

FENÓTIPO MLSB EM *STAPHYLOCOCCUS NÃO-AUREUS* ISOLADOS EM LEITE DE VACAS COM MASTITE SUBCLÍNICA

TAVARES, A.M.F.¹; OLIVEIRA, L.F.¹; AMORIM, M.J.R.¹; SANTOS, F.G.²; MATOS, A.F.³; ALMEIDA, A.C.⁴

¹Mestrando(a) do Programa de Pós Graduação em Produção Animal da UFMG – *Campus* Montes Claros; ²Doutoranda do Programa de Pós Graduação em Produção Vegetal da UFMG – *Campus* Montes Claros; ³Zootecnista graduado pela UFMG – *Campus* Montes Claros; ⁴Docente da UFMG – *Campus* Montes Claros.

Introdução

A resistência antimicrobiana é uma preocupação crescente na medicina humana e veterinária, comprometendo a eficácia terapêutica e favorecendo a disseminação de cepas resistentes. No gênero *Staphylococcus*, diferentes mecanismos conferem resistência aos antimicrobianos, como bombas de efluxo, modificações no alvo ribossomal e inativação enzimática. Dentre os perfis de resistência mais relevantes, destaca-se o fenótipo MLSb (macrolídeo-lincosamida-estreptogramina B), que confere resistência cruzada a diferentes classes de antimicrobianos e está associado, principalmente, à presença dos genes *erm*, responsáveis pela produção de metilases que impedem a ligação do antibiótico ao ribossomo bacteriano (Al-Amara, 2022).

Esse fenótipo pode se expressar de forma constitutiva (cMLSb) ou induzível (iMLSb), sendo que, neste último caso, a resistência é ativada na presença de macrolídeos, como a eritromicina. A detecção do iMLSb é fundamental, uma vez que a clindamicina pode aparentar eficácia nos testes de suscetibilidade *in vitro*, mas falhar clinicamente se a resistência for induzida. Para isso, utiliza-se o teste D (D-test), um método fenotípico simples, porém essencial para evitar falhas terapêuticas (Pokhrel *et al.*, 2024).

Staphylococcus não-aureus (SNA), embora menos virulentos que *Staphylococcus aureus*, são frequentemente associados à mastite bovina subclínica e crônica, resultando em perdas econômicas e redução da qualidade do leite. A exposição frequente a antimicrobianos na rotina da pecuária leiteira favorece a seleção de cepas resistentes, incluindo aquelas com o fenótipo MLSb (De Buck *et al.*, 2021). Diante disso, o presente estudo teve como objetivo verificar, por meio do D-teste, a presença do fenótipo MLSb em cepas de *Staphylococcus não-aureus* isoladas de casos de mastite bovina.

Material e Métodos

Isolados bacterianos

Foram utilizados 15 isolados de *Staphylococcus não-aureus* (SNA), previamente identificados por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight), provenientes do Laboratório de Saúde Animal do Instituto de Ciências Agrárias da UFMG. Esses isolados foram obtidos a partir de amostras de leite de vacas com diagnóstico de mastite subclínica, coletadas em estudos anteriores. As culturas bacterianas, armazenadas sob criopreservação, foram inicialmente reativadas em caldo BHI (Brain Heart Infusion) e posteriormente semeadas em placas de Ágar PCA (Plate Count Agar) por meio da

técnica de estrias. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas, visando o crescimento e o isolamento das colônias bacterianas.

Deteção fenotípica de MLSb

O teste D foi realizado conforme as normas estabelecidas pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2024), com adaptações. Para sua execução, preparou-se uma suspensão bacteriana padronizada, equivalente ao padrão 0,5 McFarland, em solução salina estéril. A suspensão foi semeada por espalhamento uniforme em uma placa de ágar Mueller-Hinton. Em seguida, dois discos antimicrobianos - um de eritromicina (15 µg) e outro de clindamicina (2 µg) - foram posicionados na superfície da placa, mantendo-se uma distância de 20 mm entre as bordas dos discos. As placas foram incubadas a 35 °C ± 2 °C, em atmosfera ambiente, por 18 horas. Após o período de incubação, procedeu-se à leitura dos halos de inibição. A presença de achatamento ou distorção em forma de “D” na zona de inibição da clindamicina, voltada para o disco de eritromicina, foi considerada indicativa de resistência induzível à clindamicina.

Resultados e Discussão

A falha terapêutica em vacas leiteiras tratadas com antibióticos do grupo macrolídeos, lincosamidas e estreptogramina B tem se tornado cada vez mais comum, principalmente devido ao surgimento de cepas resistentes que expressam o fenótipo MLSb. Essas bactérias, com destaque para espécies do gênero *Staphylococcus*, desenvolvem resistência cruzada por meio de genes *erm*, o que compromete a eficácia de diversos antimicrobianos. Em rebanhos leiteiros, a presença dessas cepas resistentes está associada a infecções mais prolongadas por mastite, aumento nos custos com tratamentos e queda na produção de leite. Além disso, a disseminação desse tipo de resistência representa um risco à saúde pública, devido ao seu potencial zoonótico. O uso responsável dos antibióticos MLSb, aliado a melhorias no manejo dos rebanhos, é fundamental para conter a propagação da resistência nas propriedades leiteiras (Karampatakis *et al.*, 2021; Mzee *et al.*, 2023).

A Tabela 1 apresenta os perfis de sensibilidade antimicrobiana de 15 cepas de estafilococos, incluindo *S. chromogenes* (12), *S. warneri* (1), *S. xylosus* (1) e *S. epidermidis* (1), com foco nos resultados frente à eritromicina (ERI), clindamicina (CLI) e ao teste de indução de resistência (D-teste). Observou-se que nenhuma das cepas analisadas apresentou resultado positivo no D-teste, o que indica ausência do fenótipo iMLSb (resistência induzível à clindamicina mediada por *erm*). Esse achado é relevante, pois reforça a ausência de resistência cruzada entre eritromicina e clindamicina via indução, com implicações clínicas importantes para o uso seguro desses antimicrobianos.

Apesar disso, 3 das 15 cepas (20%) apresentaram resistência direta à clindamicina, caracterizando o fenótipo cMLSb (resistência constitutiva ao MLSb). Esses isolados mostraram halo de inibição igual a 0 mm frente à clindamicina, confirmando a resistência expressa ao antibiótico. Em relação à eritromicina, foram observados 4 isolados (26,7%) com perfil intermediário e 2 (13,3%) com resistência completa, totalizando 40% das cepas com alguma redução na sensibilidade a esse fármaco. Esses dados sugerem a circulação de cepas com resistência parcial ou total a macrolídeos no ambiente estudado.

Do ponto de vista terapêutico, a maioria das cepas manteve sensibilidade à clindamicina (80%) e à eritromicina (60%), o que ainda pode garantir a eficácia desses antimicrobianos em casos de infecção por estafilococos coagulase-negativos. Contudo, a presença do fenótipo cMLSb e a proporção significativa de sensibilidade reduzida à eritromicina alertam para a necessidade de monitoramento constante do perfil de resistência. A utilização do D-teste, mesmo em situações com

sensibilidade aparente, continua sendo uma ferramenta essencial para a detecção precoce de fenótipos resistentes e para a escolha adequada da terapêutica antimicrobiana.

Considerações finais

Como consideração final, os dados obtidos evidenciam a importância da vigilância fenotípica da resistência antimicrobiana entre estafilococos coagulase-negativos. A ausência do fenótipo iMLSb é um achado positivo, porém a presença de cepas com resistência constitutiva à clindamicina e sensibilidade reduzida à eritromicina reforça a necessidade do D-teste como ferramenta complementar na rotina laboratorial.

Agradecimentos

Agradecemos ao Programa de Pós-Graduação em Produção Animal da Universidade Federal de Minas Gerais pelo apoio e incentivo à realização deste trabalho.

Referências

- AL-AMARA, S. S. M. Constitutive and Inducible Clindamycin Resistance Frequencies among *Staphylococcus* sp. Coagulase Negative Isolates in Al-Basrah Governorate, Iraq. **Reports of Biochemistry and Molecular Biology**, v.11, n. 1, abr. 2022.
- CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI supplement M100. Wayne, PA: CLSI, 2024.
- DE BUCK, J.; *et al.* Non-aureus *Staphylococci* and Bovine Udder Health: Current Understanding and Knowledge Gaps. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, abr. 2021.
- KARAMPATAKIS, T.; *et al.* Genetic characterization of two methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* spa type t127 strains isolated from workers in the dairy production chain in Greece. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v. 2021, jun. 2021..
- MZEE, T.; *et al.* Molecular Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolated from Raw Milk and Humans in Eastern Tanzania: Genetic Diversity and Inter-Host Transmission. **Microorganisms**, v. 11, n. 6, jun. 2023.
- POKHREL, S.; *et al.* Detection of Biofilm Production and Antibiotic Susceptibility Pattern among Clinically Isolated *Staphylococcus aureus*. **Journal of Pathogens**, v. 2024, n. 1, mai. 2024.

Tabela 1. Análise fenotípica *MLSb* em cepas de *Staphylococcus* não-aureus

ID	Micorganismo	Eritromicina		Clindamicina		D-teste
CN45b	<i>S. warneri</i>	15 mm	Intermediário	24 mm	Sensível	Negativo
CN39a	<i>S. chromogenes</i>	24 mm	Sensível	25 mm	Sensível	Negativo
C4	<i>S. chromogenes</i>	7 mm	Resistente	0 mm	Resistente	Negativo
CN13b	<i>S. chromogenes</i>	27 mm	Sensível	24 mm	Sensível	Negativo
MF2	<i>S. chromogenes</i>	23 mm	Sensível	22 mm	Sensível	Negativo
CN20a	<i>S. xylosus</i>	22 mm	Intermediário	20 mm	Sensível	Negativo
MF9	<i>S. chromogenes</i>	24 mm	Sensível	24 mm	Sensível	Negativo
C1	<i>S. chromogenes</i>	23 mm	Sensível	0 mm	Resistente	Negativo
CN48a	<i>S. chromogenes</i>	25 mm	Sensível	24 mm	Sensível	Negativo
C8	<i>S. chromogenes</i>	8 mm	Resistente	0 mm	Resistente	Negativo
BR10	<i>S. chromogenes</i>	15 mm	Intermediário	22 mm	Sensível	Negativo
C3	<i>S. chromogenes</i>	23 mm	Sensível	22 mm	Sensível	Negativo
CN45d	<i>S. chromogenes</i>	27 mm	Sensível	24 mm	Sensível	Negativo
MF1	<i>S. chromogenes</i>	22 mm	Intermediário	23 mm	Sensível	Negativo
CN47b	<i>S. epidermidis</i>	29 mm	Sensível	24 mm	Sensível	Negativo

Fonte: Autores (2025).