



Ciência Rural

ISSN: 0103-8478

cienciarural@mail.ufsm.br

Universidade Federal de Santa Maria

Brasil

de Moraes Peixoto, Renata; de Moraes Peixoto, Rodolfo; Freitas Lidani, Kárita Cláudia; Matiuzzi da Costa, Mateus

Genotipificação de isolados de *Staphylococcus epidermidis* provenientes de casos de mastite caprina

Ciência Rural, vol. 43, núm. 2, febrero, 2013, pp. 322-325

Universidade Federal de Santa Maria

Santa Maria, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33125630021>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica

Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal
Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

Genotipificação de isolados de *Staphylococcus epidermidis* provenientes de casos de mastite caprina

Genotyping *Staphylococcus epidermidis* isolated from mastitis in goats

Renata de Moraes Peixoto^{I*} Rodolfo de Moraes Peixoto^{II} Kárita Cláudia Freitas Lidani^{III}
Mateus Matiuzzi da Costa^I

- NOTA -

RESUMO

Para verificar a dinâmica da resistência aos antimicrobianos em uma propriedade rural no município de Santa Maria da Boa Vista, PE, foram avaliados 14 isolados de *Staphylococcus epidermidis* de caprinos com mastite subclínica. O perfil de resistência aos antimicrobianos foi determinado pelo teste de difusão em disco. A genotipificação foi realizada empregando o marcador REP (Repetitive Extragenic Palindromic) - PCR, utilizando o primer RW3A, enquanto os graus de similaridade e o fenograma de agrupamento foram estabelecidos por meio do coeficiente de Sorenson-Dice (SD) do algoritmo UPGMA, programa NTSYS-*pc*, o qual permitiu a identificação de 4 padrões dos 14 isolados de *S. epidermidis*, sendo oito no perfil A, quatro no perfil B, um no perfil C e um no perfil D. Para todos os grupos, a resistência à penicilina foi observada, enquanto que, para os grupos A e C, esta foi associada à lincomicina, no grupo B, esta foi associada à tetraciclina.

Palavras-chave: genotipagem, mastite, REP-PCR, *Staphylococcus epidermidis*.

ABSTRACT

To verify the dynamics of antimicrobial resistance in a property in Santa Maria da Boa Vista city – Pernambuco were evaluated 14 *Staphylococcus epidermidis* isolates from goats with subclinical mastitis. The profile of antimicrobial resistance was determined by disk diffusion test. The genotyping was performed using the marker REP (Repetitive Extragenic Palindromic) - PCR, using RW3A primer, where the degrees of similarity and clustering phenogram were established by means of the Sorenson-Dice coefficient (SD) algorithm UPGMA, program NTSYS-*pc*, which allowed the identification of 4 patterns of 14 *S. epidermidis* isolates, being eight in the profile A, four in a profile B, one in profile C and one in profile D. For

all groups to penicillin resistance was observed, while for groups A and C this was associated with lincomycin, for group B this was associated with tetracycline.

Key words: genotyping, mastitis, REP-PCR, *Staphylococcus epidermidis*.

A caprinocultura leiteira tem crescido de forma significativa na agropecuária brasileira, conquistando novos mercados para o leite de cabra e seus derivados. Todavia, na região Nordeste (NE) do Brasil, a maior parte da produção é destinada à subsistência, sendo consumida próximo aos locais de produção (NOGUEIRA et al., 2008).

Dentre as doenças que mais afetam a qualidade do leite, destaca-se a mastite, que é a enfermidade mais importante em termos econômicos para a indústria leiteira. Essa doença é ocasionada por vários micro-organismos, particularmente de origem bacteriana, dentre eles, o *S. epidermidis*, que está presente em diversos ambientes, além de fazer parte da microbiota de pessoas saudáveis, sendo responsável por infecções nosocomiais. Na glândula mamária, esse agente tem a capacidade de aumentar a contagem de células somáticas (CSS), diminuindo a produção e a qualidade do leite. Os processos moleculares envolvidos na patogenia da mastite e a especificidade dos hospedeiros são pouco compreendidos, mas presume-se que isso possa ser em decorrência, em

^ILaboratório de Microbiologia e Imunologia Animal, Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), 56300-000, Petrolina, PE, Brasil. E-mail: renatavet_peixoto@hotmail.com. *Autor para correspondência.

^{II}Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Sertão Pernambucano, Campus Floresta, Floresta, PE, Brasil.

^{III}Laboratório de Imunopatologia Molecular, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, PR, Brasil.

parte, das diferenças genéticas e variações alélicas entre as cepas (REINOSO et al., 2008). A identificação do agente etiológico da mastite é fundamental para determinar a patogenicidade e subsidiar a implantação de um programa de controle e prevenção desta enfermidade (CONTRERAS et al., 2007). Nesse sentido, objetivou-se avaliar a dinâmica da resistência de *S. epidermidis* aos antimicrobianos em uma propriedade rural no município de Santa Maria da Boa Vista, PE.

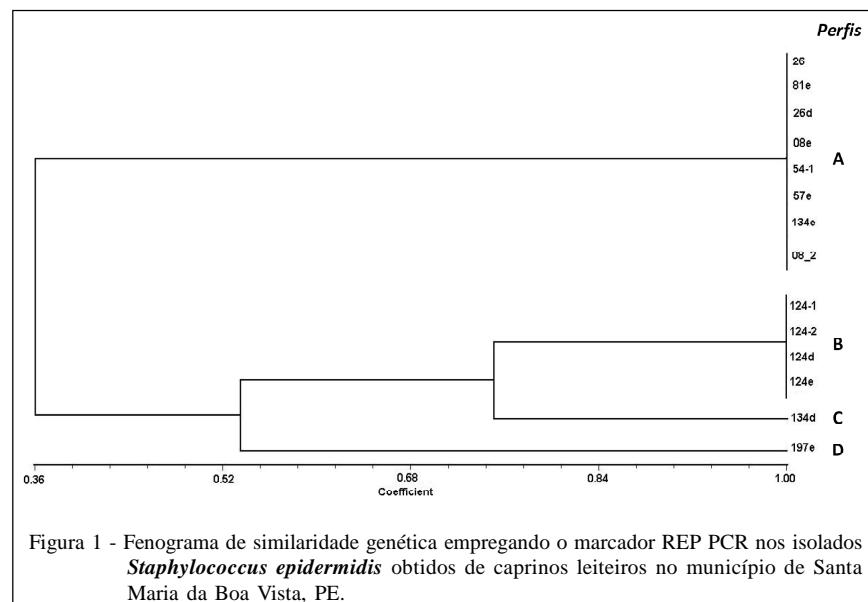
A coleta do leite e o diagnóstico da mastite foram realizados de acordo com os procedimentos sugeridos pelo National Mastitis Council (NMC, 2004). Não havia registro de antibioticoterapia prévia e os animais eram ordenhados manualmente, uma vez ao dia. Foram avaliados 14 isolados de *Staphylococcus epidermidis*, identificados por meio de suas características morfológicas, bioquímicas e tintoriais, de acordo com HOLT et al. (1994), bem como pelo sequenciamento do rDNA 16S. O perfil de resistência aos antimicrobianos foi determinado pelo teste de difusão em disco (CLSI, 2006), e as drogas testadas foram: gentamicina (5 μ g), estreptomicina (10 μ g), enrofloxacina (5 μ g), norfloxacina (10 μ g), ciprofloxacina (30 μ g), ácido nalidíxico (30 μ g), amoxacilina (30 μ g), oxacilina (1 μ g), doxiciclina (30 μ g), tetraciclina (30 μ g), eritromicina (10 μ g), lincomicina (2 μ g), rifampicina (30 μ g). Como controles para realização dos testes de sensibilidade aos antimicrobianos, foram utilizadas cepas de referência de *Staphylococcus aureus* (ATCC25923) e *Escherichia coli* (ATCC35218).

Para a caracterização molecular dos isolados, foi usado como iniciador o *primer* para REP-PCR, RW3A, com a sequência 5' TCG CTCAAAACAA CGAC ACC 3' (DEL VECCHIO et al., 1995) e como *template*, o DNA foi termo-extraído, em água Mili-Q, conforme GRECO et al.

(2008), sendo que 2mL (100ng mL⁻¹) dessa suspensão foram aplicados em 48mL do mix contendo 15pmol dos primers, 200mM dos desoxirribonucleotídeos, Tampão de *Taq* 1x e 5U de *Taq* (CENBIOT, UFRGS). Essa mistura foi levada ao termociclador e submetida a 35 ciclos constituídos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos na temperatura de anelamento de 54°C e 3 minutos a 72°C. O resultado da PCR foi verificado em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio (1,0mg mL⁻¹) e documentado através do sistema de captura de imagem Kodak DigitalScience 1D.

Com o auxílio do software NTSYS, versão 2.02 (*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*) (ROHLF, 1993), foram construídas as matrizes de similaridade genética, utilizando código binário para a presença (1) ou ausência (0) de fragmentos amplificados para cada indivíduo, com base no cálculo do coeficiente de Sorenson-Dice (SD). A fim de representar graficamente o padrão de divergência genética com a matriz de similaridade, foi construído um fenograma com o algoritmo de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Using an Arithmetic Average*).

Os resultados das análises microbiológicas do leite demonstraram uma frequência de 23,8% de animais com a mastite subclínica. Quanto aos resultados da genotipificação, a técnica de REP PCR permitiu a visualização de quatro perfis, sendo que estes apresentaram fragmentos variando de 300 a 3000pb. Dessa forma, a análise do fenograma dos 14 isolados de *S. epidermidis* permitiu a separação de quatro acessos, sendo oito no perfil A, quatro no perfil B, um no perfil C e um no perfil D. A similaridade entre os perfis genéticos dos isolados de *S. epidermidis* pode ser vista na figura 1. Os perfis com maior similaridade



foram C e D (85%). Os perfis A e B foram os que demonstraram maior distanciamento genético dos demais, sendo diversos também entre si. Em outro trabalho, utilizando a técnica de REP-PCR, REINOSO et al. (2008) trabalharam com amostras oriundas de humanos, bovinos e alimentos, sendo possível a separação de isolados de *S. aureus* de humanos e bovinos. Da mesma forma, a grande variabilidade genética de isolados de *Staphylococcus* spp. coagulase negativa também foi comprovada pela técnica de eletroforese em campo pulsado em bovinos (SAWANT et al., 2009). Na comparação dos resultados da genotipificação com o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos (Tabela 1), foi observado que o perfil D foi o único em que a multirresistência não foi observada. Para todos os grupos, a resistência à penicilina foi observada, enquanto que, para os grupos A e C, esta foi associada à lincomicina e, no grupo B, esta foi associada à tetraciclina. De acordo com SAWANT et al. (2009), em *S. epidermidis*, a resistência a determinados grupos de antimicrobianos é fortemente associada a genótipos específicos.

Drogas antimicrobianas que apresentam indicação para espécie bovina são comumente empregadas no tratamento de infecções da glândula mamária nos pequenos ruminantes. É sabido que a dose e concentração desses antimicrobianos diferem entre as espécies, além disso, os agentes patogênicos também são variados. Dessa forma, este uso indiscriminado de

antibióticos em explorações leiteiras pode levar à seleção e ao surgimento de estirpes bacterianas resistentes aos antibióticos (WALTHER et al., 2006).

A diversidade genética observada nos isolados de *S. epidermidis* pode estar em parte associada com o padrão de resistência aos antimicrobianos. Dessa maneira, para manter a boa produtividade, é importante adquirir animais de propriedades idôneas e proporcionar um bom manejo sanitário, visando a evitar a ocorrência dessa doença.

REFERÊNCIAS

- CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standards.** Wayne, Pennsylvania: CLSI, 2006. (Document CLSI M7-A7).
- CONTRERAS, A. et al. Mastitis in small ruminants. **Small Ruminant Research**, v.68, p.145-163, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0921448806002525>>. Acesso em 02 mar. 2012. doi: 10.1016/j.smallrumres.2006.09.011.
- DEL VECCHIO, V.G. et al. Molecular genotyping of methicillin – Resistant *Staphylococcus aureus* via fluorophore – Enhanced repetitive – Sequence PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, p.2141-2144, 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC228351/pdf/332141.pdf>>. Acesso em 02 mar. 2012.
- GRECO, C. et al. Assessment of biofilm-forming ability of coagulase-negative staphylococci isolated from contaminated platelet preparations in Canada. **Transfusion**, v.48, p.969-977, 2008. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1537-2995.2007.01631.x-i2/pdf>>. Acesso em 04 mar. 2012. doi: 10.1111/j.1537-2995.2007.01631.x.
- HOLT, T.G. et al. Irregular, nonsporing Gram – positive rods. In: _____. et al. (Eds). **Bergey's manual of determinative bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1994. 593p.
- NMC (NATIONAL MASTITIS COUNCIL). **Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection and determination of milk quality.** 4.ed. Verona: National Mastitis Council, 2004. 47p.
- NOGUEIRA, D.M. et al. **Passos para obtenção do leite de cabra com qualidade.** Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2008. 6p. (Comunicado Técnico, 135).
- REINOSO, E.B. et al. Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from humans, bovine subclinical mastitis and food samples in Argentina. **Microbiological Research**, v.163, p.314-322, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S094450130600067X>>. Acesso em 04 mar 2012. doi: 10.1016/j.bbbr.2011.03.031.
- ROHLF F.J. **NTSYS-PC**: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 1.80. Steauket: Applied Biostatistics, 1993. 191p.

Em que: ami: amiglicosídeos; qui: quinolonas; beta: betalactâmicos; Mac: macrolídeos; lin: lincomicina; tet: tetraciclina; rif: rifampicina.

SAWANT, A.A. et al. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative *Staphylococcus* species isolated from bovine milk. **Veterinary Microbiology**, v.134, p.73-81, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113508003660>>. Acesso em 04 mar. 2012. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.09.006.

WALTHER, B. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in veterinary medicine: a “new emerging pathogen?” **Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift**, v.119, n.5-6, p.222-232, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16729469>>. Acesso em 04 mar 2012.