA* e *mecA*, por uma PCR Biplax, mostraram-se úteis para a identificação de *S. aureus* isolados de amostras de leite e devem ser recomendadas como uma alternativa aos métodos bacteriológicos utilizados para o diagnóstico das mastites estafilocócicas.

É conhecida que a presença de amostras MRSA (*mecA*+) representa uma preocupação para a saúde pública, especialmente pela sua presença no leite cru.

Apesar do baixo percentual de MRSA encontrado entre os isolados de *S. aureus*, os resultados forneceram uma visão sobre a presença destes micro-organismos em algumas propriedades das microrregiões analisadas. As autoridades sanitárias devem estar atentas aos casos de multirresistências aos antimicrobianos.

As respostas das mastites causadas por *S. aureus* frente aos tratamentos apresentam resultados variáveis. As infecções causadas por estes micro-organismos são normalmente tratadas com antimicrobianos cujas dosagens são estabelecidas com base nos resultados de susceptibilidade observados *in vitro*, e em dados farmacológicos da droga usada. O perfil de susceptibilidade dos *S. aureus* frente aos antimicrobianos mostram índices de resistência, como observado neste trabalho. Os resultados dos testes de CIM<sub>90</sub> permitem encontrar concentrações mais altas para o uso de antimicrobianos e, assim, aumentar os percentuais de susceptibilidade, como é caso da enrofloxacina e da associação sulfametoxazol+trimetoprima. Pode-se concluir que a CIM<sub>90</sub> é recomendada para a indicação terapêutica dos antimicrobianos e, assim, aumentar a eficiência dos tratamentos das mastites estafilocócicas.

#### AGRADECIMENTOS

Este trabalho contou com apoio financeiro do convênio Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), sob o número 578407/2008-6 e do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), sendo parte do projeto “Pesquisa integrada sobre mastite e qualidade do leite no Brasil”.

#### REFERÊNCIAS

1. Arcuri EF, Brito MAVP, Brito JRF, Pinto SM, Ângelo FF, Souza GN. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*. 2006;58(3): 440-6.
2. Silva ER, Silva N. Coagulase gene typing of *Staphylococcus aureus* isolated from cows with mastitis in southeastern Brazil. *Can J Vet Res*. 2005;69(4): 260-4.
3. Zecconi A, Hahn G. *Staphylococcus aureus* in raw milk and human health risk. *Bull Int Dairy Fed* 2000;1(345):15-8.
4. Proft T, Fraser JD. Bacterial superantigens. *Clin Exp Immunol* 2003;133(1):299 – 306.
5. Phuektes P, Mansell PD, Browning GF. Multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and streptococcal causes of bovine mastitis. *J Dairy Sci* 2001;84(5):1140-8.
6. Silva MA. Utilização de PCR multiplex para o diagnóstico de mastite bovina [dissertação de mestrado]. Belo Horizonte (MG):Universidade Federal de Minas Gerais;2008.
7. Costa GM. Mamite bovina em rebanhos leiteiros da região sul do Estado de Minas Gerais [tese de doutorado]. Belo Horizonte (MG):Universidade Federal de Minas Gerais;2008
8. Andrade APC. Identificação bioquímica, molecular e pesquisa de genes codificadores de enterotoxinas de *Staphylococcus* spp. isolados de queijo coalho [dissertação de mestrado]. Fortaleza (CE): Universidade Federal do Ceará;2009.
9. Dias NL. Identificação de *Staphylococcus aureus*, avaliação do seu potencial enterotoxigênico e resistência a meticilina pela técnica de PCR em amostras de leite da microrregião de Sete Lagoas-MG, 2009 [dissertação de mestrado]. Belo Horizonte (MG): Universidade Federal de Minas Gerais;2010.
10. Dias NL, Silva DCB, Oliveira DCBS. Detecção de genes de *Staphylococcus aureus*, enterotoxinas e de resistência à meticilina em leite. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2011;63(1):1547-52.
11. Ângelo FF. Detecção de genes de exotoxinas em *Staphylococcus* spp. isolados de leite cru refrigerado e de leite de vacas com mastite [tese de doutorado]. Viçosa (MG): Universidade Federal de Viçosa;2010.
12. Lee JH, Jeong JM, Park YH. Evaluation of the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)-screen latex agglutination test for detection of MRSA of animal origin. *J Clin Microbiol*. 2004;42(6):2780-2.
13. Sader HS, Fritsche TR, Jones RN. Antimicrobial activities of ceftaroline and ME1036 tested against clinical strains of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(3):1153-5.
14. Cardoso HFT, Costa GM, Silva N. Susceptibilidade a antimicrobianos de *S. aureus* isolados de leite bovino no Estado de Minas Gerais. *Rev Bras Med Vet Zootec*. 2000;22(5):199-206.
15. Brito MAVP, Brito JRF, Silva MAS. Concentração mínima inibitória de dez antimicrobianos para amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de infecção intramamária bovina. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2001;53(5):531-7.
16. Owens WE, Ray CH, Washburn PJ. Effect of selected antibiotics on *Staphylococcus aureus* present in milk from infected mammary glands. *J Vet Med*. 1993;40(7):508-14.
17. Rubin JE, Ball KR, Chirino-Trejo M. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from various animals. *Can Vet J*. 2011;52(1):153-7.
18. Haran MKP, Godden SM, Boxrud D. Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus*, including Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, isolated from bulk tank milk from Minnesota Dairy Farms. *J Clin Microbiol*. 2012;50(3): 688-95.
19. Salvarani FM, Pinto FF, Lobato FCF. Concentração inibitória mínima (CIM) de oito antimicrobianos frente a isolados de *Streptococcus suis*. *Braz J Vet Res Anim Sci*. 2008;45(1):41-7.
20. Neves MC, Costa JRV, Vieira VC. Resistência aos antimicrobianos e análise da diversidade genética de *Staphylococcus aureus* por PCR-rapd. *Arq Inst Biol*. 2010;77(4):575-82.
21. Kalmus P, Aasmae B, Kärssin A. Udder pathogens and their resistance to antimicrobial agents in dairy cows in Estonia. *Acta Vet Scand*. 2011;53(4):1-7.

22. Quinn PJ, Carter ME, Markey BK. Clinical veterinary microbiology. London:Wolfe; 1994.
23. Cremonesi P, Castiglioni B, Malferrari G. Technical Note: Improved for rapid DNA extraction of mastitis pathogens directly from milk. *J Dairy Sci*. 2006;89(1):163-9.
24. Silva ER. Genotipagem e avaliação do potencial enterotoxigênico de amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite caprina e bovina [tese de doutorado]. Belo Horizonte (MG): Universidade Federal de Minas Gerais;2004.
25. CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute. Methodology of testing antimicrobial sensitivity by dilution for aerobic bacteria growth: norma aprovada. (Substituição da norma A5 vol. 20, n. 2). Sexta edição. M7-A6. 2003; 23(2).
26. CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial- Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 15º suplemento informativo (Substituição da norma M100-S14, vol. 24). 177 p. M100-S15. 2005; 25(1).
27. Carvalho FG. Colonização e identificação de *Streptococcus grupo mutans* e *Candida spp.* em lesões de cárie associadas ou não a Síndrome da Cárie de mamadeira [dissertação de mestrado]. Araraquara (SP): Universidade de São Paulo;2005.
28. CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 20º suplemento (Substituição da norma M100-S19. v. 29, n. 3). 180p. M100-S20. 2010; 30(1).
29. Mehrotra M, Wang G, Johnson WM. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. *J Clin Microbiol*. 2000;38(3):1032-5.
30. Kobayashi IN, Wu H, Kojima K. Detection of *mecA*, *femA*, and *femB* genes in clinical strains of staphylococci using polymerase chain reaction. *Epidemiol Infect*. 1994;1(113): 259-66.
31. Nihonyanagi S, Kanoh Y, Okada K, Uozumi T, Kazuyama Y, Yamaguchi T, et al. Clinical usefulness of multiplex pcr lateral flow in MRSA detection: a novel, rapid genetic testing method. *Inflamm*. 2012;35(3):927-34.
32. Moon JS, Lee AR, Kang HM, Lee ES, Joo YS, Park YH, et al. Antibigram and coagulase diversity in staphylococcal enterotoxin-producing *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. *J Dairy Sci*. 2007;90(4):1716-24.
33. Huletsky A, Giroux R, Rossbach V, Gagnon M, Vaillancourt M, Bernier M, et al. New Real-Time PCR assay for rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from specimens containing a mixture of staphylococci. *J Clin Microbiol*. 2004;42(5):1875-84.
34. Sturenburg E. Rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from clinical samples: methods, effectiveness and cost considerations. *Ger Med Sci*. 2009; 7(1):1-19.
35. Giannechini RE, Concha C, Franklin A. Antimicrobial susceptibility of udder pathogens isolated from dairy herds in the west littoral region of Uruguay. *Acta Vet Scand*. 2002;43(1): 31-41.
36. Zafalon LF, Arcaro JRP, Nader Filho A. Investigação de perfis de resistência aos antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados na ordenha de vacas em lactação. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2008;67(2):118-25.
37. Pereira-Maia EC, Silva PP, Almeida WB. Tetraciclina e gliciliclinas: uma visão geral. *Quim Nova*. 2010;33(3):700-6.
38. Klein R C. Expressão de genes de virulência de *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina em resposta à concentrações subinibitórias de antimicrobianos [dissertação de mestrado]. Viçosa (MG): Universidade Federal de Viçosa;2010.
39. Souza MV, Reis C, Pimenta FC. Revisão sobre a aquisição gradual de resistência de *Staphylococcus aureus* aos antimicrobianos. *Rev Patol Trop*. 2005;34(1):27-36.