

Universidade Federal de Juiz de Fora

Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados

PAULA APARECIDA AZEVEDO ALMEIDA

Desenvolvimento e avaliação de método molecular baseado em PCR multiplex para detecção de genes de resistência a antimicrobianos relevantes para o controle da mastite bovina

Juiz de Fora

2018

PAULA APARECIDA AZEVEDO ALMEIDA

Desenvolvimento e avaliação de método molecular baseado em PCR multiplex para detecção de genes de resistência a antimicrobianos relevantes para o controle da mastite bovina

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. João Batista Ribeiro

Co-orientador: Prof. Dr. Márcio Roberto Silva

Juiz de Fora

2018

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo (a) autor (a)

Almeida, Paula Aparecida Azevedo .

Desenvolvimento e avaliação de método molecular baseado em PCR multiplex para detecção de genes de resistência a antimicrobianos relevantes para o controle da mastite bovina / Paula Aparecida Azevedo Almeida. -- 2018.

82 p.

Orientador: João Batista Ribeiro

Coorientador: Márcio Roberto Silva

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, 2018.

1. Resistência a antibióticos. 2. mastite bovina. 3. PCR multiplex. 4. Streptococcus. 5. Staphylococcus. I. Ribeiro, João Batista, orient. II. Silva, Márcio Roberto, coorient. III. Título.

Desenvolvimento e avaliação de método molecular baseado em PCR multiplex para detecção de genes de resistência a antimicrobianos relevantes para o controle da mastite bovina

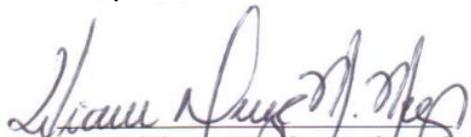
PAULA APARECIDA AZEVEDO ALMEIDA

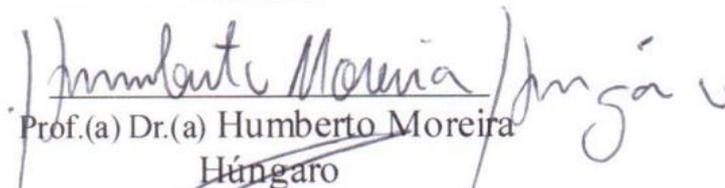
Orientador: Prof. Dr. João Batista Ribeiro

Co-orientador: Prof. Dr. Márcio Roberto Silva

Dissertação de Mestrado submetida ao Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, da Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados.

Aprovada em 30/08/2018


Dr.(a) Liliane Denize Miranda
Menezes


Prof.(a) Dr.(a) Humberto Moreira
Húngaro


Dr.(a) Wanessa Araújo Carvalho


Prof.(a) Dr.(a) Marcio Roberto Silva


Prof.(a) Dr.(a) João Batista Ribeiro

Juiz de Fora

2018

AGRADECIMENTOS

À UFJF, ao Instituto de Laticínios Cândido Tostes/EPAMIG e ao Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, pela oportunidade de realização deste trabalho.

Agradeço também à Embrapa Gado de Leite, por permitir que eu realizasse meu experimento em suas dependências, e a todos os colaboradores, que sempre me receberam com muito carinho e respeito.

Agradeço muito à meu orientador, Dr. João Batista Ribeiro, por acreditar e confiar em mim. Obrigada por todos os ensinamentos técnicos e pessoais que, com certeza, acrescentaram muito em minha vida e dos quais me lembrarei sempre. E muito obrigada por enxergar em mim um potencial que nem eu mesma sabia que tinha.

Agradeço muito a todos os meus amigos do Laboratório de Microbiologia do Leite - Embrapa por compartilharem comigo conhecimento, alegrias, vitórias... sem vocês eu nunca conseguiria chegar até aqui, tenham certeza disso! Fico muito feliz pela equipe maravilhosa que formamos, pois em uma sociedade tão egoísta e competitiva, nós nos sentimos felizes em compartilharmos conhecimento, experiências, vitórias, vidas... muito obrigada a todos! Em especial gostaria de agradecer a Bianca Hosken, minha parceira de bancada, uma grande amiga. Sem você Bianca, não faria nem metade do que fiz. E realmente formamos uma dupla fantástica! Amanda, obrigada por ser a melhor companhia dos finais de semanas! Marcos, obrigada por toda sua ajuda e paciência sempre.

Agradeço em especial aos funcionários Joel, pelas caronas diárias e a Mary, por me ajudar no uso da biblioteca.

Agradeço a todos os meus familiares, avó, tios e primos por me apoiarem e por entenderem todos os momentos em que estive ausente. Vocês são incríveis! Agradeço imensamente à minha família por sempre estarem ao meu lado em todas as minhas vitórias e derrotas.

Aos meus pais, Vicente de Paulo e Maria Aparecida, por me oferecerem um lar com muito amor, carinho, companheirismo e respeito. Tudo o que eu sou hoje eu devo a vocês dois. Muito obrigada! A minha irmã, Ester, pelo apoio e me ouvir sempre que necessário. Ao meu namorado, Fred, pelo apoio sempre que preciso. Tenho certeza que todos nós, juntos, formamos uma incrível “grande família” e eu amo todos vocês demais!

Agradeço, principalmente, a Deus, pelo dom da vida e a ciência que nos deixou para ser desbravada!

"Seu trabalho vai ocupar uma grande parte da sua vida, e a única maneira de estar verdadeiramente satisfeito é fazendo aquilo que você acredita ser um ótimo trabalho. E a única maneira de fazer um ótimo trabalho é fazendo o que você ama fazer. Se você ainda não encontrou, continue procurando."

- Steve Jobs

RESUMO

A mastite bovina é uma doença caracterizada pela inflamação da glândula mamária e é considerada a principal enfermidade de rebanhos leiteiros no mundo, sendo a que causa os maiores prejuízos econômicos ao setor lácteo. Embora inevitável, o uso de antibióticos para o controle dessa doença pode levar à emergência de linhagens resistentes e deixar resíduos no leite, sendo necessário então, que estes medicamentos sejam usados de forma racional. Com a finalidade de se desenvolver ensaios aprimorados, rápidos e específicos para estudos epidemiológicos, bem como para o diagnóstico da mastite bovina, métodos moleculares têm sido crescentemente estudados objetivando diminuir o tempo necessário para emissão de resultados. Considerando a escassez de dados sobre resistência a antibióticos em patógenos da mastite no Brasil e que resistência a antibióticos é um fenômeno genético, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver e validar um método baseado em PCR multiplex para detectar os principais genes envolvidos na resistência dos patógenos *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* aos principais antibióticos comercializados no Brasil para o tratamento de mastite bovina: tetraciclina (genes *tetO*, *tetK*, *tetM*), eritromicina (gene *ermB*), gentamicina (gene *aacA-aphD*) e penicilina (gene *blaZ*). Um método baseado em PCR multiplex foi desenvolvido para amplificação de todos os marcadores supramencionados e também do gene *mecA*, que codifica resistência à meticilina/oxacilina e é marcador de multirresistência a antibióticos. Em avaliações preliminares do limite de detecção do ensaio foi demonstrada a necessidade de pelo menos 0,4 ng/ μ L de DNA bacteriano na reação para que todos os marcadores sejam amplificados simultaneamente. As forças de coincidência (índice *Kappa*) dos resultados de amplificação utilizando os conjuntos de oligonucleotídeos propostos no presente trabalho, por PCR monoplex e multiplex, dos genes *tetO*, *ermB*, *mecA*, *blaZ*, *tetK* e *tetM* variaram de 84% a 100%, enquanto que dados referentes ao gene *aacA-aphD* demonstraram uma força de coincidência leve (11%). O método desenvolvido no presente trabalho poderá ser usado para detectar marcadores moleculares de resistência a antibióticos relevantes para estudos epidemiológicos e para controle da mastite bovina no Brasil. Estudos adicionais serão realizados visando à melhoria, adaptação e validação

do ensaio para a detecção destes marcadores em amostras de leite bovino.

Palavras-Chave: Resistência a antibióticos; mastite bovina; PCR multiplex; *Streptococcus*; *Staphylococcus*; genes de resistência.

ABSTRACT

Bovine mastitis is a disease characterized by the inflammation of the mammary gland and is considered the main disease of dairy herds in the world, causing the greatest economic damage to the dairy sector. Although unavoidable, the use of antibiotics for the control of this disease can lead to the emergence of resistant strains and leave residues in the milk, so these drugs must be used rationally. In order to develop improved, rapid and specific studies for epidemiological studies, as well as for the diagnosis of bovine mastitis, molecular methods have been increasingly studied in order to reduce the time required for the emission of results. Considering the scarcity of data on antibiotic resistance in mastitis pathogens in Brazil and that antibiotic resistance is a genetic phenomenon, the objective of the present work was to develop and validate a multiplex PCR-based method to detect the main genes involved in resistance of pathogens *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* to the main antibiotics marketed in Brazil for the treatment of bovine mastitis: tetracycline (*tetO*, *tetK*, *tetM* genes), erythromycin (*ermB* gene), gentamicin (*aacA-aphD* gene) and penicillin (*blaZ* gene). A multiplex PCR-based method was developed for amplification of all of the above-mentioned markers as well as the *mecA* gene, which encodes methicillin/oxacillin resistance and is a marker of multidrug resistance to antibiotics. Preliminary assessments of the detection limit of the assay have demonstrated the need for at least 0,4 ng/ μ l of bacterial DNA in the reaction so that all markers are amplified simultaneously. The coincidence forces (*Kappa* index) of the amplification results using the oligonucleotide sets proposed in the present work, by monoplex and multiplex PCR, of the *tetO*, *ermB*, *mecA*, *blaZ*, *tetK* and *tetM* genes ranged from 84% to 100%, while that data relating to the *aacA-aphD* gene demonstrated a light coincidence force (11%). The method developed in the present work could be used to detect molecular markers of resistance to antibiotics relevant for epidemiological studies and for the control of bovine mastitis in Brazil. Further studies will be carried out aiming at the improvement, adaptation and validation of the assay for the detection of these markers in bovine milk samples.

Keywords: Resistance to antibiotics; bovine mastitis; PCR multiplex; *Streptococcus*; *Staphylococcus*; resistance genes.

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - <i>Staphylococcus</i> e <i>Streptococcus</i> isolados de animais com mastite bovina por regiões no Brasil - Frequência relativa (%)*..... | 26 |
| Tabela 2 - Resistência natural a alguns antimicrobianos usados no tratamento da mastite bovina* | 32 |
| Tabela 3 - Linhagens bacterianas usadas para o desenvolvimento de método baseado em PCR multiplex para detecção de genes de resistência a antimicrobianos em patógenos da mastite bovina..... | 41 |
| Tabela 4 - Relação de iniciadores utilizados para a padronização da PCR multiplex..... | 45 |
| Tabela 5 - Condições de PCR para cada primer testado..... | 48 |
| Tabela 6 - Diferentes combinações de primers e mix para o teste da PCR multiplex..... | 49 |
| Tabela 7 - Mix para o PCR multiplex..... | 53 |
| Tabela 8 – Resultado da amplificação de amostras de DNA de bactérias portadoras ou não do gene <i>tetO</i> em triplicata para avaliação do método de PCR Multiplex | 57 |
| Tabela 9 – Resultado da amplificação de amostras de DNA de bactérias portadoras ou não do gene <i>ermB</i> em triplicata para avaliação do método de PCR Multiplex | 59 |
| Tabela 10 – Resultado da amplificação de amostras de DNA de bactérias portadoras ou não do gene <i>mecA</i> em triplicata para avaliação do método de PCR Multiplex | 61 |
| Tabela 11 – Resultado da amplificação de amostras de DNA de bactérias portadoras ou não do gene <i>blaZ</i> em triplicata para avaliação do método de PCR Multiplex | 62 |

| | |
|--|----|
| Tabela 12 – Resultado da amplificação de amostras de DNA de bactérias portadoras ou não do gene <i>tetK</i> em triplicata para avaliação do método de PCR Multiplex | 63 |
| Tabela 13 – Resultado da amplificação de amostras de DNA de bactérias portadoras ou não do gene <i>tetM</i> em triplicata para avaliação do método de PCR Multiplex | 65 |
| Tabela 14 – Resultado da amplificação de amostras de DNA de bactérias portadoras ou não do gene <i>aacA-aphD</i> em triplicata para avaliação do método de PCR Multiplex | 66 |
| Tabela 15 - Controle de qualidade interna para métodos de genéticos baseados em PCR (adaptado de Bladbjerg et al. (2002))..... | 67 |
| Tabela 16 - Avaliação <i>in silico</i> de primers específicos para genes de resistência a antimicrobianos utilizando a ferramenta pick primers do NCBI..... | 70 |
| Tabela 17 – Resultados dos Cálculos da Repetibilidade (Repê) e Reprodutibilidade (Reprô) em relação às amostras controle positivo (CP) e controle negativo (CN)..... | 72 |
| Tabela 18 – Resultado do Índice <i>Kappa</i> | 72 |
| Tabela 19 - Qualificação da força das coincidências pelo índice <i>Kappa de Cohen</i> | 73 |

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Mecanismos de Ação dos Antibióticos(BRASIL, 2004)..... 29
- Figura 2 – Mecanismos moleculares da manifestação da resistência (Adaptado de Levy & Marshall, 2004)..... 34
- Figura 3 - Fotos de géis de eletroforese dos produtos de amplificação obtidos pela reação de PCR realizada para a detecção dos genes alvos da PCR Multiplex. O nome do gene alvo de amplificação é indicado acima da imagem de cada gel. Os genes *aacA-aphD*, *tet O*, *tet M* e *erm B* foram amplificados do genoma de *Streptococcus agalactiae*. Os genes *bla Z*, *mec A* e *tet K* foram amplificados do genoma de *Staphylococcus* spp. M: marcador de tamanho molecular com bandas de 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000 e 3000 pb de baixo para cima; 1: branco; 2, 3 e 4: linhagem portadora do gene alvo da amplificação 52
- Figura 4 - Eletroforese (80V) em gel de agarose 1,5 % da amplificação por PCR multiplex dos genes *ermB* (359 pb), *tetM* (1862 pb), *tetO* (515 pb), *aacA-aphD* (228 pb), *tetK* (1159 pb), *mecA* (310 pb) e *blaZ* (674 pb). M: Marcador de tamanho molecular com bandas de 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000 e 3000 pb de baixo para cima; 2: Branco da reação onde não foi adicionado DNA; 3, 5-7, 11-20: *S. agalactiae*, linhagens CT700, CT613, CT638, CT734, CT01; CT02; CT04; CT10; CT36; CT40; CT50; CT51; CT54 e CT55, respectivamente. 4, 8, 9, 10: *Staphylococcus* spp., linhagens CT225, CT810, CT811, CT903, respectivamente 55
- Figura 5 - Foto representativa do gel de eletroforese dos produtos de amplificação obtidos pela reação de PCR multiplex realizada para validação da detecção do gene *tetO* (515 pb). As amostras são: M: marcador 100pb; 2: Branco; 3 - 17 Controles Positivos para gene *tetO*; 19 – 33 Controles Negativos para gene *tetO* 57

Figura 6 - Foto representativa do gel de eletroforese dos produtos de amplificação obtidos pela reação de PCR multiplex realizada para validação da detecção do gene *ermB* (359 pb). As amostras são: M: marcador 100pb; 2: Branco; 3 - 17 Controles Positivos para gene *ermB*; 19 – 33 Controles Negativos para gene *ermB* 58

Figura 7 - Foto representativa do gel de eletroforese dos produtos de amplificação obtidos pela reação de PCR multiplex realizada para validação da detecção do gene *mecA* (310 pb). As amostras são: M: marcador 100pb; 2: Branco; 3 - 17 Controles Positivos para gene *mecA*; 19 – 33 Controles Negativos para gene *mecA* 60

Figura 8 - Foto representativa do gel de eletroforese dos produtos de amplificação obtidos pela reação de PCR multiplex realizada para validação da detecção do gene *blaZ* (674 pb). As amostras são: M: marcador 100pb; 2: Branco; 3 - 17 Controles Positivos para gene *blaZ*; 19 – 33 Controles Negativos para gene *blaZ* 61

Figura 9 - Foto representativa do gel de eletroforese dos produtos de amplificação obtidos pela reação de PCR multiplex realizada para validação da detecção do gene *tetK* (1159 pb). As amostras são: M: marcador 100pb; 2: Branco; 3 - 17 Controles Positivos para gene *tetK*; 19 – 33 Controles Negativos para gene *tetK* 63

Figura 10 - Foto representativa do gel de eletroforese dos produtos de amplificação obtidos pela reação de PCR multiplex realizada para validação da detecção do gene *tetM* (1862 pb). As amostras são: M: marcador 100pb; 2: Branco; 3 - 17 Controles Positivos para gene *tetM*; 19 – 33 Controles Negativos para gene *tetM* 64

Figura 11 - Foto representativa do gel de eletroforese dos produtos de amplificação obtidos pela reação de PCR multiplex realizada para validação da detecção do gene *aacA-aphD* (228 pb). As amostras são: M: marcador 100pb; 2: Branco; 3 - 17 Controles Positivos para gene *aacA-aphD*; 19 – 33 Controles Negativos para gene *aacA-aphD* 66

Figura 12 – Foto representativa dos géis de agarose 1,5%, eletroforese dos produtos de amplificação obtidos pela reação de PCR multiplex realizada para a determinação da sensibilidade dos primers. A - Amostra 810, onde: M: marcador 100pb, 2: Branco; 3: 40 ng; 4: 20 ng; 5: 10 ng; 6: 1 ng; 7: 100 pg (0,1 ng); B - Amostra 603, onde: M: marcador 100pb, 2: Branco; 3: 40 ng; 4: 20 ng; 5: 10 ng; 6: 1 ng; 7: 100 pg (0,1 ng) 69

LISTA DE ABEVIATURAS E SIGLAS

MLS_B: Macrolídeos, Lincosamida e Estreptogramina B

PBP: Proteínas de ligação de penicilina

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

CCS: Contagem de células somáticas

SCN: *Staphylococcus* coagulase negativos

PBPs: Proteínas de ligação à penicilina

MRSA: *Staphylococcus aureus* Methicilin-resistant

OS-MRSA: *Staphylococcus aureus* oxacillin-susceptible *mecA*-positivo

PBP2a: Proteína de ligação a penicilina 2A

rRNA: RNA ribossômico

RNA_t: RNA transportador

RNA_m: RNA mensageiro

TE: Tris-HCl, EDTA

SDS: Dodecil sulfato de sódio

BHI: Brain Heart Infusion

H₂O: Água

MgCl₂: Cloreto de magnésio

NCBI: National Center for Biotechnology Information

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 20 |
| 2 OBJETIVOS | 23 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL | 23 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 23 |
| 3 REVISÃO DE LITERATURA | 24 |
| 3.1 MASTITE | 24 |
| 3.2 PRINCIPAIS AGENTES ETIOLÓGICOS DA MASTITE | 25 |
| 3.2.1 <i>Staphylococcus</i> sp. | 26 |
| 3.2.1.1 <i>Staphylococcus aureus</i> | 26 |
| 3.2.1.2 <i>Staphylococcus coagulase negativa</i> (SCN)..... | 27 |
| 3.2.2 <i>Streptococcus</i> sp. | 28 |
| 3.2.2.1 <i>Streptococcus agalactiae</i> | 28 |
| 3.3 ANTIBIÓTICOS | 28 |
| 3.3.1 - Classificação dos antibióticos | 29 |
| 3.4 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA BACTERIANA AOS ANTIMICROBIANOS | 31 |
| 3.4.1 Biologia da resistência aos antibióticos | 31 |
| 3.4.1.1 Resistência Natural | 31 |
| 3.4.1.2 - Resistência Adquirida dos microrganismos | 32 |
| 3.5 MÉTODOS MOLECULARES EMPREGADOS NA DETECÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS | 37 |
| 3.5.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR) | 37 |
| 3.5.2 PCR Multiplex | 39 |
| 4 MATERIAIS E MÉTODOS | 41 |
| 4.1 MICRORGANISMOS | 41 |
| 4.2 AVALIAÇÕES <i>IN SILICO</i> DE OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES ESPECÍFICOS PARA GENES DE RESISTÊNCIA | 44 |
| 4.3 REAÇÕES EM CADEIA DA POLIMERASE | 44 |
| 4.4 OBTENÇÃO DE DNA DE BACTÉRIAS EM CULTURA PURA | 46 |
| 4.5 PADRONIZAÇÕES DAS REAÇÕES EM CADEIA DA POLIMERASE | 47 |

| | |
|---|----|
| 4.5.1 Padronização da PCR de genes individuais com DNA obtido a partir de amostras de bactérias em cultura pura | 47 |
| 4.5.2 Padronização de PCR Multiplex com DNA obtido a partir de amostras de bactérias em cultura pura | 49 |
| 4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA | 50 |
| 4.6.1 Medidas Qualitativas | 50 |
| 4.6.1.1 Repetibilidade (Repê) | 50 |
| 4.6.1.2 Reprodutibilidade (Reprô) | 50 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 51 |
| 5.1 CONFIRMAÇÃO DE GENÓTIPOS DE RESISTÊNCIA DE LINHAGENS BACTERIANAS POR PCR MONOPLEX | 51 |
| 5.2 DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO E SEPARAÇÃO ELETROFORÉTICA DE SETE MARCADORES DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS POR PCR MULTIPLEX | 53 |
| 5.3 AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DO MÉTODO BASEADO EM PCR MULTIPLEX PARA DETECÇÃO DOS GENES <i>tetO</i> (515 pb), <i>ermB</i> (359 pb), <i>mecA</i> (310 pb), <i>blaZ</i> (674 pb), <i>tetK</i> (1159 pb), <i>tetM</i> (1862 pb) e <i>aacA-aphD</i> (228 pb) EM LINHAGENS DE <i>Streptococcus agalactiae</i> e <i>Staphylococcus</i> spp. | 55 |
| 5.3.1 - Avaliação da Sensibilidade e Especificidade do método baseado em PCR multiplex para detecção do gene <i>tetO</i> (515 pb)..... | 56 |
| 5.3.2 - Avaliação da Sensibilidade e Especificidade do método baseado em PCR multiplex para detecção do gene <i>ermB</i> (359 pb)..... | 58 |
| 5.3.3 - Avaliação da Sensibilidade e Especificidade do método baseado em PCR multiplex para detecção do gene <i>mecA</i> (310 pb)..... | 59 |
| 5.3.4 - Avaliação da Sensibilidade e Especificidade do método baseado em PCR multiplex para detecção do gene <i>blaZ</i> (674 pb)..... | 61 |
| 5.3.5 - Avaliação da Sensibilidade e Especificidade do método baseado em PCR multiplex para detecção do gene <i>tetK</i> (1159 pb)..... | 62 |
| 5.3.6 - Avaliação da Sensibilidade e Especificidade do método baseado em PCR multiplex para detecção do gene <i>tetM</i> (1862 pb)..... | 64 |
| 5.3.7 - Avaliação da Sensibilidade e Especificidade do método baseado em PCR multiplex para detecção do gene <i>aacA-aphD</i> (228 pb)..... | 65 |
| 5.4 - LIMITE DE DETECÇÃO DO ENSAIO DE PCR MULTIPLEX..... | 68 |

| | |
|---|-----------|
| 5.5 - AVALIAÇÕES <i>IN SILICO</i> DE PRIMERS ESPECÍFICOS PARA GENES DE RESISTÊNCIA..... | 70 |
| 5.6 - ANÁLISE ESTATÍSTICA | 71 |
| 5.6.1 Resultados da Repetibilidade (Repê) e Reprodutibilidade (Reprô) | 71 |
| 5.6.2 Força da Coincidência – Índice de Kappa de Cohen | 72 |
| 6 – CONCLUSÃO | 73 |
| REFERÊNCIAS | 75 |

1 INTRODUÇÃO

A mastite bovina é uma doença caracterizada pela inflamação da glândula mamária, e é considerada a principal enfermidade de rebanhos leiteiros no mundo, sendo a que causa os maiores prejuízos econômicos ao setor lácteo. No Brasil, estimam-se perdas de produção de leite entre 12 e 15% devido a essa doença, o que representa mais de três bilhões de litros de leite por ano (Seegers et al., 2003). As perdas econômicas ocasionadas pela mastite variam de acordo com o tipo de mastite, frequência, gravidade e duração da doença, assim como com o nível de produção do rebanho leiteiro. A mastite subclínica é o tipo da enfermidade que ocasiona as maiores perdas na produção leiteira, o que pode representar de 15 a 24% da renda bruta (Vissio et al., 2015). Além disso, a mastite oferece riscos à saúde pública, pela possibilidade de contaminação do leite com resíduos de antibióticos ou com microrganismos e suas toxinas.

Diversos agentes podem causar a mastite bovina, esses agentes compreendem bactérias, leveduras, fungos e algas sendo a maioria das infecções causadas por bactérias. Dentre as bactérias, uma parcela limitada dos gêneros *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* são os principais patógenos da mastite bovina, são agentes contagiosos e estão presentes na maioria dos rebanhos leiteiros brasileiros (Brito et al., 1999; Coelho et al., 2011).

De forma geral, o tratamento da mastite bovina se dá pelo uso de antimicrobiano via intramamária. A escolha do antimicrobiano vai depender do tipo de patógeno e da duração da infecção onde casos de longa duração apresentam menor taxa de cura; da vaca, pois o estágio de lactação, a idade e o histórico de ocorrência de mastite clínica afetam a probabilidade de sucesso da terapia e depende também da gravidade da infecção. O índice de cura de mastites causadas por *Staphylococcus aureus* em vacas tratadas com antimicrobianos é baixa em comparação com mastites causadas por *Streptococcus agalactiae*, as quais respondem bem ao tratamento com antibióticos da classe dos β -lactâmicos (SANTOS; TOMAZI e GONÇALVES, 2011).

A evolução das bactérias resistentes aos antimicrobianos decorre de uma variedade de fatores que engloba o uso disseminado e às vezes inadequado de antimicrobianos e, também, com a facilidade de compras de animais de outras regiões até mesmo internacionais aumenta a possibilidade das bactérias resistentes aos antimicrobianos transporem barreiras geográficas (Lowy, 2003). Os antimicrobianos utilizados em terapêutica devem ser evitados na indicação de aditivos alimentares, promotores de crescimento ou como conservantes de alimentos para animais (BRASIL, 1998).

O conhecimento dos determinantes genéticos da resistência aos antimicrobianos nesses microrganismos e suas prevalências podem direcionar o desenvolvimento de metodologias baseadas em PCR podendo ser feita diretamente da amostra colhida ou da cultura de bactéria, as quais são sensíveis, rápidas, menos laboriosas e de menor custo quando comparadas aos métodos clássicos que envolvem isolamento dos patógenos, cultivos microbianos e realização de antibiogramas. Portanto, é imprescindível o desenvolvimento de métodos confiáveis, rápidos e de baixo custo para realizar o monitoramento e avaliação da resistência em rebanhos bovinos.

Tendo em vista a associação de genes de resistência específicos a fenótipos de resistência a antimicrobianos e a necessidade de um método confiável para monitoramento da resistência aos antimicrobianos em patógenos da mastite, foi realizado o presente estudo no intuito de desenvolver e validar um método baseado em PCR multiplex para detecção simultânea de genes marcadores da resistência bacteriana aos antimicrobianos mais relevantes para o tratamento da mastite bovina no Brasil. A escolha dos genes alvos incluídos no método foi baseada em informações referentes à prevalência de genes de resistência em *S. aureus* e *S. agalactiae* isolados de mastite bovina.

Tendo em vista dados da literatura e estudos ainda não publicados realizados pela Embrapa Gado de Leite e seus parceiros, os genes de resistência a antibióticos mais prevalentes em linhagens de *S. agalactiae* isolados de mastite bovina são *ermB*, que codifica resistência à eritromicina, *tetO* e *tetM* que codificam resistência à tetraciclina e *aacA-aphD*, que codifica resistência à gentamicina.. Além dos genes supramencionados, os genes, *blaZ*,

mecA e *tetK* que codificam resistência aos antibióticos penicilina, meticilina/oxacilina e tetraciclina, respectivamente, apresentam elevadas prevalências em *S. aureus* isolados de mastite bovina.

Essa metodologia permitirá fornecer base teórica sobre métodos moleculares e trabalhos futuros padronizem a detecção dos genes de resistência, sejam detectados diretamente em amostras de leite tendo em vista que o DNA poderá ser extraído do leite.

Essa ferramenta será também de grande importância para a ampliação do conhecimento sobre a base genética e os mecanismos de transmissão da resistência antimicrobiana de bactérias causadoras de mastite no Brasil. O grande volume de dados que poderá ser gerado com o uso dessa ferramenta em curto período de tempo poderá orientar trabalhos futuros com foco no rejuvenescimento de antimicrobianos via nanotecnologia e outras ações para controle da doença em microrregiões específicas.

Esse estudo proporcionará uma ferramenta de grande importância na detecção da resistência aos antimicrobianos de patógenos da mastite, visando o controle efetivo da doença. Além disso, os resultados obtidos serão de grande importância para a ampliação do conhecimento sobre a base genética e os mecanismos de transmissão da resistência antimicrobiana de bactérias causadoras de mastite no Brasil.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e avaliar um método baseado em PCR multiplex para detectar os principais genes envolvidos na resistência dos patógenos *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* aos antimicrobianos tetraciclina, eritromicina, gentamicina e penicilina.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar diferentes combinações de primers para amplificar, por PCR multiplex, genes de resistência aos antimicrobianos tetraciclina, eritromicina, gentamicina, penicilina e metilicina/oxacilina em *S. aureus* e/ou *S. agalactiae* isolados de mastite bovina;
- Padronizar um método baseado em PCR multiplex para detecção dos principais genes de resistência aos antimicrobianos tetraciclina, eritromicina, gentamicina, metilicina/oxacilina e penicilina em *S. aureus* e *S. agalactiae*;
- Avaliar a validade e a confiabilidade do método baseado em PCR multiplex na detecção, de genes de resistência aos antimicrobianos mais prevalentes em *S. aureus* e *S. agalactiae*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 MASTITE

A mastite é uma patologia caracterizada pela inflamação da glândula mamária das vacas, tem um caráter contagioso e de fácil transmissão. Como consequências dessa patologia ocorrem alterações nas propriedades físico-químicas do leite e no parênquima glandular, podendo estar presente em qualquer glândula mamária funcional (Fonseca e Santos, 2000; Dias, 2007).

Diferencia-se a mastite quanto aos dados clínicos em: mastite clínica e mastite subclínica. A mastite clínica é reconhecida por anormalidades visíveis no úbere e até mesmo no leite como: aparecimento de edemas, aumento da temperatura, endurecimento e dor na glândula mamária, aparecimento de grumos, pus no leite. A mastite clínica acarreta perdas elevadas por descarte de leite, gastos com medicamentos, perda funcional de glândulas mamárias do animal (Fonseca e Santos, 2001). Já a mastite subclínica não apresenta sinais visíveis e passa despercebida durante a ordenha. Assim, o agente etiológico pode se disseminar pelo rebanho infectando outros animais. Pode ocorrer a diminuição da capacidade funcional da glândula mamária, gerando uma baixa capacidade na produção de leite e prejuízos à saúde do animal (Dias, 2007). O aumento da contagem de células somáticas (CCS) no leite, devido à migração de leucócitos para combater o agente da infecção, é a principal alteração, que é o alvo de métodos diagnósticos para mastite subclínica (Philpot e Nickerson, 2000).

A doença pode ser classificada de acordo com a origem de seu agente causador em mastite ambiental e mastite contagiosa. A mastite ambiental é causada por microrganismos provenientes do ambiente e a contagiosa é causada por microrganismos localizados na glândula mamária infectada. A contaminação da mastite contagiosa se dá, principalmente, durante a ordenha, seja pelas mãos do ordenhador ou por equipamentos de ordenha mecânica. Já na mastite ambiental, a contaminação é feita pelo contato direto da glândula mamária com o ambiente contaminado, principalmente onde há acúmulo de esterco, urina, barro e camas orgânicas (Philpot e Nickerson, 2000; Ladeira, 2007; Radostits et. al, 2007).

A mastite é a enfermidade de maior frequência e que ocasiona os maiores prejuízos em rebanhos leiteiros (Ruegg e Reinemann, 2002). No Brasil, estimam-se perdas de produção entre 12 e 15% devido a essa doença, o que representa mais de três bilhões de litros de leite por ano (Seegers et. al., 2003). Recentemente, pesquisadores da Universidade Nacional de Río Cuarto, na Argentina, avaliaram os custos econômicos diretos diários e as despesas de controle e prevenção associados à mastite. Concluíram que as perdas econômicas ocasionadas pela mastite variam de acordo com o tipo de mastite, frequência, gravidade e duração da doença, assim como com o nível de produção do rebanho leiteiro. A mastite subclínica é o tipo da enfermidade que ocasiona as maiores perdas na produção leiteira, o que pode representar de 15 a 24% da renda bruta (Vissio et al., 2015).

3.2 PRINCIPAIS AGENTES ETIOLÓGICOS DA MASTITE

Radostis et al. (2007) descreveram a existência de mais de 140 espécies, subespécies e sorotipos de microrganismos envolvidos nos casos de mastites, o que dá a ideia da dimensão do problema, com uma incidência anual de 10 a 12% do rebanho total.

São considerados agentes causadores de mastite: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma bovis* e agentes ambientais: *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* e *Streptococcus bovis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter aerogenes*, *Prototheca zopfii*, leveduras e fungos (Kulkarni e Kaliwal 2013, Pachauri et al. 2013, Zhou et al. 2013). Os principais grupos de agentes causadores de mastite nas diferentes regiões do Brasil são apresentados na Tabela 1 onde estão representados os dados somente de *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp.

Staphylococcus aureus e *Streptococcus agalactiae* são considerados os principais patógenos da mastite bovina, são agentes contagiosos e estão presentes na maioria dos rebanhos leiteiros brasileiros (Brito et al., 1999; Coelho et al., 2011).

Tabela 1 – *Staphylococcus* e *Streptococcus* isolados de animais com mastite bovina por regiões no Brasil - Frequência relativa (%)*.

| Regiões | <i>Staphylococcus</i> spp | | <i>Streptococcus</i> spp | Referência |
|--------------|---------------------------|-----------------------------------|--------------------------|--|
| | Gênero | SCN ¹ SCP ² | | |
| Nordeste | 32,8 | | 13,9 | Ruiz et al. 2011 |
| | 49,1 | | 2,1 | Kreweret al. 2013 |
| Sudeste | 4,3 | 25,7 | 25,7 | Ribeiro et al. 2009 |
| | 29,7 | | 17,2 | Souto et al. 2010 |
| | 8,7 | 21,3 16,6 | 21 | Langoni eTroncarelli 2011 Costa et al. 2012 |
| Sul | | 15,4 | 21,3 | Piantaet al. 2007 |
| | 30,53 | | 28,15 | Jobim et al. 2010 |
| | 14,5 | 11,1 | 36,7 | Mesquita et al. 2012 |
| | | 32,9 12,3 | 31,6 | Saab et al. 2014 |
| Centro-Oeste | 1 | 24 15,9 | 19,7 | Fontana et al. 2010 |

Obs.: Não foram encontrados artigos que abordassem a região Norte/ *Adaptada/ 1 *Staphylococcus* Coagulase Negativo/ 2 *Staphylococcus* Coagulase Positivo

3.2.1 *Staphylococcus* sp.

São microrganismos que se apresentam na forma de cocos, Gram positivo e catalase positiva. *Staphylococcus* representam os microrganismos mais frequentemente isolados de amostras de leite. Devido a isso, deve-se ter um diagnóstico correto desses agentes em amostras de leite para que se tenha a diferenciação entre *S. aureus* e outros *Staphylococcus* comumente denominados *Staphylococcus* coagulase negativo (NMC, 1999).

3.2.1.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus é considerado um patógeno contagioso da glândula mamária. Causam na maioria das vezes a mastite subclínica, que tem característica de ser de longa duração com ocorrência de casos clínicos esporádicos. Reduzem consideravelmente a quantidade e a qualidade do leite produzido. O reservatório principal de *S. aureus* são glândulas mamárias infectadas e devido a isso, são transmitidos principalmente durante o processo de ordenha (NMC, 1999).

Para estabelecer a infecção, *S. aureus* precisa penetrar na glândula através do canal do teto. Uma condição predisponente à invasão bacteriana é a colonização da superfície do teto (Forbes e Hebert, 1968). A desinfecção do teto pós ordenha (“pós dipping”) tem grande eficácia no controle da mastite por *S. aureus*. Todavia, nem toda infecção intramamária é precedida por colonização do teto mostrando que outros mecanismos, como a propulsão induzida pelo equipamento de ordenha, podem estar envolvidos (Fox e Gay, 1993).

Estabelecida a infecção intramamária, os tecidos parenquimal e ductal são afetados. *Staphylococcus* são agentes invasivos e geralmente atingem toda a glândula mamária. O menor fornecimento sanguíneo na área afetada pode diminuir a resposta imune, além de impedir a difusão de antibióticos (Fox e Gay, 1993; Erskine et al., 2003).

3.2.1.2 *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN)

Staphylococcus coagulase negativo são bactérias estafilocócicas que se diferenciam dos *S. aureus*. O nome “coagulase negativo” se refere à incapacidade destas bactérias em coagular o plasma sanguíneo em teste laboratorial. Isto as diferencia das espécies dos *Staphylococcus* coagulase positivo. As bactérias SCN frequentemente encontradas são os *Staphylococcus epidermidis*, *S. saprophyticus* e *S. haemolyticus* (Balowset al., 1991; Brasil, 2004).

As bactérias SCN são as principais causa de mastite em vacas de primeira lactação, onde os patógenos principais tenham sido controlados, o que sugere que estes agentes podem ser responsáveis por possíveis reduções na produção de leite. Se a prevalência no rebanho é alta, vacas infectadas se tornam a principal fonte de bactéria, com transmissão vaca a vaca (Sears e McCarthy, 2003). Os patógenos causadores de mastite contagiosa seriam *S. aureus*, *S. agalactiae* e *Mycoplasma bovis* e os causadores de mastite ambiental seriam *S. uberis*, *S. dysgalactiae*, *E. coli*, *Klebsiella* spp. e *Enterobacter* spp. Os patógenos causadores de mastite ambiental seriam *Staphylococcus* coagulase negativa e *Corynebacterium bovis* (Radostits et. al. 2007).

3.2.2 *Streptococcus* sp.

São microrganismos que se apresentam na forma de cocos, Gram positivo e catalase negativa (NMC, 1999). *Streptococcus* têm comportamento contagioso e/ou ambiental. As espécies de *Streptococcus* constantemente envolvidas na mastite bovina são o *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* e *S. uberis*.

Os agentes contagiosos são representados pelo *S. agalactiae* e os ambientais são: *S. dysgalactiae* e *S. uberis*. Outras espécies ambientais que são isoladas em frequência menor são: *S. acidominimus*, *S. alactolyticus*, *S. canis*, *S. equi*, *S. equinus* (antigo *S. bovis*) e *S. parauberis* (NMC, 1999).

3.2.2.1 *Streptococcus agalactiae*

É considerado um patógeno obrigatório do úbere de vacas com sobrevivência restrita fora do úbere, sendo a ordenha o principal momento de transmissão (NMC, 1999). Causam na maioria das infecções na forma subclínica crônica com alta contagem de células somáticas (CCS), casos clínicos são raros e há a eliminação de grande número de bactérias no leite (Philpot & Nickerson, 2000). São microrganismos bastante sensíveis às penicilinas e podem ser erradicados do rebanho leiteiro (NMC, 1999).

As técnicas de higiene na ordenha que compreende sanitizar os tetos, fazer a desinfecção do teto após a ordenha (“pós dipping”), previnem a propagação de *S. agalactiae*. Por tanto, a rápida identificação dos animais positivos para o tratamento, aceleram o processo de controle e erradicação de *S. agalactiae* no rebanho.

3.3 ANTIBIÓTICOS

O tratamento das doenças utilizando substâncias químicas é chamado de quimioterapia. A preocupação por busca de substâncias que pudessem suprimir o microrganismo patogênico sem causar qualquer dano à pessoa ou ao animal que fizer uso dessa substância é de grande importância. As substâncias produzidas naturalmente por bactérias e fungos que agem contra outros microrganismos são chamados de antibióticos (Tortora, Funke, e Case, 2012).

Para a eficácia do antibiótico é importante que a concentração no local de ação (onde ocorre a infecção) seja suficiente para combater a infecção. As funções dos antibióticos são distintas podendo atuar na inibição do crescimento bacteriano através da ação bacteriostática, ou na destruição de uma população bacteriana, por uma ação bactericida.

3.3.1 - Classificação dos antibióticos

A classificação dos antibióticos baseia-se no seu mecanismo de ação (Goodman & Gilman's, 2011), como apresentado na Figura 1.

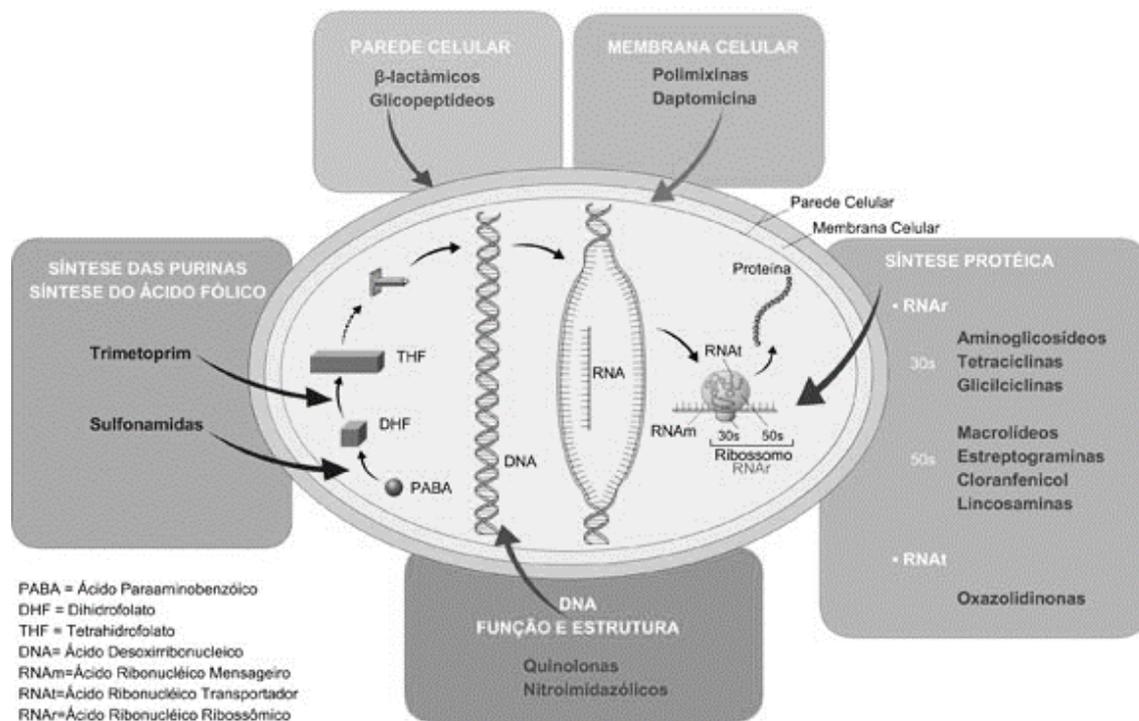


Figura 1 – Mecanismos de Ação dos Antibióticos(BRASIL, 2004).

A parede celular é um revestimento que protege a membrana celular prevenindo de rupturas. Os antibióticos que agem sobre a síntese da parede celular são seletivos, pois atuam apenas sobre a bactéria e não sobre o hospedeiro, pois a parede celular é uma estrutura bacteriana. Exemplos de antibióticos com ação ao nível da síntese do peptideoglicano são os antibióticos β-lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenems,

monobactâmicos e alguns inibidores das β -lactamases), a bacitracina e os glicopeptídeos (Goodman & Gilman's, 2011).

A membrana celular é uma estrutura lipoprotéica, situada no interior da parede celular que recobre o citoplasma de todas as células, controlando as trocas de substâncias entre a célula e o meio extracelular e mantendo a integridade celular. A cessação das funções da membrana pode causar danos à célula. Os antibióticos que agem nesse local envolvem-se no processo de respiração celular, inibindo a fosforilação oxidativa e causam desorganização da membrana celular. A atividade para esse tipo de antibiótico restringem-se às bactérias Gram negativas, incluindo *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., dentre outras. (Neu&Gootz, 1996; Goodman & Gilman's, 2011; Katzung, 2014).

Para que haja reprodução a bactéria contém, no seu cromossomo, toda a informação genética necessária à produção de enzimas que atuam na síntese de RNA. A perda de alguma função interrompe o crescimento. As classes de antibióticos que fazem parte desses mecanismos são os: aminoglicosídeos (gentamicina, tobramicina e amicacina), cloranfenicol (usado em último caso devido ao sua alta toxicidade), tetraciclina, macrolídeos (eritromicina, claritromicina e azitromicina) e clindamicina (Neu&Gootz, 1996; Goodman & Gilman's, 2011; Katzung, 2014).

Alguns antibióticos atuam inibindo a síntese dos ácidos nucleicos. Fazem parte desse grupo as quinolonas. Tem uma função terapêutica limitada e uma alta taxa de desenvolvimento de resistência bacteriana. O grupo mais atual de antibióticos são as fluoroquinolonas (ciprofloxacina, norfloxacina e ofloxacina), que têm ampla atividade antimicrobiana. Apresentam atividade na presença de *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Enterobacter* sp.. (Neu&Gootz, 1996; Goodman & Gilman's, 2011; Katzung, 2014).

O metabolismo celular descrito neste ponto é a síntese do ácido fólico, que se ligam a enzima que converte o ácido para-aminobenzóico(PABA) em ácido fólico. Incluem nesse grupo: Sulfanilamida. Tem efeito de inibir o crescimento em *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*. (Neu&Gootz, 1996; Goodman & Gilman's, 2011; Katzung, 2014).

3.4 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA BACTERIANA AOS ANTIMICROBIANOS

A mastite é uma das principais doenças que acomete os rebanhos leiteiros e os tratamentos dos animais doentes com antimicrobianos é inevitável. A resistência que os microrganismos desenvolvem é oposta a taxas de descoberta de novos antimicrobianos, ou seja, enquanto o desenvolvimento de novos antibióticos é decrescente as taxas de resistências são crescentes. A resistência pode ser uma propriedade particular das bactérias ou adquirida. Dessa maneira, a resistência adquirida pode ocorrer através da: obtenção de genes de resistência provenientes de outros microrganismos, ou transferência horizontal de genes ou pela mutação do cromossomo (Dzidic, Suskovic, & Kos, 2007).

Genes de resistência compreendidos nos plasmídeos, geralmente codificam enzimas que inativam os antibióticos ou reduzem a permeabilidade das células bacterianas. Já a resistência por mutações em genes nos cromossomos implica na modificação do alvo (Neihardt, 2004).

A transferência de material genético pode ocorrer de maneira vertical, onde os genes são passados diretamente aos seus descendentes e de maneira horizontal onde ocorre a aquisição de genes de resistência aos antimicrobianos de outros microrganismos, sendo através de transformação, transdução, conjugação e também por transposição (Todar, 2016).

3.4.1 Biologia da resistência aos antibióticos

3.4.1.1 Resistência Natural

Corresponde a uma peculiaridade de cada microrganismo e isso ocorre sem que ocorra uma exposição prévia ao antibiótico (Rice e Bonomo, 2005). A resistência bacteriana a determinados antibióticos se dá por diversos processos diferentes, na Tabela 2 estão relacionados alguns tipos de resistência natural

Tabela 2 - Resistência natural a alguns antimicrobianos usados no tratamento da mastite bovina*.

| Antibiótico | Gene de Resistência | Mecanismo de resistência |
|------------------|---------------------|---|
| Aminoglicosídeos | <i>aac, aph</i> | Enzimas de acetilação e / ou fosforilação modificam aminoglicosídeos |
| β-lactâmicos | <i>blaZ</i> | Hidrólise enzimática do núcleo β-lactâmico |
| | <i>mecA</i> | Afinidade reduzida para Proteínas de ligação à penicilina (PBP) |
| Tetraciclina | <i>tetM, tetO</i> | Produção de uma proteína que interage com o ribossomo de tal forma que a síntese da proteína não é afetada pela presença do antibiótico |
| MLS _B | <i>ermB</i> | Diminuição da permeabilidade na membrana externa aos compostos hidrofóbicos |

*(Adaptada de Michigan State University, 2011; Fluit, Visser, e Schmitz, 2001; Pérez, 2012).

3.4.1.2 - Resistência Adquirida dos microrganismos

A resistência adquirida dá-se quando há o surgimento de resistência em uma espécie bacteriana anteriormente sensível a antibiótico. Dos mecanismos de obtenção da resistência a antibióticos, a transformação é um processo pelo qual ocorre a transferência de material genético de uma célula doadora para uma célula receptora, alterando o genótipo desta última. A bactéria receptora irá adquirir no seu material genético as frações de DNA. Este mecanismo foi descoberto em *Streptococcus pneumoniae*, em 1928 por F. Griffith, tendo sido mais tarde observado também em *Staphylococcus* sp. A capacidade de englobar material genético extracelular e sofrer transformação é denominada de competência (Dzidic, Suskovic, e Kos, 2008; Neihardt, 2004; Ryan e Ray; Todar, 2012).

A transdução é um processo pelo qual segmento de DNA de uma bactéria é incorporado por um bacteriófago e então transferido para outra bactéria que porventura venha ser infectada pelo vírus carreador do fragmento de DNA. Acredita-se que a resistência adquirida em *S. aureus* à metilina deriva desse mecanismo.

A conjugação, ocorre entre células bacterianas e requer contato direto célula a célula, pela formação do pili, mediado pelo fator F (Fator fertilidade), onde plasmídeo são transferidos contendo genes de resistência a antibióticos

entre duas estirpes *Escherichia coli* (por exemplo) (Dzidic, Suskovic, e Kos, 2008; Rice e Bonomo, 2005; Todar, 2012).

Já a transposição é um processo de transferência genética, que resulta da interação entre duas bactérias diferentes, que na maioria das vezes utiliza a conjugação como via. Os fragmentos de DNA transferidos são chamados de Transposons (*Tn*). Estes contêm genes ou grupos de genes que se incorporam num plasmídeo ou cromossomo através de recombinação. Por exemplo, um transposon que contenha um gene que codifica a enzima β -lactamase responsável pela resistência à ampicilina (*TnA*) pode passar de um plasmídeo para outro, do plasmídeo para o cromossomo e do cromossomo para o plasmídeo disseminando assim a resistência ao antibiótico ampicilina (Neihardt, 2004; Veiga, 1984; Pádua, 2009). O transposon conjugativo ocorre entre *Streptococcus* e outras Gram positivas é de importante na disseminação de resistência a antibióticos dentro do gênero, um bom exemplo é o transposon Tn916, que contém o gene *tetM* que confere resistência à tetraciclina (Neihardt, 2004).

Os mecanismos moleculares da manifestação da resistência estão ilustrados na Figura 2.

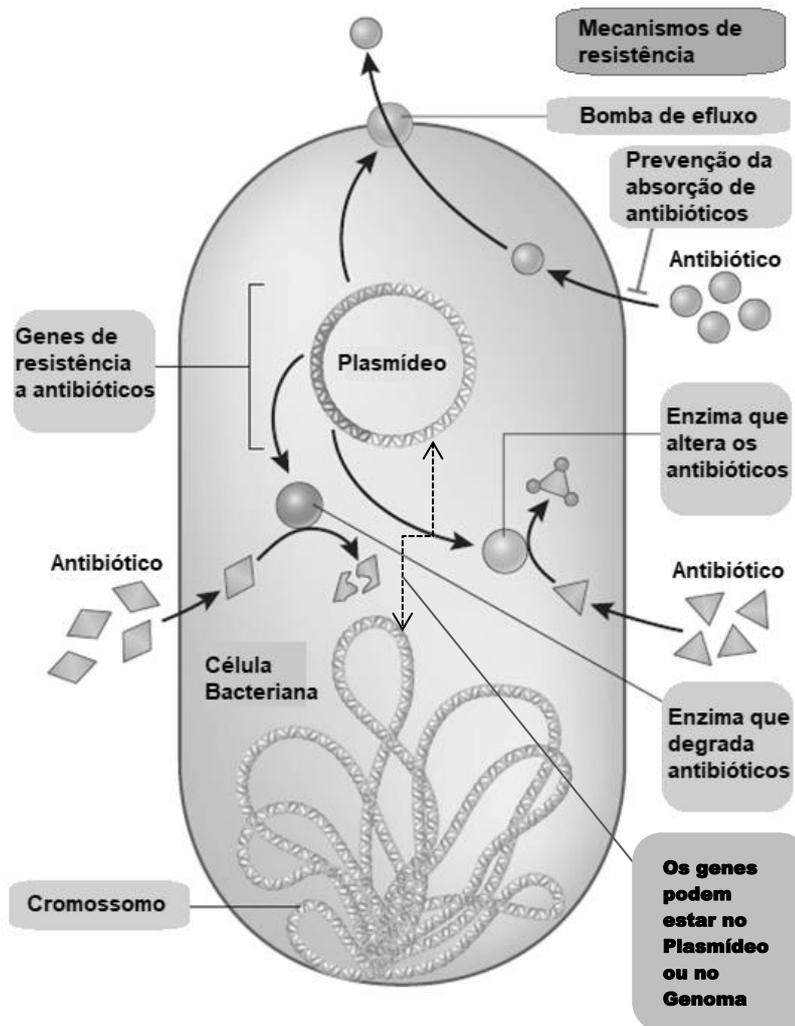


Figura 2 – Mecanismos moleculares da manifestação da resistência (Adaptado de Levy & Marshall, 2004).

Alteração da permeabilidade:

A alteração da permeabilidade da membrana celular é imprescindível para a eficiência de alguns antibióticos. Qualquer alteração na função ou diminuição das porinas resultará na resistência da bactéria ao antibiótico (Declour, 2009). Os aminoglicosídeos, tetraciclina, fosfomicina e quinolonas são exemplos dessa resistência (Neu e Gootz, 1996).

Alteração do sítio de ação do antibiótico

A alteração do sítio de ação do antibiótico caracteriza-se pela redução ou pela falta de compatibilidade do antibiótico ao local de ligação. Isto ocorre devido a alterações na estrutura das moléculas alvo da ligação do antibiótico

(Rice e Bonomo, 2005). Esse mecanismo de resistência é observado para diversos antibióticos como, β -lactâmicos e glicopeptídeos (Dzidic, Suskovic, e Kos, 2007).

A resistência aos β -lactâmicos origina-se de mutações na proteína de ligação à penicilina (PBPs), as β -lactamases hidrolisam a ligação amida do anel beta-lactâmico, modificando o local onde os antimicrobianos β -lactâmicos ligam-se às PBPs bacterianas impedindo que exerçam seu efeito antibacteriano que se dá pela diminuição da ligação do antibiótico ao local de ação (Fluit, Visser, eSchmitz, 2001).

Linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* sp. negativas no teste da coagulase adquiriram o gene *mecA*, que os torna resistentes aos β -lactâmicos. *S. aureus* resistentes à meticilina e oxacilina são conhecidos como MRSA (methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*) que provém da presença do gene *mecA* (Hawkey, 1998).

A resistência a macrolídeos, lincosamida e estreptogramina B (MLS_B) ocorre na subunidade 50S do ribossomo, bloqueando a síntese protéica. A resistência se dá pela alteração no 23S rRNA. O gene *erm* está envolvido nesse tipo de resistência agindo na síntese destas metilases (Dzidic, Suskovic, eKos, 2008).

A resistência aos aminoglicosídeos ocorrem através de mutações no gene 16S rRNA. Aminoglicosídeos modificados nos grupos amino por enzimas aminoglicosídeos (AAC) ou em grupos hidroxilo por enzimas aminoglicosídeos (ANT) ou fosfotransferases aminoglicosídeos (APH) perdem sua capacidade de ligação ao ribossomo (Dzidic, Suskovic, eKos, 2007).

As resistências às tetraciclinas ocorrem nas proteínas que atuam ligando no ribossomo e alterando a sua conformação, protegendo o ribossomo da ação destes antibióticos. Esta forma de resistência é mais comum do que a verificada pela presença de proteínas de efluxo (Fluit, Visser, eSchmitz, 2001).

Bomba de Efluxo:

A bomba de efluxo que consiste no bombeamento ativo de antimicrobianos do meio intracelular para o extracelular, isto é, o seu efluxo ativo, produz resistência bacteriana a determinados antimicrobianos, está localizada na membrana interna, de uma proteína periplasmática adaptadora e de um canal na membrana externa eficiente para expelir substâncias tóxicas, entre elas antimicrobianos. Contempla todas as classes de antibióticos, sendo mais eficaz com macrolídeos, tetraciclina e fluoroquinolonas (Dzidic, Suskovic, eKos, 2008). O gene responsável pela resistência as tetraciclina que codificam atividade de bombas de efluxo está associado ao *tet* (Fluit, Visser, eSchmitz, 2001).

Mecanismo enzimático:

No mecanismo enzimático, o microrganismo irá produzir enzimas que vão degradar ou inativar o antibiótico. Existem três mecanismos enzimáticos: hidrólise, transferência de um grupo ou processo redox. Na hidrólise de antibióticos ocorre a quebra da ligação dos grupos ésteres e amidas, fazendo com que sejam susceptíveis às hidrolases que são enzimas que promovem a cisão de um material orgânico com a utilização de água. A quebra da ligação destes grupos é feita na presença destas enzimas, que podem ser excretadas pelas bactérias, agindo na inativação do antibiótico antes que atinja o seu alvo (Dzidic, Suskovic, &Kos, 2008).

A resistência aos β -lactâmicos ocorre quando as β -lactamases quebram o anel β -lactâmico das penicilinas e cefalosporinas. A quebra do anel β -lactâmico pode dever-se à ação do nucleófilo.

Na transferência de grupos o mecanismo de inativação dos antibióticos ocorrem pelas enzimas transferases. Os antibióticos mais acometidos são os aminoglicosídeos, anfenicóis, fosfomicina, estreptograminas e macrolídeos, nos quais há a aquisição dos diversos grupos químicos, como o adenilil, fosforil ou acetil (Dzidic, Suskovic, &Kos, 2008; Rice &Bonomo, 2005).

As enzimas são classificadas como aminoglicosídeos acetiltransferases (AAC), aminoglicosídeos adenililtransferases (ANT) e aminoglicosídeos

fosfotransferases (APH). Os aminoglicosídeos são modificados no grupo amino pela enzima AAC e no grupo hidroxila pelas enzimas ANT e APH, perdendo a capacidade de ligação ao ribossomo (Mingeot-Leclercq, Glupczynski & Tulkiens, 1999; Fluit, Visser, & Schmitz, 2001).

3.5 MÉTODOS MOLECULARES EMPREGADOS NA DETECÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS.

Com a finalidade de se obter técnicas aprimoradas, rápidas e específicas para o diagnóstico e estudos epidemiológicos da mastite bovina, métodos moleculares têm sido crescentemente utilizados em diagnósticos microbiológicos objetivando minimizar o tempo gasto em métodos convencionais (Zschöck et al., 2005).

Na literatura encontram-se trabalhos que utilizaram a reação em cadeia da polimerase (PCR) e suas variantes para detecção, identificação e estudos epidemiológicos de diferentes microrganismos, dentre elas a PCR Multiplex (Pérez-Roth et al., 2001; Phuektes et al., 2001).

3.5.1 - Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica em que pequenos segmentos de DNA podem ser rapidamente amplificados, ou seja, são multiplicados exponencialmente utilizando o DNA genômico como molde para a síntese de fragmentos específicos do genoma do organismo através de sucessivos ciclos.

A técnica de PCR baseia-se na capacidade de desnaturação e renaturação das moléculas de DNA, em que ligações de hidrogênio são desfeitas quando as moléculas são submetidas a temperaturas superiores a 90°C, fazendo com que as duas fitas fiquem desnaturadas na solução e quando a temperatura é abaixada as fitas se reanalam reconstituindo a molécula na forma de uma fita dupla e na complementaridade entre as bases dos nucleotídeos que constituem as fitas do DNA. A enzima *Taq* DNA-polimerase proveniente da bactéria termofílica *Thermus aquaticus* é utilizada nessa técnica. (Alberts et al., 1997; Eisenstein, 1990).

Para a reação são necessários os seguintes reagentes: Tampão para PCR; $MgCl_2$ que é um co-fator e para a enzima; DNA-polimerase, Desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dATP, dTTP, dCTP e dGTP); e pelo menos um par de primers, que são oligonucleotídeos com sequências de nucleotídeos de até 30 pb usados como iniciadores da síntese de DNA. É usado também o DNA molde. Os oligonucleotídeos são sintetizados com base no princípio da complementariedade de bases do DNA e no conhecimento da sequência de nucleotídeos específica da região do genoma a ser amplificada (Alberts et al., 1997; Eisenstein, 1990).

Após adicionar os reagentes juntamente com o DNA molde em tubos tipo eppendorf, são colocados no termociclador, que é um equipamento usado em Biologia Molecular que permite realizar os ciclos de temperaturas necessários para uma reação em cadeia da polimerização ou amplificação de DNA. Nessa fase, são feitos ciclos de 3 etapas fundamentais que são: Desnaturação, onde ocorre o aquecimento para que haja a separação das fitas de DNA; Anelamento, onde a temperatura é abaixada fazendo com que haja o resfriamento e na presença dos dois pares de primers para que a hibridização dos mesmos com as sequências de DNA complementares para que possa ocorrer e Extensão, onde a incubação da mistura anelada com a enzima polimerase (Eisenstein, 1990).

O resultado é obter cópias em quantidade suficiente que permite detectar e analisar a sequência de estudo, devido ao número de ciclos programados que pode variar de 20 a 40 repetições cíclicas (Abath et al., 2002; Alberts et al., 1997).

A vantagem desse método é poder identificar patógenos em poucas horas, em vez dos métodos de culturas convencionais. Também podemos citar como vantagem do método de PCR para diagnóstico: maior rapidez, maior seletividade, especificidade, maior poder de tipificação e discriminação, bom limite de detecção, potencial para automação e a possibilidade de trabalhar com bactérias inviáveis (Martinez et al., 2001 e Phuerktes et al., 2001). A desvantagem de usar PCR como um método de identificação pode ser a

sensibilidade excessiva, como contaminantes menores em amostras podem levar a erros de diagnóstico (Phuerktes et al., 2001).

3.5.2 PCR Multiplex

Na técnica de PCR Multiplex, são amplificados dois ou mais segmentos diferentes de DNA em uma única reação, utilizando-se para isso mais de um par de primers. Essa técnica permite a amplificação simultânea de mais de um segmento do genoma em uma única reação. Usualmente, são incluídos na reação multiplex, iniciadores para controle interno da reação de amplificação. A inclusão do controle interno de amplificação visa à eliminação dos falso-negativos.

A principal vantagem da PCR multiplex em relação à PCR convencional é a sua relação custo-eficácia. Reduz a quantidade de reagentes tais como *Taq* DNA polimerase, e dos insumos para preparação do gel de agarose, visto que será necessário apenas um gel para diagnóstico. Além disso, requer menos preparação, tempo de análise do que os sistemas em que vários tubos são utilizados na PCR simples.

No presente estudo, os princípios da PCR multiplex foram empregados no desenvolvimento de um método para a detecção de pelo menos sete genes de resistência aos antimicrobianos em uma única reação. Os determinantes de resistência a serem incluídos foram selecionados com base em considerações clínicas e técnicas, escolhemos os genes mais frequentemente associados à resistência dos principais patógenos da mastite que são *Streptococcus agalactiae* e *Staphylococcus aureus*.

Martini et al. (2017), em seu estudo de resistência aos antimicrobianos penicilina e tetraciclina, encontrou que dos 90 isolados testados, 88 (97,7%) foram positivos para o gene *blaZ*, 76 (84,4%) foram positivos pra o gene *tetK* e 69 (76,7%) possuíam concomitantemente os genes *blaZ* e *tetK*. Guimarães et al. (2017) em seu estudo *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) em um rebanho leiteiro o gene *mecA* foi detectado em 29 (48,3%) dos 60 isolados testados; a detecção dessa grande porcentagem de casos de mastite causada por MRSA e OS-MRSA é de grande preocupação para a saúde dos

animais, porque os β -lactâmicos ainda são os antimicrobianos mais importantes usados no tratamento da mastite.

Em um estudo prévio de nossa equipe em que foram avaliadas 74 linhagens de *Streptococcus agalactiae*, isoladas de rebanhos bovinos na região da Zona da Mata Mineira, foi verificada a presença do gene *ermB* em 39 (52,7%) linhagens que apresentaram resistência à eritromicina no teste fenotípico realizado por antibiograma e 35 (47,3%) foram consideradas susceptíveis. 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*.

Não foram encontrados relatos na literatura que descrevendo a presença do gene *aacA-aphD* em estirpes de *S. agalactiae* resistentes ao antibiótico gentamicina, sendo descrito em *S. aureus*. Porém, em um estudo feito por nossa equipe no Laboratório de Microbiologia do Leite da EMBRAPA Gado de Leite, o gene *aacA-aphD* foi detectado em 42,86% (n=21) das 49 linhagens de *S. agalactiae* isoladas de amostras de leite bovino.

Ribeiro et al. (2013) genotiparam amostras previamente isoladas de *S. agalactiae* a partir de amostras compostas de leite coletadas assepticamente em 11 rebanhos da Zona da Mata de Minas Gerais. Os isolados apresentaram maior resistência fenotípica à tetraciclina e à eritromicina. O gene *ermB* foi encontrado em 95% dos isolados fenotipicamente resistentes à eritromicina (n = 40). Entre os isolados fenotipicamente resistentes à tetraciclina, os genes *tetM* e *tetO* foram encontrados em 23 (51%) e 29 (64%), respectivamente, e 06 isolados (13%) apresentaram o genótipo *tetM / tetO*. Além disso, genes de resistência também foram detectados em alguns isolados suscetíveis, mostrando que o genótipo de resistência não se correlaciona com precisão à resistência fenotípica.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia do Leite da Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora, MG.

4.1 MICRORGANISMOS

Para a padronização das PCRs e desenvolvimento do método baseado em PCR multiplex foram utilizadas as estirpes de *S. agalactiae*, *S. aureus* e *S. epidermidis* isoladas a partir de leite bovino previamente isoladas de leite bovino (Tabela 3) e caracterizadas quanto ao fenótipo de resistência aos antimicrobianos e mantidas a -80°C (estoque) e a -20°C (solução de trabalho com 20 ng de DNA por microlitro) na Coleção de Microrganismos de Interesse da Agroindústria e Pecuária (CMIAP) da Embrapa, sediada na Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora, MG.

Tabela 3 - Linhagens bacterianas usadas para o desenvolvimento de método baseado em PCR multiplex para detecção de genes de resistência a antimicrobianos em patógenos da mastite bovina.

| N° CNPq ¹ | N° CMIAP | Espécie | Data coleta |
|----------------------|----------|---------------------------------|-------------|
| 136 | 10027 | <i>Staphylococcus aureus</i> | 14/12/2009 |
| 229 | 10028 | <i>Staphylococcus aureus</i> | 17/06/2010 |
| 237 | 10029 | <i>Staphylococcus aureus</i> | 17/06/2010 |
| 274 | 10030 | <i>Staphylococcus aureus</i> | 22/06/2010 |
| 301 | 10031 | <i>Staphylococcus aureus</i> | 23/06/2010 |
| 436 | 10032 | <i>Staphylococcus aureus</i> | 19/11/2010 |
| 452 | 10033 | <i>Staphylococcus aureus</i> | 18/11/2010 |
| 658 | 10023 | <i>Staphylococcus aureus</i> | 24/05/2011 |
| 680 | 10024 | <i>Staphylococcus aureus</i> | 15/06/2011 |
| 690 | 10025 | <i>Staphylococcus aureus</i> | 15/06/2011 |
| 696 | 10026 | <i>Staphylococcus aureus</i> | 15/06/2011 |
| 713 | 10034 | <i>Staphylococcus aureus</i> | 15/06/2011 |
| 741 | 10035 | <i>Staphylococcus aureus</i> | 16/06/2011 |
| 796 | 10037 | <i>Staphylococcus aureus</i> | 05/08/2011 |
| 4 | - | <i>Streptococcus agalactiae</i> | 02/12/2009 |
| 10 | 8961 | <i>Streptococcus agalactiae</i> | 02/12/2009 |
| 36 | 8962 | <i>Streptococcus agalactiae</i> | 03/02/2009 |
| 40 | - | <i>Streptococcus agalactiae</i> | 03/02/2009 |
| 50 | 10054 | <i>Streptococcus agalactiae</i> | 08/12/2009 |
| 56 | - | <i>Streptococcus agalactiae</i> | 08/12/2009 |
| 73 | - | <i>Streptococcus agalactiae</i> | 08/12/2009 |
| 75 | 8963 | <i>Streptococcus agalactiae</i> | 08/12/2009 |
| 82 | - | <i>Streptococcus agalactiae</i> | 08/12/2009 |
| 84 | - | <i>Streptococcus agalactiae</i> | 08/12/2009 |
| 88 | 8964 | <i>Streptococcus agalactiae</i> | 08/12/2009 |
| 138 | 10063 | <i>Streptococcus agalactiae</i> | 14/12/2009 |
| 168 | - | <i>Streptococcus agalactiae</i> | 09/02/2010 |
| 539 | 10018 | <i>Streptococcus agalactiae</i> | 17/05/2011 |
| 541 | 8965 | <i>Streptococcus agalactiae</i> | 17/05/2011 |
| 544 | 10019 | <i>Streptococcus agalactiae</i> | 17/05/2011 |
| 546 | 10020 | <i>Streptococcus agalactiae</i> | 17/05/2011 |
| 552 | 10021 | <i>Streptococcus agalactiae</i> | 17/05/2011 |
| 603 | - | <i>Streptococcus agalactiae</i> | 24/05/2011 |

| | | | |
|-------|-------|---------------------------------|--------------------------------------|
| 604 | 10022 | <i>Streptococcus agalactiae</i> | 24/05/2011 |
| 610 | - | <i>Streptococcus agalactiae</i> | 24/05/2011 |
| 611 | - | <i>Streptococcus agalactiae</i> | 24/05/2011 |
| 613 | 8966 | <i>Streptococcus agalactiae</i> | 24/11/2011 |
| 615 | - | <i>Streptococcus agalactiae</i> | 24/05/2011 |
| 630 | - | <i>Streptococcus agalactiae</i> | 24/05/2011 |
| 638 | 8967 | <i>Streptococcus agalactiae</i> | 24/05/2011 |
| 640 | - | <i>Streptococcus agalactiae</i> | 24/05/2011 |
| 700 | 8968 | <i>Streptococcus agalactiae</i> | 14/07/2011 |
| 734 | - | <i>Streptococcus agalactiae</i> | 15/06/2011 |
| 810 | 8545 | <i>S. epidermidis</i> | 01/09/2011 |
| 811 | 8546 | <i>S. epidermidis</i> | 01/09/2011 |
| 812 | 8547 | <i>S. epidermidis</i> | 01/09/2011 |
| 831 | 8566 | <i>S. epidermidis</i> | 01/09/2011 |
| 891 | 8601 | <i>S. epidermidis</i> | 20/01/2010 |
| 896 | 8605 | <i>S. epidermidis</i> | 28/07/2010 |
| 915 | 8621 | <i>S. epidermidis</i> | 25/05/2011 |
| 225 | 8534 | <i>S. epidermidis</i> | 17/06/2010 |
| 903 | 8612 | <i>S. epidermidis</i> | 18/01/2011 |
| MRSAU | 8969 | <i>S. aureus</i> | Inserida na coleção em 31/03/2017 |
| MRSA1 | 8970 | <i>S. aureus</i> | Inserida na coleção em 31/03/2017 |

¹ Número referente ao isolamento feito no leite bovino

4.2 AVALIAÇÕES *IN SILICO* DE OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES ESPECÍFICOS PARA GENES DE RESISTÊNCIA

Foram realizados ensaios “*in silico*” visando à detecção dos genes *mecA*, *blaZ*, *aacA-aphD*, *ermB*, *tetK*, *tetM* e *tetO* em sequências de genes ou de genomas depositados no NCBI utilizando as sequências de diferentes pares de primers descritas na literatura. Para tal, os pares de primers específicos para cada gene alvo foram testados utilizando a ferramenta “pick primers” sendo verificado após cada busca, o poder de cada par de primer na detecção dos respectivos fragmentos de genes de resistência em sequências de genes ou genomas de patógenos da mastite disponível.

4.3 REAÇÕES EM CADEIA DA POLIMERASE

As reações em cadeia da polimerase em monoplex foram realizadas conforme descrito na Tabela 4. As sequências de nucleotídeos dos iniciadores utilizados nas padronizações das reações de PCR são apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 – Relação de iniciadores utilizados para a padronização da PCR multiplex

| Gene de Resistência | Nome do oligonucleotídeo | Sequência 5' =>3' | Amplicon (pb) | Referência |
|---------------------|--|---|---------------|--|
| <i>mecA</i> | <i>mecA</i> 310F <i>mecA</i> 310R | TGGCTATCGTGTCAACAATCG CTGGAACCTTGTTGAGCAGAG | 310 pb | Vannuffel et al., 1995 |
| <i>mecA</i> | <i>mecA</i> -174F <i>mecA</i> -174R | AACAGGTGAATTATTAGCACTTGTAAG ATTGCTGTTAATATTTTTGAGTTGAA | 174 pb | Martineau et al., 2000 |
| <i>blaZ</i> | <i>blaZ</i> 1 <i>blaZ</i> 2 | AAGAGATTTGCCTATGCTTC GCTTGACCACTTTTATCAGC | 517 pb | Vesterholm-Nielsen et al., 1999 |
| <i>blaZ</i> | <i>blaZ</i> -173F <i>blaZ</i> -173R | ACTTCAACACCTGCTGCTTTC TGACCACTTTTATCAGCAACC | 173 pb | Martineau et al., 2000 |
| <i>blaZ</i> | <i>blaZ</i> -486F <i>blaZ</i> -486R | GTTGCGAACTCTTTGAATAGG GGAGAATAAGCAACTATATCATC | 674 pb | Oslen JE, Christensen H and Aarestrup FM, 2006 |
| <i>aacA-aphD</i> | <i>aacA-aphD</i> 1 <i>aacA-aphD</i> 2 | TAATCCAAGAGCAATAAGGGC GCCACACTATCATAACCACTA | 228 pb | Strommenger et al. 2003 |
| <i>ermB</i> | <i>ermB</i> 1 <i>ermB</i> 2 | CCGTTTACGAAATTGGAACAGGTAAAGGGC GAATCGAGACTTGAGTGTGC | 359 pb | Lina et al., 1999 |
| <i>ermB</i> | <i>ermB</i> -142F <i>ermB</i> -142R | CTATCTGATTGTTGAAGAAGGATT GTTTACTCTTGGTTTAGGATGAAA | 142 pb | Martineau et al., 2000 |
| <i>ermB</i> | <i>ermB</i> -639F <i>ermB</i> -639R | GAAAAGGTAAGTGAACCAAATA AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC | 639 pb | Martineau et al., 2000 |
| <i>tetK</i> | <i>tetK</i> 1 <i>tetK</i> 2 | TATTTTGGCTTTGTATTCTTTTCAT GCTATACCTGTTCCCTCTGATAA | 1159 pb | Trzcinski et al. 2000 |
| <i>tetM</i> | <i>tetM</i> 1 <i>tetM</i> 2 | AGTTTTAGCTCATGTTGATG TCCGACTATTTAGACGACGG | 1862 pb | Trzcinski et al. 2000 |
| <i>tetM</i> | <i>tetM</i> -406F <i>tetM</i> -406R | GTGGACAAAGGTACAACGAG CGGTAAAGTTCGTACACAC | 406 pb | Ng et al.; 2001 |
| <i>tetO</i> | <i>tetO</i> 1 <i>tetO</i> 2 | AGCGTCAAAGGGGAATCACTATCC CGGCGGGGTTGGCAAATA | 1723 pb | Trzcinski et al. 2000 |
| <i>tetO</i> | <i>tetO</i> -515F <i>tetO</i> -515R | AACTTAGGCATTCTGGCTCAC TCCCACTGTTCCATATCGTCA | 515 pb | Ng et al.; 2001 |

4.4 OBTENÇÃO DE DNA DE BACTÉRIAS EM CULTURA PURA

A extração e purificação de amostras de DNA genômico bacteriano foram realizadas a partir de culturas puras dos patógenos supramencionados para uso nas reações de PCR para amplificação de genes individuais ou em multiplex. Para obtenção de DNA de linhagens de *Streptococcus agalactiae* e *Staphylococcus* spp. foram empregadas metodologias descritas na literatura com pequenas adaptações (Oliveira et al., 2002).

Para *Staphylococcus* spp. as amostras foram enriquecidas em caldo de BHI. Uma alíquota de 2 mL de caldo foi centrifugada em 12000 g por 2 min e o sedimento bacteriano ressuspenso em 1 mL de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM) contendo 20 mL de lisozima 50 mg / ml e 10 mL de Lisostafina (1mg/mL) incubada em temperatura ambiente por 30 min, após foram adicionados 50 µL de SDS 10% e 20 µL de proteinase K (20 mg/mL) e incubada a 55°C por 30 min. Em seguida adicionou-se 300 µL de Acetato de Potássio 5M e 1 mL de Isopropanol 100%, centrifugou-se a 14000 g por 5 min, descartou o sobrenadante e lavou o pellet com 300 µL de Etanol 70% e deixou secar. Após a secagem, ressuspendeu-se o pellet em 600 µL de água Milli-Q e adicionou-se 20 µL de RNase e incubou em temperatura ambiente por 1 hora. Um volume de 600 µL de fenol-clorofórmio (1:1), pH 8.0, foi adicionado e misturado por 5-10 min antes centrifugando a 14000 g por 10 min, após o que a fase líquida foi mais uma vez extraída com fenol-clorofórmio. Adicionou-se 200 µL de Acetato de Amônio 7M e 600 µL de Etanol 100% e incubou-se as amostras a -20°C por 30 min e após foi centrifugada a 14000 g por 10 min. Descartou-se o sobrenadante e o pellet foi lavado com 50 µL de Etanol 70% gelado e o pellet foi colocado pra secar. Por fim, o pellet de DNA foi ressuspenso em 200 µL de água Milli-Q, quantificado em Nanodrop e estocado a -20C.

Já para *Streptococcus agalactiae*, as amostras foram enriquecidas em caldo de BHI. Uma alíquota de 2 mL de caldo foi centrifugada em 12000 rpm por 2,5 min e o sedimento bacteriano ressuspenso em 100 µL de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM) contendo 25 mL de lisozima 50 mg / ml incubada a 37°C por 30 min, após foram adicionados 20 µL de SDS 20% e 20 µL de

proteínase K (20 mg/mL) e incubada a 56°C por 50 min. Em seguida adicionou-se 500 µL de TE e ferveu-se a 100°C em Banho-Maria por 15 min, centrifugou-se a 14000 rpm por 5 min, coletou o sobrenadante em novo tubo e adicionou-se 10 µL de RNase e incubou em temperatura ambiente por 1 hora. Um volume de 600 µL de fenol-clorofórmio (1:1), pH 8.0, foi adicionado e misturado por 5-10 min antes centrifugando a 14000 rpm por 5 min, após o que a fase líquida foi mais uma vez extraída apenas com clorofórmio. Adicionou-se 200 µL de Acetato de Amônio 7M e 600 µL de Etanol 100% e incubou-se as amostras a -20°C por 2 horas e após foi centrifugada a 14000 rpm por 5 min. Descartou-se o sobrenadante e o pellet foi lavado com 50 µL de Etanol 70% gelado e o pellet foi colocado pra secar. Por fim, o pellet de DNA foi ressuspensão em 150 µL de água Milli-Q, quantificado em Nanodrop e estocado a -20C.

4.5 PADRONIZAÇÕES DAS REAÇÕES EM CADEIA DA POLIMERASE

4.5.1 Padronização da PCR de genes individuais com DNA obtido a partir de amostras de bactérias em cultura pura

Inicialmente diferentes pares de primers relatados na literatura foram avaliados para a amplificação individual dos genes *mecA*, *blaZ*, *aacA-aphD*, *ermB*, *tetK*, *tetM* e *tetO*, utilizando o DNA genômico de bactérias conhecidamente portadoras destes genes. A padronização das PCRs foram realizada pela técnica de PCR convencional, constituído por uma solução final de 25µL contendo os reagentes nas concentrações especificadas na Tabela 5.

Tabela 5 – Condições de PCR para cada primer testado

| Gene de Resistência | Amplicon (pb) | PCR (µL) | Ciclos (e condições) | Referência |
|---------------------|---------------|---|---|--|
| <i>mecA</i> | 310 pb | H ₂ O 14,325; Tampão 5,0; MgCl ₂ 2,5; dNTPs 0,5; <i>mecA</i> 1 0,625; <i>mecA</i> 2 0,625; TaqDNApol 0,3; DNA 1,0 | 92°C 3' (92°C 1', 56°C 1', 72°C 1')x30 72°C 3' | Vannuffel et al., 1995 |
| <i>mecA</i> | 174 pb | H ₂ O 4,5; Tampão 4,0; MgCl ₂ 2,0; dNTPs 0,4; <i>mecA</i> 1 4,0; <i>mecA</i> 2 4,0; TaqDNApol 0,1; DNA 1,0 | 96°C 3' (95°C 1', 55°C 30", 55°C 1')x30 55°C 1" | Martineau et al., 2000 |
| <i>blaZ</i> | 517 pb | H ₂ O 16,2; Tampão 2,5; MgCl ₂ 1,5; dNTPs 1,0; <i>blaZ</i> 1 1,25; <i>blaZ</i> 2 1,25; TaqDNApol 0,3; DNA 1,0 | 95°C 5' (95°C 30", 52°C 30", 72°C 1')x35 72°C 5' | Vesterholm-Nielsen et al., 1999 |
| <i>blaZ</i> | 173 pb | H ₂ O 4,5; Tampão 4,0; MgCl ₂ 2,0; dNTPs 0,4; <i>blaZ</i> 1 4,0; <i>blaZ</i> 2 4,0; TaqDNApol 0,1; DNA 1,0 | 96°C 3' (95°C 1", 55°C 30", 55°C 1")x30 55°C 1" | Martineau et al., 2000 |
| <i>blaZ</i> | 674 pb | H ₂ O 14,325; Tampão 5,0; MgCl ₂ 2,5; dNTPs 0,625; <i>blaZ</i> 1 0,625; <i>blaZ</i> 2 0,625; TaqDNApol 0,3; DNA 1,0 | 94°C 1' (94°C 1', 54°C 1', 72°C 1')x35 72°C 10' | Oslen JE, Christensen H and Aarestrup FM, 2006 |
| <i>aacA-aphD</i> | 228 pb | H ₂ O 13,7; Tampão 5,0; MgCl ₂ 2,0; dNTPs 0,5; <i>aacAaphD</i> 1 1,25; <i>aacAaphD</i> 2 1,25; TaqDNApol 0,3; DNA 1,0 | 94°C 3' (94°C 30", 55°C 30", 72°C 30")x35 72°C 4' | Strommenger et al. 2003 |
| <i>ermB</i> | 359 pb | H ₂ O 17,2; Tampão 2,5; MgCl ₂ 1,5; dNTPs 0,5; <i>ermB</i> 1 1,0; <i>ermB</i> 2 1,0; TaqDNApol 0,3; DNA 1,0 | 94°C 5' (94°C 30", 55°C 30", 72°C 1'50")x35 72°C 7' | Lina et al., 1999 |
| <i>ermB</i> | 142 pb | H ₂ O 4,5; Tampão 4,0; MgCl ₂ 2,0; dNTPs 0,4; <i>ermB</i> 1 4,0; <i>ermB</i> 2 4,0; TaqDNApol 0,1; DNA 1,0 | 96°C 3' (95°C 1', 55°C 30", 55°C 1')x30 55°C 1' | Martineau et al., 2000 |
| <i>ermB</i> | 639 pb | H ₂ O 2,1; Tampão 6,0; MgCl ₂ 2,4; dNTPs 0,2; <i>ermB</i> 1 3,0; <i>ermB</i> 2 3,0; TaqDNApol 0,3; DNA 3,0 | 95°C 5' (95°C 45", 55°C 45", 72°C 45")x35 72°C 10' | Martineau et al., 2000 |
| <i>tetK</i> | 1159 pb | H ₂ O 15,7; Tampão 2,5; MgCl ₂ 1,5; dNTPs 1,5; <i>tetK</i> 1 1,25; <i>tetK</i> 2 1,25; TaqDNApol 0,3; DNA 1,0 | 95°C 5' (95°C 30", 50°C 30", 72°C 1'30")x35 72°C 5' | Trzcinski et al., 2000 |
| <i>tetM</i> | 1862 pb | H ₂ O 16,2; Tampão 2,5; MgCl ₂ 1,5; dNTPs 1,0; <i>tetM</i> 1 1,25; <i>tetM</i> 2 1,25; TaqDNApol 0,3; DNA 1,0 | 94°C 5' (94°C 30", 55°C 30", 72°C 1'50")x35 72°C 7' | Trzcinski et al., 2000 |
| <i>tetM</i> | 406 pb | H ₂ O 30,9; Tampão 10,0; MgCl ₂ 3,1; dNTPs 1,5; <i>tetM</i> 1 1,5; <i>tetM</i> 2 1,5; TaqDNApol 0,5; DNA 1,0 | 94°C 5' (94°C 1', 55°C 1', 72°C 1')x35 72°C 5' | Ng et al., 2001 |
| <i>tetO</i> | 1723 pb | H ₂ O 16,2; Tampão 2,5; MgCl ₂ 1,5; dNTPs 1,0; <i>tetO</i> 1 1,25; <i>tetO</i> 2 1,25; TaqDNApol 0,3; DNA 1,0 | 94°C 5' (94°C 30", 55°C 30", 72°C 1'50")x35 72°C 7' | Trzcinski et al., 2000 |
| <i>tetO</i> | 515 pb | H ₂ O 26,2; Tampão 10,0; MgCl ₂ 7,8; dNTPs 1,5; <i>tetO</i> 1 1,5; <i>tetO</i> 2 1,5; TaqDNApol 0,5; DNA 1,0 | 94°C 5' (94°C 1', 55°C 1', 72°C 1')x35 72°C 5' | Ng et al., 2001 |

4.5.2 Padronização de PCR Multiplex com DNA obtido a partir de amostras de bactérias em cultura pura

Foram testadas diferentes combinações de pares de primers (Tabela 6) e condições de termociclagem para avaliar a compatibilidade dos mesmos na amplificação simultânea dos genes alvos. Como moldes foram utilizados DNA genômico de linhagens de *S. agalactiae* e *Staphylococcus* spp. conhecidamente portadoras dos genes alvos da PCR multiplex na concentração de 20 ng/μL/genoma. A separação eletroforética foi realizada em gel de agarose a 1,5%, 80V. Coloração com brometo de etídio e fotodocumentação.

Tabela 6 - Diferentes combinações de primers e mix para o teste da PCR multiplex

| Reagente | Concentração Final | | | Amplicon (pb) | | | | |
|-------------------|--------------------|----------|----------|---------------|------|------|------|------|
| | Mix 1 | Mix 2 | Mix 3 | Opç1 | Opç2 | Opç3 | Opç4 | Opç5 |
| H ₂ O | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Tampão 5X | 1X | 0,75X | 1X | - | - | - | - | - |
| MgCl ₂ | 1,5mM | 2,25mM | 7mM | - | - | - | - | - |
| dNTP | 0,88mM | 0,8mM | 0,8mM | - | - | - | - | - |
| tetO 1 | 0,1μM | 0,1μM | 0,1μM | 1723 | 515 | 515 | 1723 | 515 |
| tetO 2 | 0,1μM | 0,1μM | 0,1μM | 406 | 1862 | 406 | 406 | 1862 |
| tetM 1 | 0,1μM | 0,1μM | 0,1μM | 639 | 142 | 359 | 639 | 359 |
| tetM2 | 0,1μM | 0,1μM | 0,1μM | 1159 | 1159 | 1159 | 1159 | 1159 |
| ermB 1 | 0,08μM | 0,08μM | 0,08μM | 228 | 228 | 228 | 228 | 228 |
| ermB 2 | 0,08μM | 0,08μM | 0,08μM | 162 | 310 | 174 | 310 | 310 |
| tetK 1 | 0,1μM | 0,1μM | 0,1μM | 517 | 674 | 674 | 173 | 674 |
| tetK 2 | 0,1μM | 0,1μM | 0,1μM | - | - | - | - | - |
| aacA-aphD 1 | 0,1μM | 0,1μM | 0,1μM | - | - | - | - | - |
| aacA-aphD 2 | 0,1μM | 0,1μM | 0,1μM | - | - | - | - | - |
| mecA 1 | 0,05μM | 0,05μM | 0,05μM | - | - | - | - | - |
| mecA 2 | 0,05μM | 0,05μM | 0,05μM | - | - | - | - | - |
| blaZ 1 | 0,1μM | 0,05μM | 0,05μM | - | - | - | - | - |
| blaZ 2 | 0,1μM | 0,05μM | 0,05μM | - | - | - | - | - |
| Taq DNA pol | 0,06U/μL | 0,06U/μL | 0,06U/μL | - | - | - | - | - |
| DNA* | 1,6ng/μL | 0,8ng/μL | 0,8ng/μL | - | - | - | - | - |

* DNA genômico de bactérias conhecidamente portadoras dos genes em análise.

Foram testadas duas condições de termociclagem, a primeira com um ciclo inicial de 95°C por 5 minutos, seguidos por 35 ciclos a 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por um minuto e 30 segundos. E por

fim um ciclo final de extensão de 72°C por 7 minutos. E a segunda com um ciclo inicial de 94°C por 5 minutos, seguidos por 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por um minuto e 50 segundos. E por fim um ciclo final de extensão de 72°C por 7 minutos.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A PCR convencional (cPCR) tem como resultado final a amplificação em gel de agarose, ou seja, a presença ou ausência de bandas esperadas. Este tipo de técnica permite uma análise qualitativa de dados.

4.6.1 Medidas Qualitativas

Utiliza-se, neste estudo, a definição de repetibilidade e reprodutibilidade para resultados qualitativos, BRASIL, 2015.

4.6.1.1 Repetibilidade (Repê)

A repetibilidade é uma medida de concordância ou conformidade entre resultados de uma mesma rodada sob um mesmo método. É a probabilidade, em porcentagem, de se encontrar o mesmo resultado nas n amostras analisadas, sob uma mesma rodada levando em conta um mesmo operador, mesmo equipamento e tratamento dado às amostras, em curto intervalo de tempo, em condições de repetibilidade. Desse modo, nas respostas qualitativas, quanto maior o valor da porcentagem, maior o indício de que o método é confiável. A repê de um método é obtida pela média das repês de cada rodada.

4.6.1.2 Reprodutibilidade (Reprô)

A reprodutibilidade é uma medida de correspondência entre os resultados da mesma amostra, em diferentes rodadas. É a probabilidade, em porcentagem, de encontrar o mesmo resultado (-, -) ou (+, +) em duas amostras idênticas, analisadas em diferentes rodadas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho foi desenvolvido e avaliado um método baseado em PCR multiplex para detectar sete genes de resistência a antibióticos clinicamente relevantes para o controle dos principais patógenos da mastite bovina no Brasil: *tetO*, *tetM* e *tetK*, que codificam resistência à tetraciclina, *ermB*, que codifica resistência à eritromicina, *aacA-aphD*, que codifica resistência a aminoglicosídeos, *blaZ*, que confere resistência à penicilina G e ampicilina, e *mecA*, que confere resistência à meticilina e é marcador de multirresistência. Estudos anteriores sobre esses patógenos isolados a partir de amostras de leite provenientes de rebanhos de diversas regiões do país evidenciaram a ocorrência de elevadas taxas de resistência de *Staphylococcus aureus* à ampicilina, penicilina G e tetraciclina e de *Streptococcus agalactiae* aos antimicrobianos tetraciclina, eritromicina e gentamicina. Subsequentemente, foi demonstrado que os fenótipos de resistência destas bactérias estavam associados aos determinantes genéticos supramencionados (Ribeiro et al., 2015; Martini et al., 2017).

5.1 CONFIRMAÇÃO DE GENÓTIPOS DE RESISTÊNCIA DE LINHAGENS BACTERIANAS POR PCR MONOPLEX

As linhagens usadas no presente trabalho consideradas, em estudos prévios, portadoras e desprovidas dos marcadores de resistência supramencionados foram reavaliadas por PCR monoplex sendo confirmados todos genótipos previamente ao uso. Esta confirmação é necessária para evitar o uso de linhagens incorretamente genotipadas ou que tenham perdido os marcadores de resistência devido a algum evento genético específico durante as passagens do microrganismo em cultivos laboratoriais. A transposição e a mutação são exemplos de eventos genéticos raros, mas que podem ocasionar a eliminação de alvos de amplificação do genoma de linhagens bacterianas. Essa confirmação da identidade genética garante também que não houve troca ou perda de linhagens por contaminação. Deste modo, somente as linhagens confirmadamente portadoras dos marcadores moleculares alvos do presente trabalho foram empregadas no desenvolvimento do método. Para avaliação da confiabilidade do método foram utilizadas linhagens confirmadamente

portadoras e confirmadamente desprovidas dos marcadores, tendo todos os genótipos sido também conferidos no presente trabalho.

Além da confirmação da presença dos genes nos respectivos genomas bacterianos, a realização dos ensaios em monoplex permitiu confirmar o funcionamento e ou fazer as adaptações necessárias para a utilização dos conjuntos de oligonucleotídeos em reações de amplificação dos genes *mecA*, *blaZ*, *aacA-aphD*, *ermB*, *tetK*, *tetM* e *tetO* individualmente. Para todos os primers testados foi observada a amplificação específica de fragmentos de DNA nos tamanhos esperados conforme descrito na literatura correspondentes a fragmentos dos genes de resistência analisados. Imagens representativas dos resultados dessas amplificações são apresentadas na Figura 3 (dados não apresentados).

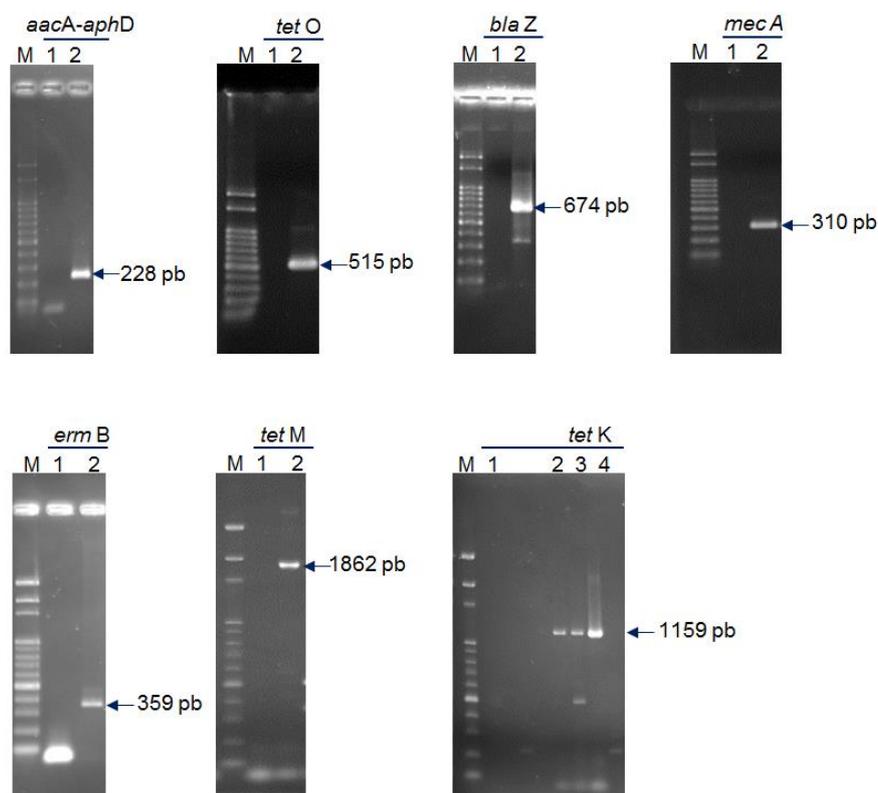


Figura 3 - Fotos de géis de eletroforese dos produtos de amplificação obtidos pela reação de PCR realizada para a detecção dos genes alvos da PCR Multiplex. O nome do gene alvo de amplificação é indicado acima da imagem de cada gel. Os genes *aacA-aphD*, *tet O*, *tet M* e *erm B* foram amplificados do genoma de *Streptococcus agalactiae*. Os genes *bla Z*, *mec A* e *tet K* foram amplificados do genoma de *Staphylococcus* spp. M: marcador de tamanho molecular com bandas de 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000 e 3000 pb de baixo para cima; 1: branco; 2, 3 e 4: linhagem portadora do gene alvo da amplificação.

5.2 DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO E SEPARAÇÃO ELETROFORÉTICA DE SETE MARCADORES DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS POR PCR MULTIPLEX.

Com base em informações da literatura, as condições de reações foram testadas após a elaboração de combinações de diferentes pares de oligonucleotídeos visando à amplificação simultânea dos genes alvos em uma única reação. Para tal, também foram considerados os tamanhos dos amplicons e a perspectiva de separação dos mesmos por eletroforese em gel de agarose (Tabela 6). Após vários testes *in vitro*, as condições de reação e os conjuntos de primers que possibilitam a amplificação simultânea dos sete fragmentos de DNA correspondentes aos genes alvos foram determinadas (Tabela 7). A Figura 4 mostra a imagem do gel de agarose em que bandas de DNA específicas contendo fragmentos de DNA de tamanhos esperados para cada um dos genes alvos podem ser visualizadas separadamente.

Tabela 7 - Mix para o PCR multiplex

| PCR MULTIPLEX | | |
|-------------------|-----------|---------|
| MIX | []f | 1X (µL) |
| Água | - | 6,8 |
| Tampão | 1 X | 5,0 |
| MgCl ₂ | 7 mM | 7,0 |
| dNTP | 0,8 mM | 2,0 |
| aacA-aphD1 | 0,1 µM | 0,25 |
| aacA-aphD2 | 0,1 µM | 0,25 |
| ermB1 | 0,08 µM | 0,20 |
| ermB2 | 0,08 µM | 0,20 |
| tetO-515F | 0,1 µM | 0,25 |
| tetO-515R | 0,1 µM | 0,25 |
| tetM1 | 0,1 µM | 0,25 |
| tetM2 | 0,1 µM | 0,25 |
| tetK1 | 0,1 µM | 0,25 |
| tetK2 | 0,1 µM | 0,25 |
| mecA 310F | 0,05 µM | 0,125 |
| mecA 310R | 0,05 µM | 0,125 |
| blaZ-486F | 0,05 µM | 0,125 |
| blaZ-486R | 0,05 µM | 0,125 |
| Taq DNA pol. | 0,06 U/µL | 0,3 |
| DNA* | 0,8 ng/µL | 1,0 |
| TOTAL (µL) | - | 25 |

*DNA genômico de bactérias conhecidamente portadoras dos genes em análise

A melhor condição de termociclagem foi um ciclo inicial de 94°C por 5 minutos, seguidos por 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por um minuto e 50 segundos. E por fim um ciclo final de extensão de 72°C por 7 minutos.

Os amplificadores para os genes *ermB*, *tetM*, *tetO*, *tetK*, *aacA-aphD*, *mecA* e *blaZ* foram facilmente separados por eletroforese em gel de agarose 1,5%. Embora existam outros métodos para realizar a etapa de separação dos fragmentos de DNA amplificados, tais como, a eletroforese convencional em gel de poliacrilamida ou a eletroforese capilar, a eletroforese em gel de agarose apresenta a vantagem de ser mais simples e de estar disponível em mais laboratórios o que poderá facilitar a adoção do método após sua validação. Entretanto, a avaliação de métodos de separação alternativos à eletroforese em gel de agarose é também desejável, principalmente tendo em mente a possibilidade de inserção de novos marcadores na reação.

Considerando o alto nível de associação entre genótipo e fenótipo da resistência bacteriana aos antimicrobianos, o desenvolvimento de métodos que possibilitem a detecção em massa de genes de resistência de modo rápido e de menor custo pode ser considerado muito útil, pois, a presença de gene de resistência a antimicrobianos mesmo que livre no ambiente já representa um sinal de alerta, visto que o mesmo pode ser incorporado por um patógeno e conferir-lhe o fenótipo de resistência.

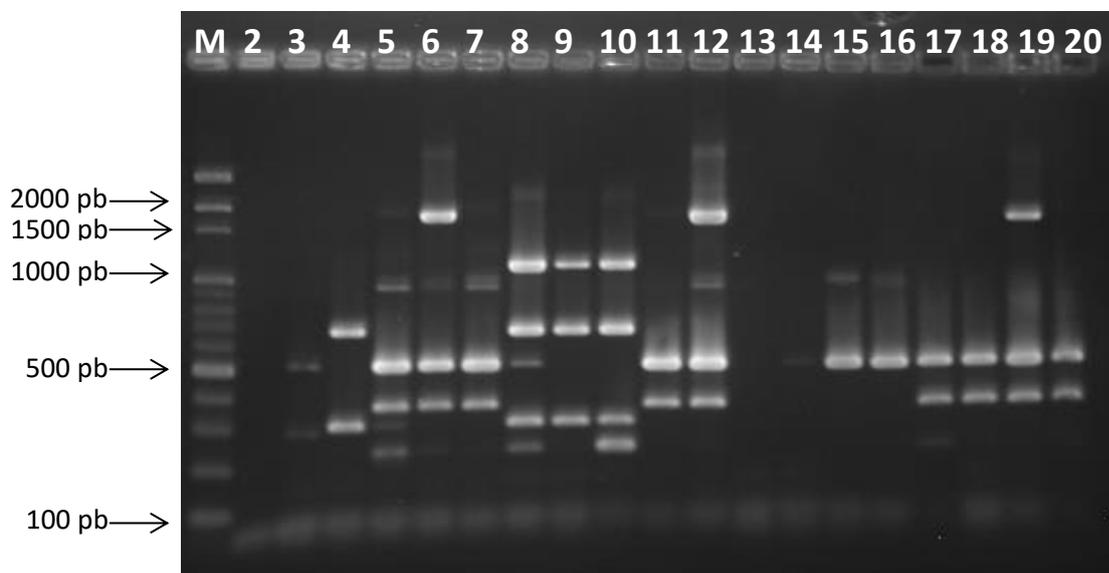


Figura 4 - Eletroforese (80V) em gel de agarose 1,5 % da amplificação por PCR multiplex dos genes *ermB* (359 pb), *tetM* (1862 pb), *tetO* (515 pb), *aacA-aphD* (228 pb), *tetK* (1159 pb), *mecA* (310 pb) e *blaZ* (674 pb). M: Marcador de tamanho molecular com bandas de 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000 e 3000 pb de baixo para cima; 2: Branco da reação onde não foi adicionado DNA; 3, 5-7, 11-20: *S. agalactiae*, linhagens CT700, CT613, CT638, CT734, CT01; CT02; CT04; CT10; CT36; CT40; CT50; CT51; CT54 e CT55, respectivamente. 4, 8, 9, 10: *Staphylococcus* spp., linhagens CT225, CT810, CT811, CT903, respectivamente.

5.3 AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DO MÉTODO BASEADO EM PCR MULTIPLEX PARA DETECÇÃO DOS GENES *tetO* (515 pb), *ermB* (359 pb), *mecA* (310 pb), *blaZ* (674 pb), *tetK* (1159 pb), *tetM* (1862 pb) e *aacA-aphD* (228 pb) EM LINHAGENS DE *Streptococcus agalactiae* e *Staphylococcus* spp.

A Sensibilidade (S) é a probabilidade de um teste apresentar resultado positivo em uma amostra sabidamente positiva, ou seja, é a habilidade da PCR detectar o gene alvo na avaliação de uma amostra de DNA contendo o gene. Já a Especificidade (E) é probabilidade de um teste apresentar resultado negativo em uma amostra sabidamente negativa. Ou seja, no caso específico do presente trabalho, é a habilidade da PCR não amplificar regiões do genoma

que não correspondam de fato ao gene alvo (BRASIL, 2015). Testes de sensibilidade são importantes, pois dará a certeza que aquela amostra de DNA contém genes de resistência a antibióticos, isto implica diretamente no diagnóstico da amostra pesquisada e possível escolha de antibiótico no tratamento da mastite. Deste modo, estes testes são importantes quando do desenvolvimento de novos métodos porque mostram o nível de confiabilidade do método em comparação a métodos já existentes. A seguir são apresentados os resultados referentes à avaliação do funcionamento método de PCR multiplex ora desenvolvido quanto à sensibilidade e especificidade por marcador.

5.3.1 Avaliação da Sensibilidade e Especificidade do método baseado em PCR multiplex para detecção do gene *tetO* (515 pb)

As 15 amostras de DNA bacteriano contendo o gene *tetO* apresentaram resultado de amplificação positiva quando os oligonucleotídeos tetO-515F e tetO-515R foram empregados conforme mostra a imagem do gel na Figura 5 (canaletas 02 a 17). O par de primers utilizado mostrou-se eficaz uma vez que todas as amostras conhecidamente portadoras do gene *tetO* (positivas) apresentaram o produto de amplificação correspondente ao fragmento de DNA de 515 pb, evidenciando que esses oligonucleotídeos funcionam eficientemente quando usados em conjunto com os demais oligonucleotídeos incluídos no método de PCR multiplex sob avaliação. Por outro lado, todas as amostras de DNA bacteriano desprovidas do marcador *tetO* não apresentaram amplificação do fragmento de DNA 515 pb como demonstrado nas canaletas 19 a 33 (Figura 5). Esse resultado foi verificado em três repetições da análise do gene *tetO* (Tabela 8). Essa elevada correspondência de resultados dos métodos de PCR monoplex e PCR mutliplex para esse marcador indica que método ora desenvolvido é altamente específico e sensível quanto à detecção do mesmo.

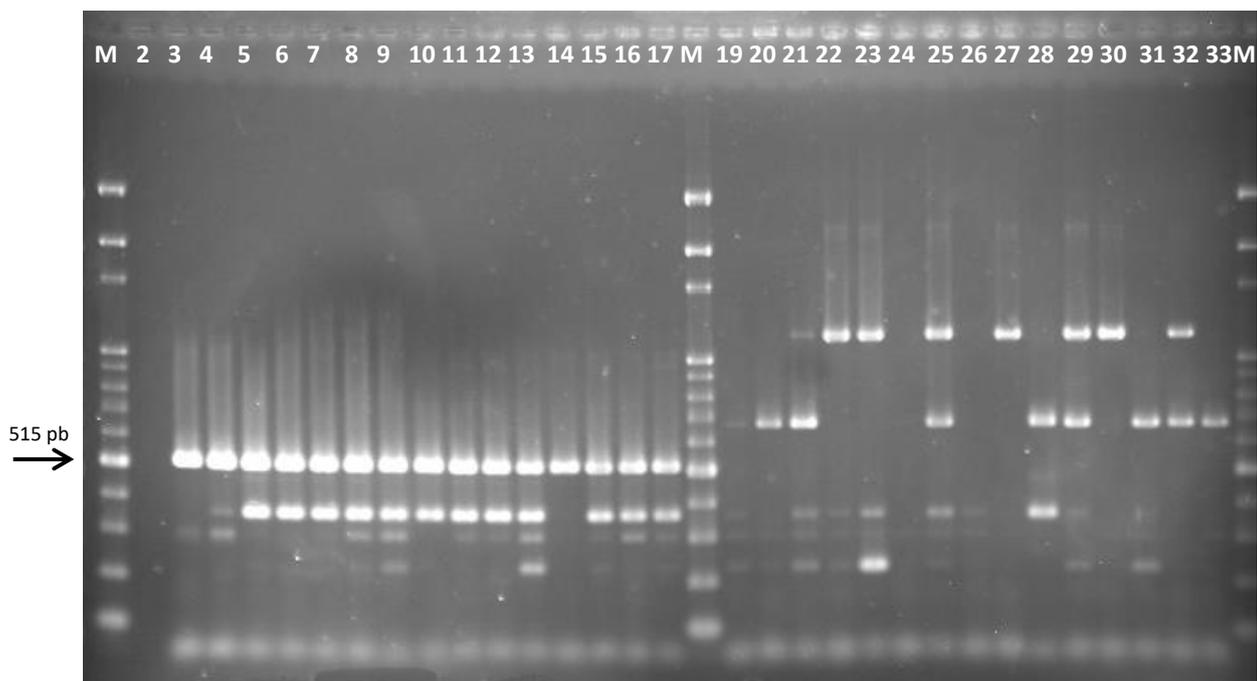


Figura 5 - Foto representativa do gel de eletroforese dos produtos de amplificação obtidos pela reação de PCR multiplex realizada para validação da detecção do gene *tetO* (515 pb). As amostras são: M: marcador 100pb; 2: Branco; 3 - 17 Controles Positivos para gene *tetO*; 19 – 33 Controles Negativos para gene *tetO*.

Tabela 8 – Resultado da amplificação de amostras de DNA de bactérias portadoras ou não do gene *tetO* em triplicata para avaliação do método de PCR Multiplex

| Canaleta no gel | Amostra | Data da PCR | | | Canaleta no gel | Amostra | Data da PCR | | |
|-----------------|---------|-------------|-------|-------|-----------------|---------|-------------|-------|-------|
| | | 18/04 | 30/05 | 05/06 | | | 18/04 | 30/05 | 05/06 |
| 3 | 36 | + | + | + | 19 | 15 | - | - | - |
| 4 | 40 | + | + | + | 20 | 34 | - | - | - |
| 5 | 54 | + | + | + | 21 | 35 | - | - | - |
| 6 | 73 | + | + | + | 22 | 45 | - | - | - |
| 7 | 82 | + | + | + | 23 | 89 | - | - | - |
| 8 | 84 | + | + | + | 24 | 95 | - | - | - |
| 9 | 168 | + | + | + | 25 | 136 | - | - | - |
| 10 | 603 | + | + | + | 26 | 229 | - | - | - |
| 11 | 610 | + | + | + | 27 | 237 | - | - | - |
| 12 | 611 | + | + | + | 28 | 274 | - | - | - |
| 13 | 613 | + | + | + | 29 | 301 | - | - | - |
| 14 | 614 | + | + | + | 30 | 318 | - | - | - |
| 15 | 615 | + | + | + | 31 | 436 | - | - | - |
| 16 | 621 | + | + | + | 32 | 440 | - | - | - |
| 17 | 628 | + | + | + | 33 | 444 | - | - | - |

5.3.2 Avaliação da Sensibilidade e Especificidade do método baseado em PCR multiplex para detecção do gene *ermB* (359 pb)

As 15 amostras de DNA bacteriano contendo o gene apresentaram resultado de amplificação positiva quando os oligonucleotídeos *ermB1* e *ermB2* foram empregados conforme mostra a imagem do gel na Figura 6 (canaletas 02 a 17). O par de primers utilizado mostrou-se eficaz uma vez que todas as amostras conhecidamente portadoras do gene *ermB* (positivas) apresentaram o produto de amplificação correspondente ao fragmento de DNA de 359 pb, evidenciando que esses oligonucleotídeos funcionam eficientemente quando usados em conjunto com os demais oligonucleotídeos incluídos no método de PCR multiplex sob avaliação. Entretanto, quanto à especificidade, algumas amostras de DNA bacteriano desprovidas do marcador *ermB* apresentaram amplificação do fragmento de DNA 359 pb como demonstrado na Figura 6 (canaletas 23, 28, 30, 32, 33). Nas três repetições da análise do gene *ermB* (Tabela 9) os resultados foram divergentes o que pode ser explicado possivelmente devido a contaminação das amostras. Deste modo, estes ensaios deverão ser repetidos após aquisição de novos oligonucleotídeos.

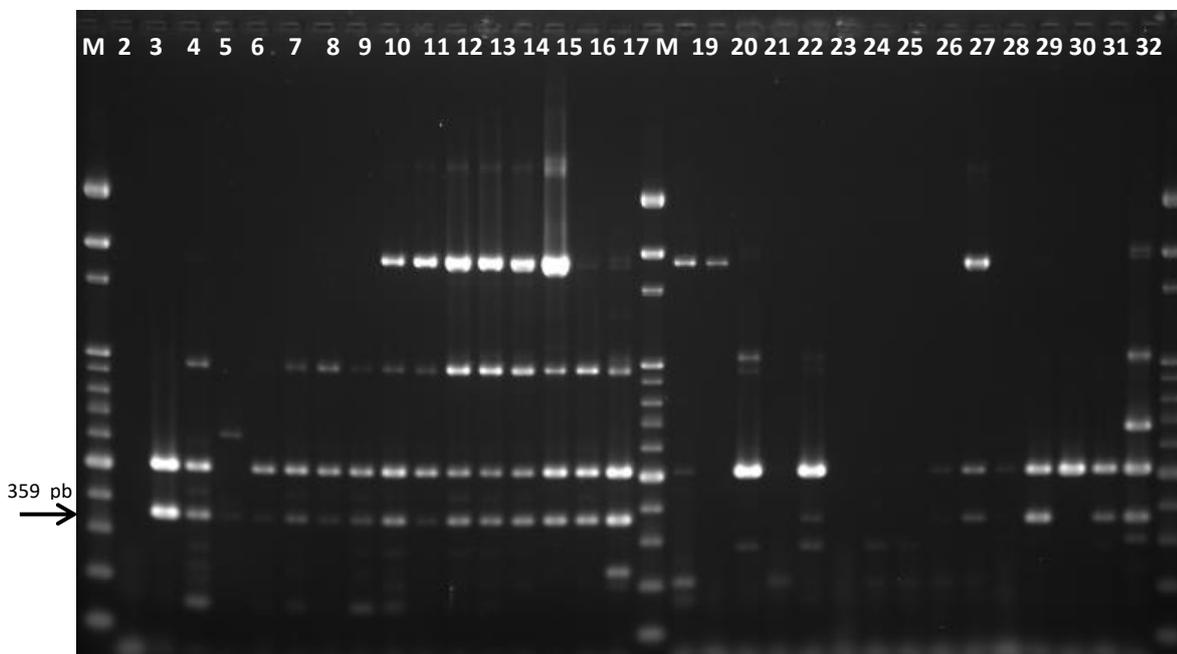


Figura 6 - Foto representativa do gel de eletroforese dos produtos de amplificação obtidos pela reação de PCR multiplex realizada para validação da detecção do gene *ermB* (359 pb). As amostras são: M: marcador 100pb; 2: Branco; 3 - 17 Controles Positivos para gene *ermB*; 19 - 33 Controles Negativos para gene *ermB*.

Tabela 9 – Resultado da amplificação de amostras de DNA de bactérias portadoras ou não do gene *ermB* em triplicata para avaliação do método de PCR Multiplex

| Canaleta no gel | Amostra | Data da PCR | | | Canaleta no gel | Amostra | Data da PCR | | |
|-----------------|---------|-------------|-------|-------|-----------------|---------|-------------|-------|-------|
| | | 01/03 | 13/03 | 21/05 | | | 01/03 | 13/03 | 21/05 |
| 3 | 54 | + | + | + | 19 | 4 | - | - | - |
| 4 | 73 | + | + | + | 20 | 10 | - | - | - |
| 5 | 75 | + | + | + | 21 | 36 | - | - | - |
| 6 | 82 | + | + | + | 22 | 56 | - | - | - |
| 7 | 84 | + | + | + | 23 | 40 | + | - | + |
| 8 | 138 | + | + | + | 24 | 111 | - | - | - |
| 9 | 168 | + | + | + | 25 | 116 | - | - | - |
| 10 | 50 | + | + | + | 26 | 121 | - | - | - |
| 11 | 603 | + | + | + | 27 | 69 | - | - | - |
| 12 | 610 | + | + | + | 28 | 539 | - | - | + |
| 13 | 611 | + | + | + | 29 | 597 | - | - | - |
| 14 | 615 | + | + | + | 30 | 612 | - | - | + |
| 15 | 638 | + | + | + | 31 | 659 | - | - | - |
| 16 | 640 | + | + | + | 32 | 732 | - | - | + |
| 17 | 734 | + | + | + | 33 | 749 | - | - | + |

5.3.3 Avaliação da Sensibilidade e Especificidade do método baseado em PCR multiplex para detecção do gene *mecA* (310 pb)

As 15 amostras de DNA bacteriano contendo o gene apresentaram resultado de amplificação positiva quando os oligonucleotídeos *mecA* 310F e *mecA* 310R foram empregados conforme mostra a imagem do gel na Figura 7 (canaletas 02 a 17). O par de primers utilizado mostrou-se eficaz uma vez que a maioria das amostras conhecidamente portadoras do gene *mecA* (positivas) amplificaram, apresentando apenas uma amostra que não amplificou o fragmento de DNA de 310 pb. Já quanto à especificidade, algumas amostras de DNA bacteriano desprovidas do marcador *mecA* apresentaram amplificação do fragmento de DNA 310 pb como demonstrado na Figura 7 (canaletas 19, 20, 21). A análise para o gene *mecA*, mostrou-se nas três repetições (Tabela 10) que não teve tanto controle dos interferentes gerando o resultado falso negativo e resultados falso positivos. Assim sendo, estes ensaios deverão ser repetidos após aquisição de novos oligonucleotídeos.



Figura 7 - Foto representativa do gel de eletroforese dos produtos de amplificação obtidos pela reação de PCR multiplex realizada para validação da detecção do gene *mecA* (310 pb). As amostras são: M: marcador 100pb; 2: Branco; 3 - 17 Controles Positivos para gene *mecA*; 19 – 33 Controles Negativos para gene *mecA*.

Tabela 10 – Resultado da amplificação de amostras de DNA de bactérias portadoras ou não do gene *mecA* em triplicata para avaliação do método de PCR Multiplex .

| Canaleta no gel | Amostra | Data da PCR | | | Canaleta no gel | Amostra | Data da PCR | | |
|-----------------|---------|-------------|-------|-------|-----------------|---------|-------------|-------|-------|
| | | 24/04 | 07/05 | 14/06 | | | 24/04 | 07/05 | 14/06 |
| 3 | 225 | + | + | + | 19 | 36 | + | + | - |
| 4 | 141 | + | + | + | 20 | 40 | + | - | - |
| 5 | 247 | + | + | + | 21 | 54 | + | - | - |
| 6 | 651 | + | + | + | 22 | 57 | - | - | - |
| 7 | 810 | + | + | + | 23 | 73 | - | - | - |
| 8 | 811 | + | + | + | 24 | 75 | - | - | - |
| 9 | 812 | + | + | + | 25 | 82 | - | - | - |
| 10 | 831 | + | + | + | 26 | 84 | - | - | - |
| 11 | 891 | + | + | + | 27 | 168 | - | - | - |
| 12 | 896 | + | + | + | 28 | 603 | - | - | - |
| 13 | 915 | + | + | + | 29 | 610 | - | - | - |
| 14 | MRASU | + | + | + | 30 | 614 | - | - | - |
| 15 | MRSA1 | + | + | + | 31 | 611 | - | + | - |
| 16 | 779 | + | + | - | 32 | 638 | - | - | - |
| 17 | 903 | + | + | + | 33 | 734 | - | - | - |

5.3.4 Avaliação da Sensibilidade e Especificidade do método baseado em PCR multiplex para detecção do gene *blaZ* (674 pb)

As 15 amostras de DNA bacteriano contendo o gene apresentaram resultado de amplificação positiva quando os oligonucleotídeos blaZ-486F e blaZ-486R foram empregados conforme mostra a imagem do gel na Figura 8 (canaletas 02 a 17). O par de primers utilizado mostrou-se eficaz uma vez que a maioria das amostras conhecidamente portadoras do gene *blaZ* (positivas) amplificaram, apresentando apenas duas amostra que não amplificou o fragmento de DNA de 674 pb (Tabela 11). Por outro lado, todas as amostras de DNA bacteriano desprovidas do marcador blaZ não apresentaram amplificação do fragmento de DNA 674 pb como demonstrado nas canaletas 19 a 33 (Figura 8). A análise para o gene *blaZ*, mostrou-se nas três repetições (Tabela 11) a que teve mais controle dos interferentes não gerando falsos resultados positivos.

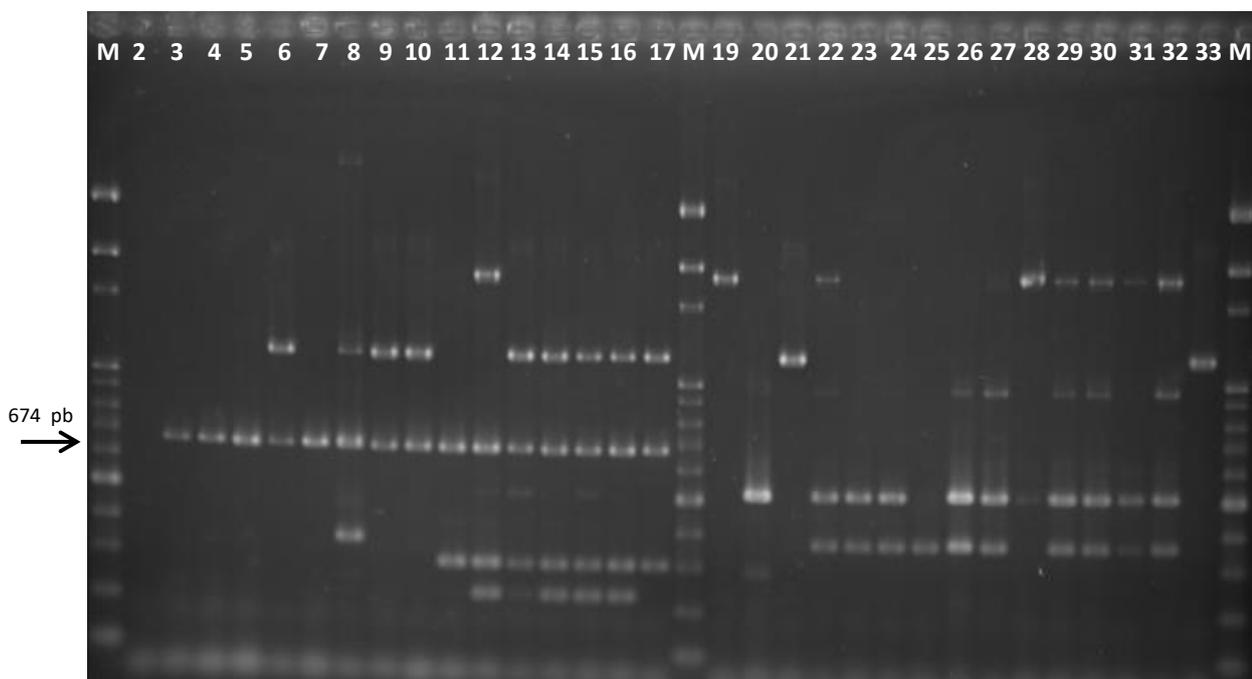


Figura 8 - Foto representativa do gel de eletroforese dos produtos de amplificação obtidos pela reação de PCR multiplex realizada para validação da detecção do gene *blaZ* (674 pb). As amostras são: M: marcador 100pb; 2: Branco; 3 - 17 Controles Positivos para gene *blaZ*; 19 – 33 Controles Negativos para gene *blaZ*.

Tabela 11 – Resultado da amplificação de amostras de DNA de bactérias portadoras ou não do gene *blaZ* em triplicata para avaliação do método de PCR Multiplex.

| Canaleta no gel | Amostra | Data da PCR | | | Canaleta no gel | Amostra | Data da PCR | | |
|-----------------|---------|-------------|-------|-------|-----------------|---------|-------------|-------|-------|
| | | 23/05 | 28/05 | 21/06 | | | 23/05 | 28/05 | 21/06 |
| 3 | 8950 | + | + | - | 19 | 10 | - | - | - |
| 4 | 9085 | + | + | + | 20 | 40 | - | - | - |
| 5 | 10032 | + | + | + | 21 | 8951 | - | - | - |
| 6 | 10013 | + | + | - | 22 | 54 | - | - | - |
| 7 | 10014 | + | + | + | 23 | 57 | - | - | - |
| 8 | 10030 | + | + | + | 24 | 73 | - | - | - |
| 9 | 10031 | + | + | + | 25 | 75 | - | - | - |
| 10 | 136 | + | + | + | 26 | 82 | - | - | - |
| 11 | 141 | + | + | + | 27 | 138 | - | - | - |
| 12 | 247 | + | + | + | 28 | 552 | - | - | - |
| 13 | 810 | + | + | + | 29 | 603 | - | - | - |
| 14 | 891 | + | + | + | 30 | 610 | - | - | - |
| 15 | 896 | + | + | + | 31 | 613 | - | - | - |
| 16 | 915 | + | + | + | 32 | 615 | - | - | - |
| 17 | 812 | + | + | + | 33 | 741 | - | - | - |

5.3.5 Avaliação da Sensibilidade e Especificidade do método baseado em PCR multiplex para detecção do gene *tetK* (1159 pb)

As 15 amostras de DNA bacteriano contendo o gene apresentaram resultado de amplificação positiva quando os oligonucleotídeos tetK1 e tetK2 foram empregados conforme mostra a imagem do gel na Figura 9 (canaletas 02 a 17). O par de primers utilizado mostrou-se eficaz uma vez que a maioria das amostras conhecidamente portadoras do gene *tetK* (positivas) amplificaram, apresentando apenas duas amostra que não amplificou o fragmento de DNA de 1159 pb (Tabela 12). Por outro lado, todas as amostras de DNA bacteriano desprovidas do marcador tetK não apresentaram amplificação do fragmento de DNA 1159 pb como demonstrado nas canaletas 19 a 33 (Figura 9). A análise para o gene *tetK*, mostrou-se nas três repetições (Tabela 12) a que teve mais controle dos interferentes não gerando resultados falso positivos.

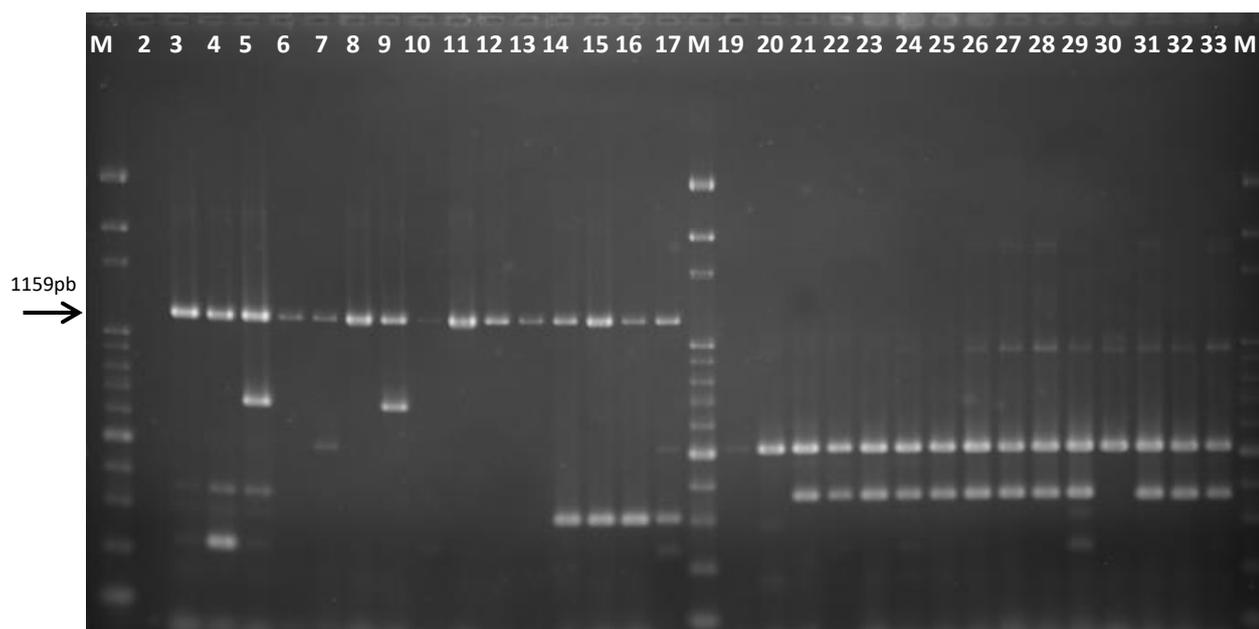


Figura 9 - Foto representativa do gel de eletroforese dos produtos de amplificação obtidos pela reação de PCR multiplex realizada para validação da detecção do gene *tetK* (1159 pb). As amostras são: M: marcador 100pb; 2: Branco; 3 - 17 Controles Positivos para gene *tetK*; 19 – 33 Controles Negativos para gene *tetK*.

Tabela 12 – Resultado da amplificação de amostras de DNA de bactérias portadoras ou não do gene *tetK* em triplicata para avaliação do método de PCR Multiplex.

| Canaleta no gel | Amostra | Data da PCR | | | Canaleta no gel | Amostra | Data da PCR | | |
|-----------------|---------|-------------|-------|-------|-----------------|---------|-------------|-------|-------|
| | | 03/05 | 15/05 | 22/05 | | | 03/05 | 15/05 | 22/05 |
| 3 | 45 | + | + | + | 19 | 10 | - | - | - |
| 4 | 89 | + | + | + | 20 | 40 | - | - | - |
| 5 | 136 | + | + | + | 21 | 54 | - | - | - |
| 6 | 237 | + | + | + | 22 | 73 | - | - | - |
| 7 | 301 | + | + | + | 23 | 82 | - | - | - |
| 8 | 318 | + | + | + | 24 | 84 | - | - | - |
| 9 | 440 | + | + | + | 25 | 168 | - | - | - |
| 10 | 903 | + | + | + | 26 | 603 | - | - | - |
| 11 | 9085 | + | - | - | 27 | 610 | - | - | - |
| 12 | 915 | + | + | - | 28 | 611 | - | - | - |
| 13 | 713 | + | + | + | 29 | 613 | - | - | - |
| 14 | 891 | + | + | + | 30 | 614 | - | - | - |
| 15 | 831 | + | + | + | 31 | 615 | - | - | - |
| 16 | 812 | + | + | + | 32 | 621 | - | - | - |
| 17 | 811 | + | + | + | 33 | 628 | - | - | - |

5.3.6 Avaliação da Sensibilidade e Especificidade do método baseado em PCR multiplex para detecção do gene *tetM* (1862 pb)

As 15 amostras de DNA bacteriano contendo o gene apresentaram resultado de amplificação positiva quando os oligonucleotídeos tetM1 e tetM2 foram empregados conforme mostra a imagem do gel na Figura 10 (canaletas 02 a 17). O par de primers utilizado mostrou-se eficaz uma vez que a maioria das amostras conhecidamente portadoras do gene *tetM* (positivas) amplificaram apresentando algumas amostras que não amplificaram o fragmento de DNA de 1159 pb (Tabela 13). Por outro lado, todas as amostras de DNA bacteriano desprovidas do marcador *tetM* não apresentaram amplificação do fragmento de DNA 1862 pb como demonstrado nas canaletas 19 a 33 (Figura 10). A análise para o gene *tetM*, mostrou-se nas três repetições (Tabela 13) a que teve mais controle dos interferentes não gerando falsos resultados positivos.

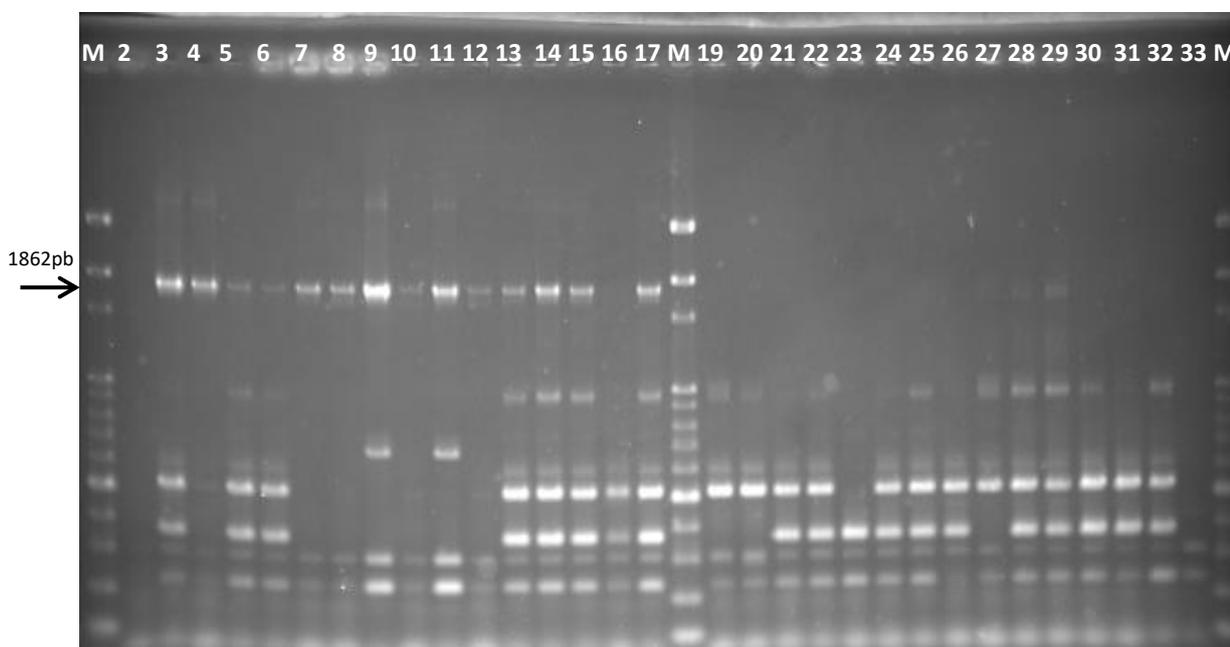


Figura 10 - Foto representativa do gel de eletroforese dos produtos de amplificação obtidos pela reação de PCR multiplex realizada para validação da detecção do gene *tetM* (1862 pb). As amostras são: M: marcador 100pb; 2: Branco; 3 - 17 Controles Positivos para gene *tetM*; 19 – 33 Controles Negativos para gene *tetM*.

Tabela 13 – Resultado da amplificação de amostras de DNA de bactérias portadoras ou não do gene *tetM* em triplicata para avaliação do método de PCR Multiplex.

| Canaleta no gel | Amostra | Data da PCR | | | Canaleta no gel | Amostra | Data da PCR | | |
|-----------------|---------|-------------|-------|-------|-----------------|---------|-------------|-------|-------|
| | | 07/07 | 11/07 | 16/07 | | | 07/07 | 11/07 | 16/07 |
| 3 | 638 | + | + | + | 19 | 36 | - | - | - |
| 4 | 539 | + | + | + | 20 | 40 | - | - | - |
| 5 | 47 | - | + | + | 21 | 57 | - | - | - |
| 6 | 54 | - | + | + | 22 | 73 | - | - | - |
| 7 | 10 | + | + | + | 23 | 75 | - | - | - |
| 8 | 552 | + | + | + | 24 | 82 | - | - | - |
| 9 | 247 | + | + | + | 25 | 84 | - | - | - |
| 10 | 546 | + | + | + | 26 | 168 | - | - | - |
| 11 | MRSAU | + | + | + | 27 | 614 | - | - | - |
| 12 | 4 | - | + | + | 28 | 621 | - | - | - |
| 13 | 603 | + | + | + | 29 | 628 | - | - | - |
| 14 | 610 | + | + | + | 30 | 630 | - | - | - |
| 15 | 611 | + | + | + | 31 | 640 | - | - | - |
| 16 | 613 | - | - | - | 32 | 734 | - | - | - |
| 17 | 615 | + | + | + | 33 | 903 | - | - | - |

5.3.7 Avaliação da Sensibilidade e Especificidade do método baseado em PCR multiplex para detecção do gene *aacA-aphD* (228 pb)

As 15 amostras de DNA bacteriano contendo o gene *aacA-aphD* não amplificaram bem, quando os oligonucleotídeos *aacA-aphD1* e *aacA-aphD2* foram empregados conforme mostra a imagem do gel na Figura 11 (canaletas 02 a 17). O primer não mostrou-se sensível, e pouquíssimas amostras deram positivas nos testes. Por outro lado, todas as amostras de DNA bacteriano desprovidas do marcador *aacA-aphD* não apresentaram amplificação do fragmento de DNA 228 pb como demonstrado nas canaletas 19 a 33 (Figura 11). A análise para o gene *aacA-aphD*, mostrou-se nas três repetições (Tabela 14) a que teve a maior interferência de componentes da reação não apresentou resultados falso positivos. Entretanto, considerando que mesmo amostras portadoras do gene não apresentaram amplificação, novos primers deverão ser desenhados e avaliados para o marcador *aacA-aphD*.

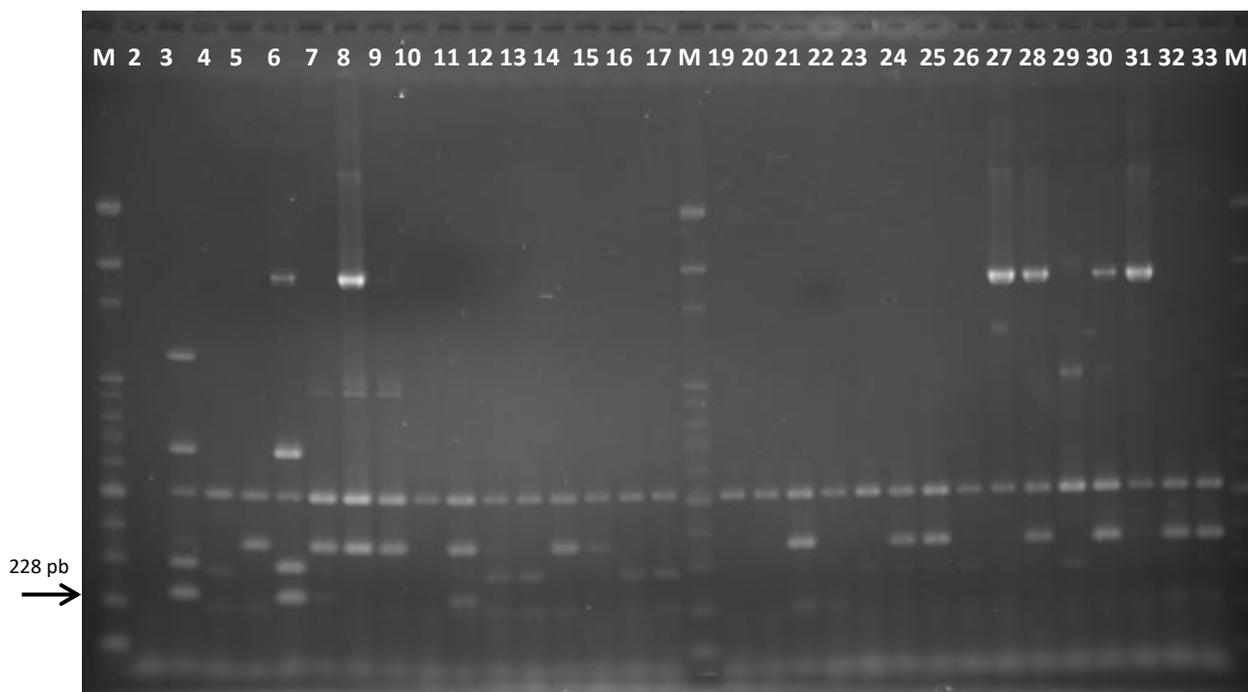


Figura 11 - Foto representativa do gel de eletroforese dos produtos de amplificação obtidos pela reação de PCR multiplex realizada para validação da detecção do gene *aacA-aphD* (228 pb). As amostras são: M: marcador 100pb; 2: Branco; 3 - 17 Controles Positivos para gene *aacA-aphD*; 19 - 33 Controles Negativos para gene *aacA-aphD*.

Tabela 14 – Resultado da amplificação de amostras de DNA de bactérias portadoras ou não do gene *aacA-aphD* em triplicata para avaliação do método de PCR Multiplex

| Canaleta no gel | Amostra | Data da PCR | | | Canaleta no gel | Amostra | Data da PCR | | |
|-----------------|---------|-------------|-------|-------|-----------------|---------|-------------|-------|-------|
| | | 05/04 | 11/04 | 13/04 | | | 05/04 | 11/04 | 13/04 |
| 3 | 903 | - | - | - | 19 | 4 | - | - | - |
| 4 | 40 | - | - | + | 20 | 10 | - | - | - |
| 5 | 54 | + | - | - | 21 | 51 | - | - | - |
| 6 | 247 | - | - | - | 22 | 65 | - | - | - |
| 7 | 84 | - | - | + | 23 | 139 | - | - | - |
| 8 | 638 | - | - | + | 24 | 140 | - | - | - |
| 9 | 640 | - | - | - | 25 | 141 | - | - | - |
| 10 | 660 | - | - | - | 26 | 145 | - | - | - |
| 11 | 734 | - | - | - | 27 | 539 | - | - | - |
| 12 | 109 | - | - | + | 28 | 546 | - | - | - |
| 13 | 121 | - | - | - | 29 | 36 | - | - | - |
| 14 | 169 | - | - | - | 30 | 1 | - | - | - |
| 15 | 589 | - | - | - | 31 | 552 | - | - | - |
| 16 | 700 | - | - | - | 32 | 2 | - | - | - |
| 17 | 732 | - | - | - | 33 | 50 | - | - | - |

Embora todas amostras selecionadas para serem controles positivos e controles negativos na reação tivessem sido selecionadas a partir da PCR Monoplex, algumas reações apresentaram Falsos-positivos e Falsos-negativos na PCR Multiplex. Diversos autores relatam a necessidade de um controle interno para análises genéticas através da PCR, Bladbjerg et al. (2002) separam esses controles em fases como descrito na Tabela 15.

Tabela 15 - Controle de qualidade interna para métodos de genéticos baseados em PCR (adaptado de Bladbjerg et al. (2002)).

| Fase | Processos | Passos para garantir a qualidade |
|-----------------------------|--|---|
| Variação Pré - Analítica | Manipulação de amostras Isolamento do DNA | Quantificar o DNA |
| | | Relação DNA / proteína |
| | | Diluir amostras para concentrações semelhantes de DNA Usar tubos e ponteira livres de DNase / RNase |
| Variação Analítica | Amplificação do DNA Separando fragmentos por eletroforese | Incluir amostras com genótipo conhecido |
| | | Incluir o reagente em branco Incluir marcador de pares de bases |
| Confirmação dos Resultados | | Reanálise com método diferente, se possível. Associação com outra variação Discordam-se mais de 5% dos resultados, reanalisar toda a série. |
| Variação Pós - Analítica | Leitura de resultados Entrada no banco de dados | Duas leituras independentes |
| | | Entrada dupla no banco de dados |

Raggi et al., (2003), salienta que a técnica de PCR é sensível à inúmeras fontes de variações podendo ser previsíveis ou não e que podem influenciar negativamente os resultados de amplificação. Resultados Falso-Negativos estão frequentemente relacionados com a qualidade do DNA e até a presença de inibidores da enzima *Taq* DNA Polimerase. Já para resultados Falso-Positivos se dá, principalmente, pela contaminação com outros DNA's ou com amplicons de PCR (CARNEVALLE, 2015). Vale ressaltar que a especificidade de todos os primers foram confirmadas pelo Basic Local Alignment Search Tool – BLAST (GenBank) de acordo com a Tabela 16.

A análise para o gene *tetO* (Figura 5), mostrou-se nas três repetições a que teve mais controle dos interferentes não gerando falsos resultados positivos e negativos. Os teste para os genes *ermB* (Figura 6) e *mecA* (Figura 7) apresentaram resultados falso-positivos sugerindo assim uma contaminação provavelmente por amplicons de PCR's pré existente devido todas as amostras de DNA terem sido confirmadas com teste de PCR monoplex e apresentarem resultados negativos para esse genes, ou ainda, há a possibilidade de terem sido contaminadas na etapa de adição do DNA, pois essa é a ultima etapa antes de leva-las ao termociclador e na rotina, adicionava-se primeiro os controles positivos e depois os controles negativos, por exemplo, na Figura 7 podemos observar que os três primeiros controles negativos deram resultados falso-positivos sugerindo assim uma contaminação por DNA de amostras de controle positivo, sendo essa hipótese a mais relevante.

Resultados falso-negativos foram observados nos testes para os genes *mecA* (Figura 7), *blaZ* (Figura 8), *tetK* (Figura 9), *tetM* (Figura 10) e *aacA-aphD* (Figura 11), sendo este último o que apresentou maior índice de resultados falso-negativos. Apesar de todas amostras de controle positivo terem sido confirmadas em PCR monoplex, desta forma a hipótese mais relevante seria a integridade do DNA, visto que todos os reagentes utilizados no mix da PCR são os mesmos para todos. O armazenado dos DNA's deve ser feitos em freezer à -20°C, para minimizar a atividade de degradação das DNAses, devem ser estocados em tubo de plástico, hidrofóbico e com tampa de vedação eficaz para prevenir a evaporação (MELO et. al., 2010). Durante a rotina na realização das PCR's, pode ser que as amostras tenham sido expostas à temperaturas mais altas resultando assim numa suposta degradação dessas amostras de DNA gerando assim esses resultados falso-negativos nas PCR's Multiplex.

5.4 LIMITE DE DETECÇÃO DO ENSAIO DE PCR MULTIPLEX

Para medir a sensibilidade do ensaio de PCR Multiplex, foi feita a diluição de duas amostras de DNA que abrangessem todos os genes envolvidos nas seguintes concentrações: 40 ng, 20 ng, 10 ng, 1 ng e 100 pg (0,1 ng). Reações de PRC Multiplex foram feitas em triplicata para todas essas

concentrações para determinar a sensibilidade dos primers. As amostras selecionadas foram: 810 (Figura 12-A) que contém os genes *tetO* (515 pb), *tetK* (1159 pb), *mecA* (310 pb) e *blaZ* (674 pb) e 603 (Figura 12-B) que contém os genes *ermB* (359 pb), *tetM* (1862 pb), *tetO* (515 pb) e *aacA-aphD* (228 pb).

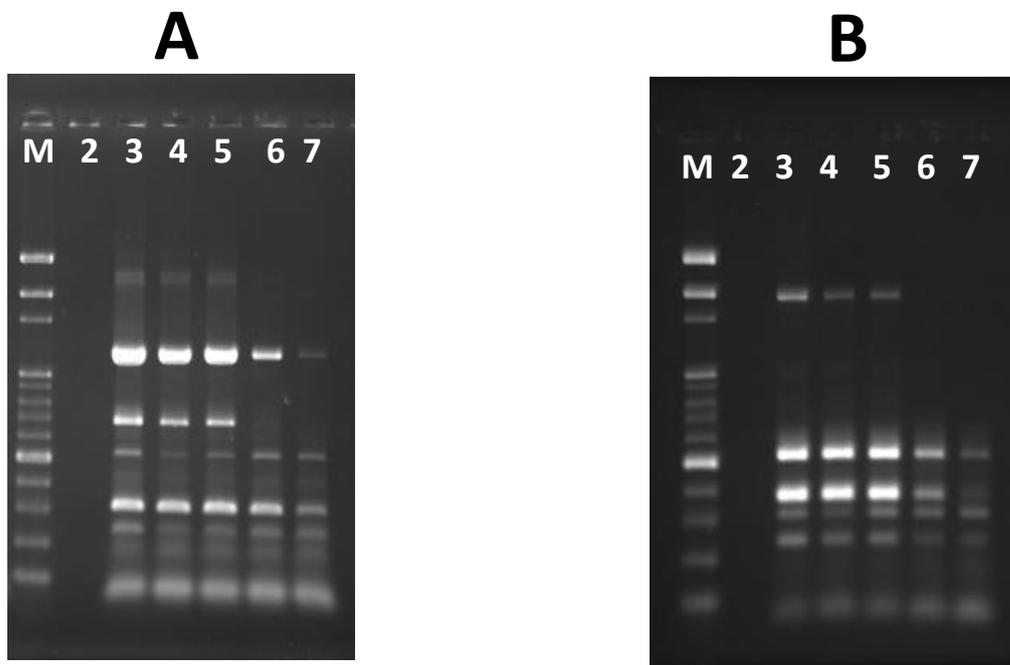


Figura 12 – Foto representativa dos géis de agarose 1,5%, eletroforese dos produtos de amplificação obtidos pela reação de PCR multiplex realizada para a determinação da sensibilidade dos primers. A - Amostra 810, onde: M: marcador 100pb, 2: Branco; 3: 40 ng; 4: 20 ng; 5: 10 ng; 6: 1 ng; 7: 100 pg (0,1 ng); B - Amostra 603, onde: M: marcador 100pb, 2: Branco; 3: 40 ng; 4: 20 ng; 5: 10 ng; 6: 1 ng; 7: 100 pg (0,1 ng).

Em ambas as amplificações, a concentração de 10 ng/ μ L de DNA foi o limite mínimo para que todos os primers amplificassem. Na amostra 810 (Figura 12-A), o primer para o gene *blaZ* (674 pb) não amplificou para as concentrações de 1 ng e 100 pg (0,1 ng), os primers para os genes *tetO* (515 pb) e *mecA* (310 pb) amplificaram facilmente para todas as concentrações e o primer para o gene *tetK* (1159 pb) teve sua amplificação diminuída a partir da concentração de 1ng. Na amostra 603 (Figura 12-B), o primer para o gene *tetM* (1862 pb) não amplificou para as concentrações de 1 ng e 100 pg (0,1 ng), os primers para os genes *tetO* (515 pb) amplificou facilmente para todas as concentrações e os primers para os genes *ermB* (359 pb) e *aacA-aphD* (228 pb) teve suas amplificações diminuídas a partir da concentração de 1ng.

5.5 AVALIAÇÕES *IN SILICO* DE PRIMERS ESPECÍFICOS PARA GENES DE RESISTÊNCIA

Foram realizados ensaios “*in silico*” visando à detecção dos genes *mecA*, *blaZ*, *aacA-aphD*, *ermB*, *tetK*, *tetM* e *tetO* em sequências de genes ou de genomas depositados no National Center for Biotechnology Information - NCBI, utilizando as sequências de diferentes pares de primers descritas na literatura para cada gene a ser incluído no método baseado em PCR multiplex (Tabela 16).

Tabela 16 - Avaliação *in silico* de primers específicos para genes de resistência a antimicrobianos utilizando a ferramenta pick primers do NCBI.

| Gene | Primers/Tamanho do amplicons | Patógenos da mastite |
|------------------|---|---|
| <i>ermB</i> | - 359pb <i>ermB</i> 1 5' CCGTTTACGAAATTGGAACAGGTAAAGGGC3' <i>ermB</i> 2 5' GAATCGAGACTTGAGTGTGC 3' | <i>S. aureus</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>S. agalactiae</i> , <i>E. coli</i> |
| <i>tetK</i> | - 1159pb <i>tetK</i> 1 5' TATTTTGGCTTTGTATTCTTTCAT 3' <i>tetK</i> 2 5' GCTATACCTGTTCCCTCTGATAA 3' | <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. agalactiae</i> . |
| <i>tetO</i> | - 515pb <i>tetO</i> 1 5' AACTTAGGCATTCTGGCTCAC 3' <i>tetO</i> 2 5' TCCCCTGTTCCATATCGTCA 3' | <i>S. agalactiae</i> , <i>S. uberis</i> , <i>S. aureus</i> . |
| <i>tetM</i> | - 1862pb <i>tetM</i> 1 5' AGTTTTAGCTCATGTTGATG 3' <i>tetM</i> 2 5' TCCGACTATTTAGACGACGG 3' | <i>S. aureus</i> , <i>S. agalactiae</i> , <i>E. faecium</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>E. faecalis</i> . |
| <i>mecA</i> | - 310pb <i>mecA</i> 1 5' TGGCTATCGTGTCAACAATCG 3' <i>mecA</i> 2 5' CTGGAAGTGTGAGCAGAG 3' | <i>S. epidermidis</i> , <i>S. aureus</i> . |
| <i>blaZ</i> | - 674pb <i>blaZ</i> 1 5' GTTGCGAACTCTTTGAATAGG 3' <i>blaZ</i> 2 5' GGAGAATAAGCAACTATATCATC 3' | Não é encontrado na base de dados de nucleotídeos |
| <i>aacA-aphD</i> | - 228pb <i>aacA-aphD</i> 1 5' TAATCCAAGAGCAATAAGGGC 3' <i>aacA-aphD</i> 2 5' GCCACACTATCATAACCACTA 3' | <i>S. aureus</i> , <i>S. agalactiae</i> , <i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>S. epidermidis</i> . |

5.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

5.6.1 Resultados da Repetibilidade (Repê) e Reprodutibilidade (Reprô):

Para os resultados de repetibilidade das amostras Controle Positivos (CP) e Controle Negativos (CN) os valores expressos em porcentagem (%) na Tabela 17, que podem variar de 0 a 100 %. Resultados mais próximos de 100% mostram que o sistema de medidas é adequado, enquanto resultados mais distantes de 100%, mostram que o sistema de medidas não é adequado para este experimento. Desse modo, o primer para o gene *tetO*, mostrou-se como o melhor marcador molecular obtendo 100% para o CP e o CN, sendo considerado assim um adequado sistema de medida. Os primers para os genes *ermB*, *mecA*, *blaZ*, *tetK* e *tetM* também mostram um adequado sistema de medida pois os resultados deram próximo a 100%, já o primer para o gene *aacA-aphD* apresentou o pior resultado que foi de 11,11% para os controles positivos, mostrando-se não ser um sistema de medidas adequado para este experimento, enquanto para os controles negativos o primer mostrou-se adequado.

Para resultados de reprodutibilidade das amostras Controle Positivos (CP) e Controle Negativos (CN) os valores expressos em porcentagem (%) na Tabela 17, que podem variar de 0 a 100 %. Resultados mais próximos de 100% mostram que o sistema de medidas é aceitável e resultados mais distantes de 100%, mostram que o experimento deve ser reconduzido, pois o sistema de medidas não apresenta robustez. Novamente o primer para o gene *tetO* mostrou-se como melhor marcador molecular obtendo 100% para o CP e o CN desse modo o sistema de medida é considerável aceitável. Para todos outros primers para os genes *ermB*, *mecA*, *blaZ*, *tetK*, *tetM* e *aacA-aphD* são considerados aceitáveis pois estão próximos a 100%.

Tabela 17 – Resultados dos Cálculos da Repetibilidade (Repê) e Reprodutibilidade (Reprô) em relação às amostras controle positivo (CP) e controle negativo (CN)

| Gene | Controles | Repê (%) | Reprô (%) |
|------------------|-----------|----------|-----------|
| <i>tetO</i> | CP | 100 | 100 |
| | CN | 100 | 100 |
| <i>ermB</i> | CP | 100 | 100 |
| | CN | 84,44 | 73,33 |
| <i>mecA</i> | CP | 97,78 | 95,56 |
| | CN | 88,89 | 80 |
| <i>blaZ</i> | CP | 95,56 | 91,11 |
| | CN | 100 | 100 |
| <i>tetK</i> | CP | 93,33 | 91,11 |
| | CN | 100 | 100 |
| <i>tetM</i> | CP | 86,67 | 86,67 |
| | CN | 100 | 100 |
| <i>aacA-aphD</i> | CP | 11,11 | 77,78 |
| | CN | 100 | 100 |

5.6.2 Força da Coincidência – Índice de *Kappa de Cohen*

Na tabela 18 temos os graus de coincidências dos resultados de cada primer utilizado no multiplex.

Tabela 18 – Resultado do Índice *Kappa*

| Índice <i>Kappa de Cohen</i> | |
|------------------------------|--------------|
| <i>tetO</i> | 1 |
| <i>ermB</i> | 0,8444444444 |
| <i>mecA</i> | 0,866666667 |
| <i>blaZ</i> | 0,955555556 |
| <i>tetK</i> | 0,9333333333 |
| <i>tetM</i> | 0,888888889 |
| <i>aacA-aphD</i> | 0,1111111111 |

A interpretação do índice *Kappa* se dá através da Tabela 19, que vai qualificar a força de coincidência dos resultados.

Tabela 19 - Qualificação da força das coincidências pelo índice *Kappa* de Cohen

| <i>Kappa</i> de Cohen | Força de coincidência |
|-----------------------|-----------------------|
| 0 | Pobre |
| 0,01 - 0,20 | Leve |
| 0,21 - 0,40 | Aceitável |
| 0,41 - 0,60 | Moderada |
| 0,61 - 0,80 | Considerável |
| 0,81 - 1,00 | Quase perfeita |

Desse modo, a interpretação dos resultados da Tabela 10, mostram que as forças de coincidência dos primers *tetO*, *ermB*, *mecA*, *blaZ*, *tetK* e *tetM* ficaram quase perfeita e os resultados para o primer *aacA-aphD* teve uma força de coincidência leve, ratificando que esse não foi um bom resultado.

6 CONCLUSÃO

Foi padronizado um método de PCR multiplex para detecção, em *Streptococcus agalactiae* e *Staphylococcus* spp., de sete genes de resistência a antimicrobianos relevantes para o controle da mastite bovina no Brasil.

O conjunto de oligonucleotídeos que possibilitou a detecção simultânea de todos os marcadores foi *aacA-aphD*, *ermB*, *tetO-515*, *tetM*, *tetK*, *mecA* 310, *blaZ-486*

A sensibilidade do método foi 100% para os marcadores *tetO* e *ermB*, 98% *mecA*, 96% *blaZ*, 93% *tetK*, 87% *tetM* e 11% *aacA-aphD*.

A especificidade do método foi de 100% para os marcadores *tetO*, *blaZ*, *tetK*, *tetM* e *aacA-aphD*, 89% *mecA* e 86% *ermB*

O limite de detecção simultânea de todos os marcadores de resistência utilizando o método de PCR multiplex, onde todos primers funcionaram perfeitamente ficou em 0,4 ng de DNA/ μ L da reação.

O método desenvolvido poderá ser usado para ampliar o conhecimento sobre a base genética e os mecanismos de transmissão da resistência antimicrobiana em *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus agalactiae*.

Estudos adicionais são necessários para a identificação de oligonucleotídeos mais adequados para detectar o marcador aacA-aphD e adaptar o método para detectar esses marcadores diretamente em amostras de leite.

REFERÊNCIAS

- ABATH, F. G. et al. Single-tube nested PCR using immobilized internal primers. **BioTechniques**, Natick, v. 33, n. 6, 1210-1214, Dez. 2002.
- ALBERTS, B. et al. Tecnologia do DNA recombinante. In: _____. **Biologia Molecular da Célula**. 3. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. Cap. 7, 291-334.
- BALOWS, A.; HAUSLER JR., W. J.; HERRMANN, K. L. et al. **Manual of Clinical Microbiology**. 5 ed. Washington: American Society for Microbiology, 1991. 1384p.
- BLADBJERG, E. M.; GRAM, J.; JESPERSENA, J.; MAAT, M.P.M. Internal quality control of PCR-based genotyping methods: practical experiences. **Vascular Pharmacology**, Esbjerg, Denmark, v. 39, 127-129, Ago. 2002.
- BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. **Deteção e identificação de bactérias de importância médica**. Módulo V, 2004.
- BRASIL. Ministério Da Agricultura, Pecuária E Abastecimento. **Manual De Verificação De Desempenho De Métodos Para Diagnóstico Molecular De Doenças Infecciosas Na Rede Nacional De Laboratórios Agropecuários**. 1. ed. Brasília, DF, 2015.
- BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; RIBEIRO, M. T., VEIGA, V. M. O. Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação. **Arq.Bras. Med. Vet. Zootec.**,v. 51, n. 2, 129-135, 1999.
- CARNEVALLE. G.G. **Análise de interferentes na extração, amplificação e deteção de *M. tuberculosis* por reação de PCR em amostras de líquido pleural, escarro e lavado broncoalveolar**. 2015. Tese Doutorado. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.
- COELHO, S. M. O.; PEREIRA, I. A.; SOARES, L. C.; PRIBUL, B. R.; SOUZA, M. M. S. Profile of virulence factors of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Dairy Science**, v. 94, 3305-3310, 2011.
- COSTA G.M., PEREIRA U.P., SOUZA-DIAS M.A.G. & SILVA N. Yeast mastitis outbreak in a Brazilian dairy herd. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 49, n. 3, 239-243, 2012.
- DECLOUR, A. Outer Membrane Permeability and Antibiotic Resistance. **National Institutes of Health**, v. 1749, n. 5, 808-816, 2009.

DIAS, R. V. C. Principais métodos de diagnóstico e controle da mastite bovina. **Acta Veterinaria Brasília**, v.1, n.1, 23-27, 2007.

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.

DZIDIC, S., SUSKOVIC, J., KOS, B. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: Biochemical and Genetic Aspects. **Food Technology Biotechnology**, Zagreb -Croácia, v. 46, n. 11, 11-21, Nov. 2008.

EISENSTEIN, B. The polymerase chain reaction: A new method of using molecular genetics for medical diagnosis. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 322, n. 3, 178-183, Jan. 1990.

ERSKINE R.J.; WAGNER S.; DEGRAVES F.J. Mastitis therapy and pharmacology. **Vet Clin Food Anim**, v.19, 109-138, 2003.

FLUIT, AD C.; VISSER, M.R.; SCHMITZ, F. Molecular detection of Antimicrobial Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v.14, n.4, 836-871. Out. 2001.

FONSECA, L.F.L. da; SANTOS, M.V. dos. **Qualidade do leite e controle de mastite**. São Paulo, SP: Lemos Editorial, 2000 il.. 175 p.

FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. **Qualidade do leite e controle da mastite**. São Paulo: Lemos, 2001. 175p.

FONTANA V.L.D.S., GIANNINI M.J.S.M., LETFE C.Q.F., MIRANDA E.T., ALMEIDA A.M.F., FONTANA C.A.P., SOUZA C.M. & STELLA A.E. Etiology of bovine subclinical mastitis, susceptibility of the agent to antimicrobial drugs and detection of the gene β -lactamase in *Staphylococcus aureus*. **Vet. Zootec.**, Araraquara, v. 17, n. 4, 552-559, 2010.

FORBES D.; HEBERT C.N. Studies in the pathogenesis of *staphylococcal* mastitis. **Vet Rec**, v.82, 69-73, 1968.

FOX L.K.; GAY J.M. Contagious mastitis. **Vet. Clin. Food Anim**, v.9, n.3, 475-487, 1993.

FOX L.K.; FERENS W.A.; BOHACH G.A. *et al.* **Staphylococcus aureus**: super mastitis pathogen. In: PROCEEDINGS OF THE 39TH ANNUAL MEETING OF THE NATIONAL MASTITIS COUNCIL. Atlanta (GA), p. 98-103, 2000.

GOODMAN & GILMAN'S. **The Pharmacological basis of Therapeutics**. 12^a ed. Nova Iorque: McGraw Hill, 2011. 2109 p.

GUIMARÃES, F. F.; MANZI, M. P.; JOAQUIM, S. F.; RICHINI-PEREIRA, V. B.; LANGONI, H. Short communication: Outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)-associated mastitis in a closed dairy herd. **J. Dairy Sci.** Botucatu, SP, v. 100, 726–730, 2017.

HOLMES, R., JOBLING, M. Genetic. Em Baron S (Eds.), **Medical Microbiology**. 4^a ed. Galveston. 1996

HAWKEY, P. M. The origins and molecular basis of antibiotic resistance. **British Medical Journal**, Reino Unido, v.317, 657-659, Set. 1998.

JOBIM, M. B. et al. Patógenos associados à mastite bovina em rebanhos leiteiros na Região Sul do Brasil. **Boletim de Indústria Animal**, v. 67, n. 2, 175–181, 2010.

KATZUNG, B. **Farmacologia Básica e Clínica**. 12^a ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 2014. 1228 p.

KREWER C.C., LACERDA I.P.S., AMANSO E.S., CAVALCANTE N.B., PEIXOTO M.R., PINHEIRO J.W., COSTA M.M. & MOTA R.A. Etiology, antimicrobial susceptibility profile of *Staphylococcus* spp. And risk factors associated with bovine mastitis in the states of Bahia and Pernambuco. **Pesq. Vet. Bras.**, Dois Irmãos, v. 5, n. 33, 601-606, Mai. 2013.

KULKARNI A.G. & KALI WAL B. Bovine mastitis: a review. **International Journal of Recent Scientific Research**, Dharwad, v. 4, n. 5, 543-548, Mai. 2013.

LADEIRA, S.L.R. **Mastite bovina**. In: Riet-Correa, F.; Schild, A.L.; Lemos, R.A.A.; Borges, J.R.J. Doenças de ruminantes e equídeos. 3d. Santa Maria: Pallotti, 2007. v.1, 359-372.

LANGONI H. & TRONCARELLI M. The complex etiology on bovine mastitis and the importance of the microbiological diagnostic: animal hygiene and sustainable livestock production. In: **XVTH INTERNATIONAL CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR ANIMAL HYGIENE**, Vienna, Austria, 3-7 Jul 2011, V.3. 1357-1358.

LEVY, S. B. & MARSHALL, B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. **Nature Medicine Supplement**. Boston, Massachusetts, USA. v. 10, n. 12, S122-S129. Dez. 2004.

LINA G, QUAGLIA A, REVERDY ME, LECLERCQ R, VANDENESCH F, ETIENNE J. Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins among staphylococci. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 43, n. 5, 1062-6. Mai. 1999.

LOWY, F. D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Invest.**, New York, USA, v. 111, n. 9, 1265–127, Mai. 2003.

MARTINEAU, F.; PICARD,F.J.; LANSAC, N.; ME'NARD, C.; ROY,P.H.; OUELLETTE,M. AND BERGERON, M.G. Correlation between the Resistance Genotype Determined by Multiplex PCR Assays and the Antibiotic Susceptibility Patterns of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 44, n. 2, 231–238. Fev. 2000.

MARTINEZ, G.; HAREL, J.; GOTTSCHALK, M. Specific detection by PCR of *Streptococcus agalactiae* in milk.**Can. J. Vet. Res.**, Québec, v. 65, 68-72, Out. 2001.

MARTINI, C. L.; LANGE, C. C.; BRITO, M.A.V.P.; RIBEIRO, J. B.; MENDONÇA, L. C.; VAZ, E. K. Characterisation of penicillin and tetracycline resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk samples in Minas Gerais, Brazil. **Journal of Dairy Research**, Juiz de Fora - MG, Brasil, Jan. 2017.

MESQUITA A.Q., MESQUITA A.J., JARDIM E. A.G.D.V. & KIPNIS A.P.J. Association of TLR4 polymorphisms with subclinical mastitis in Brazilian holsteins. **Braz. J. Microbiol.**, Goiânia, v. 43, 692-697. Jan. 2012.

MICHIGAN STATE UNIVERSITY.(2011). **Molecular mechanisms of resistance. Antimicrobial resistance learning site.** Disponível em <<http://amrls.cvm.msu.edu/microbiology/molecular-basis-for-antimicrobial-resistance>>. Acesso em: 15 jan 2017.

MINGEOT-LECLERCQ, M.P.; GLUPCZYNSKI,Y.; TULKENS, P.M. Aminoglycosides: Activity and Resistance. **AntimicrobialAgentsAndChemotherapy**, Bruxelles, v.43, n. 4, 727–737, abr. 1999.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL.**Laboratory Handbook on Bovine Mastitis.**Natl. Mastitis Counc.Inc., Madison WI. 1999.

NEIHARDT, F. **Bacterial genetics.**Em McGraw Hill (Eds.), Sherris Medical Microbiology - An introduction to infectious diseases (4^a ed., pp. 53 - 74).Nova Iorque, 2004.

NEU, H., GOOTZ, T. **Antimicrobial Chemotherapy**. Em Baron S (Eds.), Medical Microbiology, (4^a ed., Cap. 11). Galveston. 1996.

NG LK1, MARTIN I, ALFA M, MULVEY M. Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. **Mol Cell Probes**. v. 15, n. 4, 209-15. Ago. 2001.

OLIVEIRA, S.D.; SANTOS, L.R.; SCHUCH, D.M.T.; SILVA, A.B.; SALLE, C.T.P.; CANAL, C.W. Detection and identification of salmonellas from poultry-related samples by PCR. **Veterinary Microbiology**, Porto Alegre, RS, Brazil, v. 87, 25–35, Fev. 2002.

OLSEN JE, CHRISTENSEN H, AARESTRUP FM. Diversity and evolution of *blaZ* from *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. **J Antimicrob Chemother**, v. 57, n. 3, 450-60. Mar. 2006.

PACHAURI S., VARSHNEY P., DASH S.K. & GUPTA M.K. Involvement of fungal species in bovine mastitis in and around Mathura, India. **Vet. World**, Mathura, v. 6, n. 7, 393-395, Abr. 2013.

PÉREZ, C. (2007). **SusMedicos.com. em Resistência bacteriana**. Disponível em <http://www.susmedicos.com/art_Resistencia_Bacteriana.htm>. Acesso em: 15 jan 2017.

PÉREZ-ROTH, E.; CLAVERIE-MARTÍN, F.; VILLAR, J.; MÉNDEZ-ÁLVAREZ, S. Multiplex PCR for simultaneous identification of *Staphylococcus aureus* and detection of methicillin and mupirocin resistance. **J.Clin.Microbiol.**, v. 39, n. 11, 4037-4041, Nov. 2001.

PHILPOT, W. N. & NICKERSON, S. C. **Winning the Fight Against Mastitis**. Naperville, IL: Westfalia-Surge, 2000. 188p.

PHUEKTES, P.; MANSELL, P. D.; BROWNING, G. F. Multiplex Polymerase Chain Reaction assay for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcal* causes of bovine mastitis. **J Dairy Sci.**, Austrália, v. 84, 1140-1148, Dez. 2001.

PIANTA C., PASSOS D.T., HEPP D. & OLIVEIRA S.J.D. Isolation of *Arcobacterspp* from the milk of dairy cows in Brazil. **Ciência Rural**, Canoas, v. 37, n. 1, 171-174, Fev. 2007.

RAGGI, C.C., PINZANI, P.; PARADISO, A.; PAZZAGLI, M.; ORLANDO, C. External Quality Assurance Program for PCR Amplification of Genomic DNA: An Italian Experience. **Clinical Chemistry**, Florence, Italy, v. 49, n. 5, 782–791, Nov. 2003.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; HINCHCLIFF, K.W.; CONSTABLE, P.D. **Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, sheep, pig, goats and horses**. 10 ed. Oxford: Saunders, 2007. 2065p.

RIBEIRO, J. B.; PINTO, L. E.; ARAÚJO, M. A. S.; MENDONÇA, L. C.; SANTOS, F. F.; LANGE, C. C.; BRANDÃO, H. M.; GUIMARAES, A.S.; BRITO, M. A. V. P. Evaluation of Tetracycline and Erythromycin Resistance in *Streptococcus agalactiae* Isolated from Bovine Subclinical Mastitis. In: **27º SBM - Congresso Brasileiro de Microbiologia**. 2013, Anais. Natal - Rio Grande do Norte. Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2013. 1p.

RIBEIRO M.G., GERALDO J.S., LANGONI H., LARA G.H.B., SIQUEIRA A.K., SALERNO T. & FERNANDES M.C. Microrganismos patogênicos, celularidade e resíduos de antimicrobianos no leite bovino produzido no sistema orgânico. **Pesq. Vet. Bras.**, Botucatu, v. 1, n. 29, 52-58. Jan. 2009.

RICE, L., BONOMO, R. Genetic and Biochemical mechanisms of bacterial Resistance to Antimicrobial Agentes. In: VICTOR LORIAN, M. D. **Antibiotics in Laboratory Medicine**. 5ª ed. Nova Iorque: Lippincott Williams & Wilkins, 2005. Capítulo 10, 441-508.

RUEGG, P. L.; REINEMANN D. J. **Milk Quality and Mastitis Tests**. *Bovine Practitioner*, v.36, 41-54, 2002.

RUIZ, A. K.; PONCE, P.; GOMES, G.; MOTA, R. A.; SAMPAIO, E.; LUCENA, E. R.; BENONE, S. Prevalencia de mastitis bovina subclínica y microorganismos asociados: comparación entre ordeño manual y mecánico, en Pernambuco, Brasil. **Revista de Salud Animal**, La Habana, v. 33, n. 1, p. 57-64, 2011.

RYAN, K., & RAY, G. **The bacterial cell**. em McGraw-Hill (Eds.), Sherris - Medical Microbiology: An Introduction to Infectious Diseases (4ª ed., pp. 9 - 75), Nova Iorque. (s.d.).

SAAB A.B., ZAMPROGNA T.O., LUCAS T.M., MARTINI K.C., MELLO P.L., SILVA A.V. & MARTINS L.A. Prevalence and etiology of bovine mastitis in the Nova Tebas, Parana. **Semina: Ciênc. Agrarias**, Londrina, v. 35, n. 1, 835-844, Abr. 2014.

SEEGERS, H.; FOURICHON, C.; BEAUDEAU, F. **Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds.** *Vet. Res.*, 34:475-491, 2003.

SEARS PM; McCARTHY KK. Management and treatment of staphylococcal mastitis. **Vet Clin Food Anim**, v.19, p. 171-185, 2003.

SMITH K.L. Mastitis control: a discussion. **J. Dairy Sci.** v. 66, 1790-1794, 1983.

SOUTO L.I.M., MINAGAWA C.Y., TELLES E.O., GARBUGLIO M.A., AMAKU M., MELVILLE P.A., DIAS R.A., SAKATA S.T. & BENITES N.R. Correlation between mastitis occurrence and the count of microorganisms in bulk raw milk of bovine dairy herds in four selective culture media. **Journal of Dairy Research**, São Paulo, n. 77, 63-70, Nov. 2010.

STROMMINGER, B.; KETTLITZ, C.; WERNER, G.; WITTE, W. Multiplex PCR Assay for Simultaneous Detection of Nine Clinically Relevant Antibiotic Resistance Genes in *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Microbiol.**, Wernigerode, Germany, v. 41, n. 9, 4089–4094, Set. 2003.

TODAR, K. (s.d.). **Bacterial Resistance to Antibiotics** **Todar's Online Textbook of Bacteriology.** Disponível em <http://textbookofbacteriology.net/resantimicrobial_3.html>. Acesso em: 15 jan 2016.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia.** 10 ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 967p.

TRZCINSKI K, COOPER BS, HRYNIEWICZ W, DOWSON CG. Expression of resistance to tetracyclines in strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 45, n. 6, 763–770. Jun. 2000.

VANNUFFEL P, GIGI J, EZZEDINE H, VANDERCAM B, DELMEE M, WAUTERS G, GALA JL. Especific detection of methicillin-resistant *Staphylococcus* species by multiplex PCR. **J Clin Microbiol.**, v. 33, n. 11, 2864-7. 1995

VEIGA, C.L. da. **Os antibióticos na prática clínica** - Lisboa :Infecon, 1984. - 204 p.

VESTERHOLM-NIELSEN, M.; LARSEN, M. Ø.; OLSEN, J. E.; AARESTRUP, FRANK MØLLER. Occurrence of the *blaZ* gene in penicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Denmark. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 40, n. 3, 279-286, 1999.

VISSIOA, C; AGÜEROA, DA; RASPANTIB, CG; ODIERNOB, LM; LARRIESTRAA, AJ. Pérdidas productivas y económicas diarias ocasionadas por la mastitis y erogaciones

derivadas de su control en establecimientos lecheros de Córdoba, Argentina. **Arch Med Vet**, v. 47, n. 1, 7-14, Jun. 2015

ZHOU Y., REN Y., FAN C., SHAO H., ZHANG Z., MAO W., WEI C., NI H., ZHU Z., HOU X., PIAO F. & CUI Y. Survey of mycotic mastitis in dairy cows from Heilongjiang Province, China. **Trop. Anim. Health Proc.**, Heilongjiang Province, n. 45, 1709-1714, Mai. 2013.

ZSCHÖCK, M; MANHOLD-MAURER, S.; WESCHER, A.; MERL, K.; KHAN, I.; LÄMMLER, C. Evaluation of tRNA intergenic spacer length polymorphism analysis as a molecular method for species identification of streptococcal isolates from bovine mastitis. **J.Dairy Sci.**, v. 72, 333- 337, Nov. 2005.