

**AVALIAÇÃO GENOTÍPICA E DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE DA
RESISTÊNCIA À TETRACICLINA POR *Streptococcus agalactiae*
ISOLADOS DE AMOSTRAS CLÍNICAS DE BOVINOS NA REGIÃO SUL
FLUMINENSE DO RIO DE JANEIRO.**

POUBEL, I.T.¹; CUNHA, C.M.M.²; PEREIRA, I.A.³; SOUZA, M.M.S.⁴

RESUMO: A mastite é uma inflamação da glândula mamária, que pode ser classificada em clínica ou subclínica. De acordo com o tipo de microrganismo causador da infecção, pode se classificar ainda em contagiosa, onde a principal forma de transmissão de patógenos é durante a ordenha ou ambiental, onde o período de transmissão se dá entre as ordenhas. Os *Streptococcus agalactiae* (SGB) são importantes agentes etiológicos da mastite bovina e têm ganhado destaque em estudos recentes devido ao aumento de resistência às tetraciclinas. Neste sentido, o presente estudo objetivou avaliar o perfil de suscetibilidade dos *S. agalactiae* a partir de amostras de leite provenientes de vacas positivas para o “California Mastitis Test” (CMT), assim como avaliar genotipicamente a prevalência de *S. agalactiae* isolados de mastite bovina resistentes ao antibiótico tetraciclina. A partir das 216 amostras de leite de vacas com mastite estudadas, 53 isolados obtidos foram identificados como estreptococos, e destes, 36 como *S. agalactiae*. Do total de amostras de SGB, 28 foram avaliadas quanto à suscetibilidade antimicrobiana, onde 26 (92,9%) apresentaram resistência à tetraciclina, percentual considerado significativo. Para a avaliação genotípica, foram usados os 36 isolados de SGB, onde os resultados indicam um alto grau de resistência antimicrobiana nas amostras avaliadas. Os elevados percentuais de resistência à tetraciclina apontados, sinalizam a necessidade de um melhor conhecimento relativo à expressão desta resistência. Dentre os genes para resistência à tetraciclina foi detectada uma resistência de 80,5% (29/36) e 11,1% (4/36) das amostras apresentaram perfil intermediário. E nos testes de microdiluição em caldo e diluição em ágar para predição de resistência, os isolados de mastite bovina apresentaram 61,1% (22/36) e 72,2% (26/36) de resistência respectivamente. Estudos notificaram um aumento significativo da resistência dos SGB às tetraciclinas através da aquisição de genes de resistência inseridos em transposons ou plasmídeos conjugativos. Os mecanismos de resistência à tetraciclina estão associados aos genes *tet*, ligados a alterações celulares estruturais responsáveis pelo desenvolvimento de resistência à tetraciclina. Dentre os genes investigados, foi detectada uma prevalência de 27,8% (10/36) do gene *tetO*, reafirmando achados de atuais pesquisas. Os resultados obtidos no presente estudo, permitem concluir que houve elevada taxa de resistência do *S. agalactiae* à tetraciclina e apontam para a importância do monitoramento da resistência antimicrobiana nos SGB, uma vez que a rápida disseminação de

¹ Rua Justina Bulhões, 23, ap. 402, Niterói, RJ, Cep: 24210-455 – Discente do curso de Medicina Veterinária da UFRRJ

² Rua Professor Otacílio, 112, ap. 703, Niterói, RJ, Cep: 24240-670 – Mestranda do curso de Pós-graduação em Microbiologia Veterinária da UFRRJ

³ Rua Aureliano Pimentel, 544, ap. 201, Ilha do Governador, RJ, Cep: 21931-300 – Doutoranda do curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da UFRRJ

⁴ Rua Parsis de Paula, 435, cs 32, Cep: 23890-000 – Professor Associado do Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária da UFRRJ

genes de resistência pode representar um grande desafio para o controle de infecções estreptocócicas.

1.INTRODUÇÃO

A mastite é uma inflamação da glândula mamária, que em geral, é resultante da invasão de bactérias patogênicas através do canal do teto (PEELER et al., 2003, SONDERGAARD et al., 2003, SANTOS et al., 2004). A mastite bovina a produção láctea normal pode ser reduzida em 15 a 20%, gerando significativos prejuízos econômicos. A mastite pode se apresentar na forma clínica quando são visíveis alterações no úbere, no leite ou em suas características (BRADLEY et al., 2002) ou subclínica, quando estas alterações não são visíveis (PERSSON WALLER et al., 2003). A forma mais comum e responsável pelos maiores prejuízos é a infecção subclínica. Para sua detecção é imprescindível a realização de testes, como a contagem de células somáticas (CCS), comprovação do aumento nos teores de proteínas séricas, diminuição dos teores de caseína, lactose, gordura e cálcio no leite (GIANOLA et al., 2004). Considera-se que, para cada caso de mastite clínica ocorram entre 20 e 50 casos de mastite subclínica. A mastite pode ser classificada como contagiosa ou ambiental de acordo com o tipo de microrganismo causador da infecção. A mastite contagiosa caracteriza-se por alta incidência de casos subclínicos, geralmente de longa duração e apresenta alta contagem de células somáticas (CCS). Este tipo de mastite é causado por patógenos cujo habitat preferencial é o interior da glândula mamária e a superfície da pele dos tetos. Dessa forma, o principal momento de transmissão ocorre durante a ordenha (SVILAND; WAAGE, 2002). Já a mastite ambiental, ocorre durante o período entre as ordenhas (ESSLEMONT; KOSSAIBATI, 2002). Dentre os estreptococos, os mais importantes causadores de mastite são o *Streptococcus agalactiae*, *S. dysgalactiae* e *S. uberis*. (HOLTENIUS, 2004). Os *Streptococcus agalactiae* do grupo B (SGB) são reconhecidos como importantes agentes etiológicos da mastite e podem permanecer por longos períodos na glândula mamária do animal infectado, reservatório em potencial da infecção para o rebanho (DUARTE et al., 2005, BROWN et al., 1991). Esta espécie bacteriana é naturalmente suscetível a uma grande variedade de agentes antimicrobianos de uso terapêutico (DUARTE et al., 2005). No entanto, estudos notificaram um aumento significativo da resistência dos SGB às tetraciclina (GUERIN-FAUBLEE et al., 2002) através da aquisição de genes de resistência inseridos em transposons ou plasmídeos conjugativos (LE BOUGUÉNEC et al., 1988). Em bactérias do gênero *Streptococcus* spp. já foram descritos os mecanismos de resistência à tetraciclina associada aos genes *tet*. Dentre estes, os genes *tetK*, *tetL*, *tetM* e *tetO* têm sido associados a alterações celulares estruturais responsáveis pelo desenvolvimento de resistência à tetraciclina. O presente estudo objetivou avaliar o perfil de suscetibilidade de *S. agalactiae* a partir de amostras de leite provenientes de vacas positivas para o “California Mastitis Test” (CMT) de forma a contribuir no diagnóstico da doença e estabelecer o monitoramento da resistência aos antimicrobianos deste agente no rebanho leiteiro. Outro objetivo foi avaliar genotipicamente a prevalência de *S. agalactiae* isolados de mastite bovina resistentes ao antibiótico tetraciclina, de forma a gerar dados para a melhor compreensão destes mecanismos de resistência.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Teste fenotípicos para identificação dos isolados:

As coletas foram realizadas em trinta propriedades leiteiras situadas no Estado do Rio de Janeiro. As amostras de leite foram coletadas dos quartos mamários que apresentaram resultado positivo para mastite no CMT. Foram obtidas imediatamente antes da ordenha e após antissepsia das tetas com álcool a 70%. Os três primeiros jatos de leite foram desprezados e posteriormente uma alíquota foi colhida diretamente em frascos estéreis, mantidos sob refrigeração e encaminhados imediatamente ao Laboratório de Bacteriologia da UFRRJ para processamento. As amostras foram submetidas ao isolamento em ágar sangue (5% de sangue de carneiro) e em ágar sangue associado à azida sódica. As placas foram incubadas a 37°C por 24-48 horas em microaerofilia, utilizando a jarra de anaerobiose e posteriormente observadas as características morfológicas das colônias e as respectivas hemólises em ágar sangue. Os isolados foram submetidos à coloração pelo método de Gram, para confirmação das suas características morfotintoriais, prova da catalase, teste de CAMP, hidrólise do hipurato de sódio (1%) e esculina, resistência à bacitracina e reação com antisoro específico do grupo B de Lancefield. As espécies foram identificadas segundo metodologia proposta por Koneman et al., 2001.

Teste de CAMP: É uma prova de triagem baseada na detecção do fator CAMP, substância que potencializa a ação lítica da beta-hemolisina de *Staphylococcus aureus* sobre hemácias de carneiro.

Hidrólise do hipurato de sódio: Prova de fechamento de diagnóstico que caracteriza estreptococos beta-hemolíticos dos grupos A, B e D, respectivamente representados por *Streptococcus pyogenes*, *S. agalactiae* e *Enterococcus* spp. e *S. bovis*.

Hidrólise da esculina: Prova para fechamento de diagnóstico que revela a capacidade do microrganismo de hidrolisar a esculina na presença de bile.

Resistência à bacitracina: Prova de triagem feita em ágar Mueller Hinton, onde deposita-se 100microlitros da amostra a ser testada (com uma ponteira automática) no ágar citado, e faz-se o uso da alça de Drigalski para homogeneizar a solução no meio. Deve-se lembrar sempre da condição de microaerofilia exigida pelos estreptococos.

Reação com antisoro específico do grupo B de Lancefield: É um método sorológico de classificação, baseada no carboidrato C, um polissacarídeo antígeno-específico da parede celular de determinadas bactérias, que forma a base do grupamento sorológico.

Além destes testes foi realizado o teste de suscetibilidade a antimicrobianos pelo método de disco difusão em ágar, rotineiramente usado para determinar a sensibilidade de microrganismos patogênicos a antibióticos (CLSI, 2005). Foram utilizados discos de ampicilina (10µg), cefotaxima (30µg), clindamicina (2µg), eritromicina (15µg), gentamicina (10µg) e tetraciclina (30µg). Neste método, um disco de papel impregnado com uma quantidade conhecida de agente antimicrobiano é colocado na superfície de meio de cultura sólido apropriado, contido numa placa de Petri e previamente inoculado com o microrganismo a testar, para que se observe o valor da concentração inibitória mínima (CIM) do agente antimicrobiano. Durante a incubação da placa de Petri a uma temperatura adequada para o crescimento do microrganismo teste, o

agente antimicrobiano sofre difusão do disco de papel para o meio sólido e o valor CIM é atingido. Um halo de inibição é formado em volta do disco, onde não crescem colônias do microrganismo. Após 24-48 h de incubação é medido o diâmetro do halo de inibição formado à volta do disco.

2.2. Testes genotípicos para detecção de resistência à tetraciclina:

Nas últimas décadas, o desenvolvimento e o uso extensivo da técnica de PCR (“Polimerase Chain Reaction”) tem sido aplicada para a detecção de genes de resistência antimicrobiana e de virulência. A técnica de PCR foi aplicada a para detectar os seguintes genes de resistência a esse antibiótico: *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)* e *tet(O)*. Para a extração de DNA as suspensões bacterianas foram submetidas à fervura por 5 min (DUARTE et al., 2005). Para a amplificação dos oligonucleotídeos, as misturas finais de reações foram preparadas em volumes de 50µL, de forma a conter 20mM de Tris-HCl (pH 8.4), 50mM de KCl, 3mM de MgCl₂, 0.2mM de dNTP cada nucleotídeo, 0.5 µM de cada primer, 2.5 U de Taq polimerase e 5µl de extrato de DNA. Os ciclos e as seqüências de nucleotídeos usadas na reação de PCR estão apresentados no quadro 1.

Quadro 1. Ciclos e seqüências de nucleotídeos usados na reação de PCR:

Genes	Primer 1 (5'-3')	Primer 2 (3' -5')	Programa ^a
<i>tet(K)</i>	TAT TTT GGC TTT GTA TTC TTT CAT	GCT ATA CCT GTT CCC TCT GAT AA	1
<i>tet(L)</i>	ATA AAT TGT TTC GGG TCG GTA AT	AAC CAG CCA ACT AAT GAC AAT GAT	1
<i>tet(M)</i>	AGT TTT AGC TCA TGT TGA TG	TCC GCA TAT TTA GAC GAC GG	1
<i>tet(O)</i>	AGC GTC AAA GGG GAA TCA CTA TCC	CGG CGG GGT TGG CAA ATA	2

^a 1=35×(93°C- 1 min, 50°C- 1min, 72°C- 1min); 2=35×(93°C- 1 min, 55°C- 1min, 72°C- 5min).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram recebidas no laboratório de bacteriologia da UFRRJ, 216 amostras de leite de vacas com mastite clínica e subclínica de diferentes propriedades. Dentre os isolados, 53 amostras foram identificadas como estreptococos pertencentes aos grupos B, C, D e G, dentre eles, *Streptococcus agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. bovis*, *Enterococcus* spp. e *S. uberis*. Foram obtidos 36 isolados de *S. agalactiae*. Destes, 28 isolados foram avaliados quanto à suscetibilidade antimicrobiana, tendo sido detectado 100% de sensibilidade a cefotaxima e alto percentual de sensibilidade a ampicilina corroborando com outros autores (DUARTE et al., 2005) que obtiveram percentual de sensibilidade semelhante. Contudo, 26 (92,9%) apresentaram resistência à tetraciclina. Este percentual é considerado significativo em comparação aos dados de Duarte et al., 2005; Fernandez et al., 1998. Um total de 15 (53%) isolados foi resistente a gentamicina, 7 (25%) a clindamicina e 4 (14,2%) a eritromicina, respectivamente. Os elevados percentuais de resistência à tetraciclina apontados, sinalizam a necessidade de um melhor conhecimento relativo à expressão desta resistência. Nas últimas duas décadas, vários

estudos, envolvendo a avaliação da suscetibilidade a antimicrobianos de amostras de *S. agalactiae* isoladas de infecções em animais, notificaram um aumento significativo da resistência às tetraciclinas (GUERIN-FAUBLEE et al., 2002). Diversos métodos moleculares têm sido empregados para investigar a relação genética entre cepas de *Streptococcus* spp. obtidos em diferentes regiões geográficas. No presente trabalho, foi utilizado um total de 36 isolados de *S. agalactiae* para a avaliação genotípica, onde os resultados indicam elevada resistência antimicrobiana nas amostras estudadas, ratificando os achados de Bassegio et al. (1997) em fazendas brasileiras. Em bactérias do gênero *Streptococcus*, já foram descritos os mecanismos de resistência à tetraciclina associada aos genes *tet*. Dentre os genes para resistência à tetraciclina foi detectada uma resistência de 80,5% (29/36) e 11,1% (4/36) de amostras apresentaram perfil intermediário. O CLSI (2005) preconiza a utilização dos testes de microdiluição em caldo e diluição em ágar para predição de resistência e estabelece limites de CIM para a tetraciclina. Os isolados de mastite bovina apresentaram 61,1% (22/36) e 72,2% (26/36) de resistência nos respectivos testes. Dentre os genes investigados, foi detectada uma prevalência de 13,8% (5/36) do gene *tetM* nos isolados. Os genes *tetK* e *tetL* não foram prevalentes dentre os isolados avaliados. O gene *tetO* apresentou uma prevalência de 27,8% (10/36) reafirmando atuais pesquisas, que relatam maior prevalência deste gene nos isolados animais (DUARTE et al., 2005).

4. CONCLUSÃO

Streptococcus agalactiae é um dos microrganismos mais importantes causadores de mastite bovina, sendo poucos os dados referentes a este estreptococo no Brasil, o que limita o monitoramento da evolução de sua resistência frente aos antimicrobianos, principalmente à tetraciclina. Os resultados obtidos no presente estudo, permitem concluir que houve elevada taxa de resistência do *S. agalactiae* à tetraciclina e apontam para a importância do monitoramento da resistência antimicrobiana nos SGB, uma vez que a rápida disseminação de genes de resistência pode representar um grande desafio para o controle de infecções estreptocócicas. Neste sentido, estudos se fazem necessários para obtenção de maiores informações sobre o perfil de suscetibilidade, concentração mínima inibitória e técnicas moleculares que permitam a obtenção de dados que venham a contribuir, para uma melhor definição de estratégias de controle e prevenção de infecções.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BASSEGIO, N.; MANSELL, P.D.; BROWNING, J.W.; BROWNING, G.F. Strain differentiation of isolates of streptococci from bovine mastitis by pulsed-field gel electrophoresis. **Mol. Cell. Prob.** v.11, p. 349-354, 1997.
- BRADLEY, A. Bovine mastitis: an evolving disease. **Vet. J.** v.164, p. 116-128, 2002.
- BROWN, M.B.; ROBERTS, M.C. **Vet. Microbiol.**, v.29, p. 173-180, 1991.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance standards for antimicrobial disks susceptibility tests. Approved Standards. CLSI document M2-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa, 2005.

DUARTE, R.S.; BELLEI, B.C.; MIRAND; O. P.; BRITO, M.A.; TEIXEIRA, L.M. Distribution of antimicrobial resistance and virulence-related genes among Brazilian group B streptococci recovered from bovine and human sources. **Antimicrobial Agents Chemother**, v.49, p.97-103, 2005.

ESSLEMONT, D.; KOSSAIBATI, M. Mastitis: how to get out of the dark ages. **Vet. J.** v. 164, p. 85-86, 2002.

FERNADEZ, M.; HICKMAN, M. E.; BAKER, C. J. Antimicrobial susceptibilities of group B streptococci isolated between 1992 and 1996 from patients with bacteremia or meningitis. **Antimicrobial Agents Chemother**, v. 42, p. 1517-1519, 1998.

GIANOLA, D.; HERINGSTAD, B.; KLEMETSDAL, G.; CHANG, Y. M. Longitudinal analysis of clinical mastitis at different stages of lactation in Norwegian cattle. **Livest. Prod. Sci.** v. 88, p. 251-261, 2004.

GUERIN-FAUBLEE, V.; TARDY, F.; BOUVERON, C.; CARRET, G. **Int. J. Antimicrobial Agents Chemother**, v.19, p. 219–226, 2002.

HOLTENIUS, K.; PERSSON WALLER, K.; ESSEN-GUSTAVSSON, B.; HOLTENIUS, P.; HALLEN SANDGREN, C. Metabolic parameters and blood leukocyte profiles in cows from herds with high or low mastitis incidence. **Vet. J.** v. 168, p. 65-73, 2004.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, JR. **Diagnóstico Microbiológico**, 5.ed. Rio de Janeiro: Editora MEDSI, 2001.

LE BOUGUÉNEC, C.; CESPÉDÈS, G.; HORAUD, T. **J. Bacteriol.**, v.170, p.3930–3936, 1988.

PEELER, E.J.; GREEN, M.J.; FITZPATRICK, J.L.; GREEN, L.E. The association between quarter somatic-cell counts and clinical mastitis in three British dairy herds. **Prev. Vet. Med.** v. 59, p. 169-180, 2003.

PERSSON WALLER, K.; COLDITZ, I.G.; LUN, S.; OSTENSSON, K. Cytokines in mammary lymph and milk during endotoxin-induced bovine mastitis. **Res. Vet. Sci.** v. 75, p. 247-155, 2003.

SANTOS, J. E. P.; CERRI, R.L.; BALLOU, M.A.; HIGGINBOTHAM, G.E.; KIRK, J.H. Effect of timing of first clinical mastitis occurrence on lactational and reproductive performance of Holstein dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 80, p. 31-45, 2004.

SONDERGAARD, E.; SORENSEN, M.K.; MAO, I.L.; JENSEN, J. Genetic parameters of production, feed intake, body weight, body composition, and udder health in lactating dairy cows. **Livest. Prod. Sci.** v. 7, p. 23-34, 2002.

SVILAND, S.; WAAGE, S. Clinical bovine mastitis in Norway. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 54, p. 65-78. 2002.

VILELA, D.; LEITE, J.L.B.; RESENDE, J.C. Políticas para o leite no Brasil: passado presente e futuro. In: Santos, G. T.; Jobim, C. C.; Damasceno, J. C. Sul-Leite Simpósio sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil, **Anais**, Maringá, UEM/CCA/DZO-NUPEL, 2002.