



**JULIANA ROSA DA SILVA**

**AVALIAÇÃO DA VIRULÊNCIA E  
SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS  
EM *Streptococcus agalactiae* ISOLADOS DE  
MASTITE BOVINA DE REBANHOS  
BRASILEIROS**

**LAVRAS - MG**

**2015**

**JULIANA ROSA DA SILVA**

**AVALIAÇÃO DA VIRULÊNCIA E SUSCEPTIBILIDADE A  
ANTIMICROBIANOS EM *Streptococcus agalactiae* ISOLADOS DE  
MASTITE BOVINA DE REBANHOS BRASILEIROS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Geraldo Márcio da Costa

Coorientadora

Dra. Glei dos Anjos de Carvalho e Castro

**LAVRAS - MG**

**2015**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Silva, Juliana Rosa da.

Avaliação da virulência e susceptibilidade a antimicrobianos em  
*Streptococcus agalactiae* isolados de mastite bovina de rebanhos  
brasileiros / Juliana Rosa da Silva. – Lavras : UFLA, 2015.  
82 p.

Dissertação (mestrado acadêmico)–Universidade Federal de  
Lavras, 2015.

Orientador: Geraldo Márcio da Costa.

Bibliografia.

1. *S agalactiae*. 2. Mastite. 3. Resistência antimicrobiana. 4.  
Virulência. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

**JULIANA ROSA DA SILVA**

**AVALIAÇÃO DA VIRULÊNCIA E SUSCEPTIBILIDADE A  
ANTIMICROBIANOS EM *Streptococcus agalactiae* ISOLADOS DE  
MASTITE BOVINA DE REBANHOS BRASILEIROS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 27 de fevereiro de 2015.

Dra. Glei dos Anjos de Carvalho e Castro	UFLA
Dra. Elizângela Guedes	UFLA
Dr. João Batista Ribeiro	EMBRAPA

Dr. Geraldo Márcio da Costa  
Orientador

**LAVRAS - MG**

**2015**

*Aos meus pais por estarem sempre ao meu lado e por acreditarem em mim*

DEDICO!

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar, permitindo a conclusão de mais esta etapa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – UFLA pela oportunidade de realizar este curso.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida e pelo financiamento ao projeto.

Ao meu orientador Dr. Geraldo Márcio, pela orientação, paciência, conselhos e tantos ensinamentos transmitidos durante todo nosso convívio.

À minha coorientadora Dra. Gleí, por ser amiga e paciente me ensinando e ajudando de uma forma inexplicável durante todas as etapas deste trabalho.

Ao Dr. João Batista e a Dra Elizângela, pela colaboração como membros da banca avaliadora da dissertação.

À Dircéia, pela enorme ajuda na execução do trabalho no laboratório, pela amizade e pelos muitos conselhos que sempre chegavam na hora certa.

À Maysa e a Thairine, alunas de Iniciação Científica, pelo apoio e empenho na execução do experimento.

À Natália, Michele, Camila, Jonata, Marina e demais colegas da Pós-graduação, pelas experiências trocadas ao longo do curso.

À minha prima Priscila, pela enorme amizade e pela companhia nas temerosas idas à noite ao laboratório.

Aos meus pais e as minhas irmãs, que sempre me apoiaram em todas as minhas decisões e torcem pelo meu sucesso.

Aos meus sobrinhos, Hugo e Duda, por encherem meus dias de alegria.

Ao meu namorado Tales, pelo amor, paciência, carinho e compreensão, sempre entendendo a falta de tempo e não medindo esforços para me ajudar.

“O sucesso nasce do querer. Sempre que o homem aplicar a determinação e a persistência para um objetivo, ele vencerá os obstáculos, e se não atingir o alvo, pelo menos fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

## RESUMO

*Streptococcus agalactiae* é um dos principais agentes causadores de mastite em bovinos e de consequentes perdas econômicas aos produtores. Estudos que avaliaram a virulência e a susceptibilidade a antimicrobianos desse agente em amostras de bovinos do Brasil são limitados. Este trabalho teve por objetivo avaliar a frequência dos genes de virulência *hylB*, *bca*, *bac*, *fbxA*, *fbxB*, *cfb*, *bibA*, PI-1, PI-2a e PI-2b, dos genes de resistência a antimicrobianos *ermA*, *ermB*, *mefA*, *tetO*, *tetM*, *aphA3*, *aad-6*, bem como a susceptibilidade aos antimicrobianos eritromicina, clindamicina, tetraciclina, gentamicina, penicilina, ceftiofur, cefalotina, sulfonamida e associações entre genótipos e fenótipos de resistência em 61 isolados de *S. agalactiae* provenientes de casos de mastite em rebanhos bovinos brasileiros. Foram definidos sete perfis de virulência de acordo com a frequência dos genes estudados. Os genes *cfb*, *hylB*, *fbxB* e PI-2 (PI-2a ou PI-2b) foram encontrados em todos os isolados, enquanto PI-1 foi encontrado em somente um isolado, *fbxA* em 27 (44%), *bibA* em nove (15%), *bca* em dois (3%) e *bac* não foi encontrado em nenhum dos isolados. Dentre os genes de resistência pesquisados, *ermB* foi encontrado em 12 (19,67%) isolados, *tetO* em 20 (32,78 %) e *tetM* em nove (14,75%) isolados. Os genes *ermA*, *mefA*, *aphA3* e *aad6* não foram detectados. Houve associação entre a presença dos genes *ermB*, *tetM* e *tetO* e os fenótipos de resistência à eritromicina, clindamicina e tetraciclina. Pelo teste de concentração inibitória mínima (MIC), foram encontrados diferentes índices de resistência: eritromicina com 26,23%; tetraciclina, 47,54%; gentamicina, 3,28%; sulfonamida, 98,36% e clindamicina com 29,51%, por outro lado, todos os isolados foram susceptíveis à penicilina, ceftiofur e cefalotina. Foi possível concluir que a população estudada possui determinantes de virulência diversos, porém com um núcleo comum representado pelos genes *cfb*, *hylB*, *fbxB* e PI-2 (principalmente PI-2b) e que os testes de resistência aos antimicrobianos devem auxiliar nas tomadas de decisão relacionadas aos tratamentos, pois, a resistência a vários antimicrobianos apresenta-se em altas frequências nesse patógeno.

Palavras-chave: *S. agalactiae*. Virulência. Resistência antimicrobiana. Mastite.

## ABSTRACT

*Streptococcus agalactiae* is one of the major causal agents of mastitis in cattle, which causes economic losses to cattle breeders. However, there are few studies related with evaluation of virulence and susceptibility of these antimicrobial agents toward cattle samples in Brazil, so far. In this work, we aimed to assess the frequency of virulence genes, namely, hylB, bca, bac, fbsA, fbsB, cfb, bibA, PI-1, PI-2a and PI-2b; antimicrobial agent resistance genes, namely, ermA, ermB, mefA, tetO, tetM, aphA3 and aad-6; susceptibility to antimicrobial agents such as erythromycin, clindamycin, tetracycline, gentamicin, penicillin, ceftiofur, cephalothin, sulfonamide; as well as the association between genotype and resistance phenotypes in 61 isolates of *S. agalactiae* obtained from mastitis cases in herds of Brazilian cattle. Seven virulence profiles related to gene frequencies were set. The genes cfb, hylB, fbsB and PI-2 (PI-2a or PI-2b) were found in all isolates; while PI-1 was only found in one isolate, fbsA was found in 27 isolates (44%), bibA in 9 isolates (15%), bca in two isolates (3%), and bac was found in none of the isolates. Regarding the resistance genes, ermB was found in 12 isolates (19.67%), tetO in 20 isolates (32.78%), and tetM was found in 9 isolates (14.75%). The following genes were not detected: ermA, mefA, apha3 and aad6. There was association between the presence of genes ermB, tetM and tetO, and resistance phenotypes to erythromycin, clindamycin and tetracycline. Different resistance indices were found by means of minimum inhibitory concentration test, namely for erythromycin (26.23%), tetracycline (47.54%), gentamicin (3.28%), sulfonamide (98.36%), and clindamycin (29.51%). In other hand, all isolates were susceptible to penicillin, ceftiofur and cephalothin. Then, we could state that these isolates have diverse determining factors for virulence, however, with a common core represented by genes cfb, hylB, fbsB and PI-2 (mainly PI-2b). In addition, the antimicrobial resistance tests can help in making decisions related to these treatments, because the resistance to various antimicrobial agents was found to show high relative frequency for this pathogen.

Key-words: *S. agalactiae*. Virulence. Antimicrobial resistance. Mastitis.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Iniciadores utilizados, tamanho esperado dos produtos de amplificação e suas respectivas referências para detecção dos genes de virulência em <i>S. agalactiae</i> isolados de mastite em rebanhos bovinos brasileiros.....	38
Tabela 2	Iniciadores utilizados, tamanho esperado dos produtos de amplificação e suas respectivas referências para detecção dos genes de resistência antimicrobiana em <i>S. agalactiae</i> isolados de mastite em rebanhos bovinos brasileiros.....	39
Tabela 3	Concentrações dos antibióticos ( $\mu\text{g/mL}$ ) usados no teste de Concentração Inibitória Mínima – MIC em <i>S. agalactiae</i> isolados de mastite em rebanhos bovinos brasileiros.....	41
Tabela 4	Perfis gênicos de virulência encontrados em amostras de <i>S. agalactiae</i> isolados de mastite em rebanhos bovinos brasileiros....	44
Tabela 5	Distribuição das Concentrações Inibitórias Mínimas de oito antimicrobianos em amostras de <i>S. agalactiae</i> isolados de mastite em rebanhos bovinos brasileiros .....	51
Tabela 6	Comparação dos genótipos e fenótipos de resistência a antimicrobianos encontrados em amostras de <i>S. agalactiae</i> isolados de mastite em rebanhos bovinos brasileiros.....	53

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO .....	14
2.1	Mastite bovina e importância econômica .....	14
2.2	<i>Streptococcus agalactiae</i> .....	17
2.3	Fatores de Virulência em <i>Streptococcus agalactiae</i> .....	19
2.3.1	Proteína C .....	21
2.3.2	Toxinas Formadoras de Poros .....	22
2.3.3	Adesina Bacteriana Imunogênica- BibA .....	23
2.3.4	Hialuronidase .....	24
2.3.5	Proteína ligante de fibrinogênio .....	25
2.3.6	Pili .....	26
2.3.7	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) no estudo dos fatores de virulência .....	28
2.4	Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos .....	29
2.4.1	Genes de resistência a antimicrobianos .....	31
2.4.2	Técnicas de estudo <i>in vitro</i> para avaliação da susceptibilidade aos antimicrobianos .....	33
3	OBJETIVOS .....	35
3.1	Objetivos gerais .....	35
3.2	Objetivos específicos .....	35
4	MATERIAL E MÉTODOS .....	36
4.1	Amostras estudadas .....	36
4.2	Testes moleculares .....	36
4.2.1	Extração de DNA .....	36
4.2.2	Reações de PCR .....	37
4.2.3	Eletroforese .....	40
4.3	Teste de Susceptibilidade Antimicrobiana – MIC .....	40
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	42
5.1	Virulência em <i>S. agalactiae</i> .....	42
5.2	Susceptibilidade antimicrobiana em <i>S. agalactiae</i> e genes de resistência .....	49
6	CONCLUSÕES .....	59
	REFERÊNCIAS .....	60

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o quarto maior produtor mundial de leite, atrás apenas dos Estados Unidos, Índia e China (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, FAO, 2013). Em 2011, a estimativa de vacas ordenhadas foi de 23.508.605 (cabeças) com produção de 32.296.120.000 litros de leite (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, EMBRAPA, 2012). Embora o Brasil ocupe posição de destaque na produção leiteira, doenças relevantes do ponto de vista econômico e de saúde pública ainda são importantes no cenário da pecuária leiteira nacional. A mastite ocupa lugar de destaque entre essas afecções.

A mastite é a doença infecciosa mais frequente e onerosa que afeta as explorações leiteiras em todo o mundo (KEEFE, 2012). Esta enfermidade prejudica a qualidade e reduz a produção de leite, além de levar a gastos relacionados ao tratamento, prejuízos com descarte de leite e reposição de animais cronicamente afetados (SANTOS; FONSECA, 2007). Trata-se de uma doença de cunho multifatorial em que estão envolvidos fatores ambientais, fatores inerentes aos próprios animais e infecciosos, contando com envolvimento de mais que 140 tipos diferentes de microrganismos em sua etiologia (RIBEIRO et al., 2006).

Dentre os principais patógenos causadores de mastite bovina, estão as bactérias *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Streptococcus uberis* (JAIN et al., 2012; KEEFE, 2012; RATO et al., 2013; ZADOCKS et al., 2011).

*Streptococcus agalactiae* é considerado um importante patógeno na mastite por elevar as contagens de células somáticas, reduzir qualidade e produção de leite dos rebanhos afetados (KEEFE, 2012). Na maioria das vezes, está envolvido na mastite bovina subclínica e esta forma de apresentação é a que

determina as perdas econômicas mais expressivas à cadeia produtiva do leite (SANTOS; FONSECA, 2007).

Além de agente etiológico para a mastite bovina, *S. agalactiae* tem importância na saúde pública. Em humanos, este microrganismo coloniza os tratores urogenitais e gastrointestinais podendo levar à septicemia, pneumonia e meningite neonatal, mastite em mulheres lactantes, além de altas taxas de mortalidade em adultos imunocomprometidos (ZADOCKS et al., 2011). Na piscicultura é um patógeno emergente, responsável por altas taxas de morbidade e mortalidade em casos de septicemia e meningite encefalite em peixes de água doce, marinhos e estuarinos (EVANS et al., 2002).

A capacidade deste agente de se multiplicar e colonizar diferentes hospedeiros e sítios corporais depende da expressão concatenada de genes de virulência (SAMEN et al., 2011). Desta forma, a doença causada por *S. agalactiae* ocorre somente quando há uma adequada expressão e regulação de diversos genes de virulência, possibilitando as devidas interações entre patógeno e hospedeiro (MAISEY; DORAN; NIZET, 2008).

Desde a introdução da penicilina na década de 1940, os antimicrobianos são amplamente utilizados no controle das doenças bacterianas, tanto na medicina humana quanto para a promoção da saúde e bem estar animal (BARLOW, 2011). O controle da mastite bovina tem como uma de suas principais ferramentas a intervenção terapêutica, levando a um frequente uso de antimicrobianos nas propriedades (ERKSINE; WAGNER; DEGRAVES, 2003). No entanto, a eficiência desses agentes é comprometida quando surge a resistência antimicrobiana nos patógenos, sendo esta influenciada por fatores como pressão seletiva, tipo de antimicrobiano administrado e frequência de mutação de genes de resistência nos microrganismos (SCHWARZ et al., 2001).

Embora *S. agalactiae* seja um dos principais agentes envolvidos na etiologia da mastite bovina, e que esta enfermidade, quando associada com o

referido agente, possa ter conotação de doença zoonótica e ocupacional, existem poucos estudos sobre os fatores de virulência e sobre a susceptibilidade a antimicrobianos em amostras deste agente obtidas de rebanhos brasileiros (FERREIRA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2011). Neste contexto, este trabalho teve por objetivo proporcionar melhor entendimento sobre a frequência dos fatores de virulência estudados e sobre a susceptibilidade aos antimicrobianos testados para a mastite bovina causada por *S. agalactiae* em rebanhos brasileiros, de modo a fornecer novas perspectivas em termos de estratégias de controle para o agente. Além disto, considerando-se a participação do agente em enfermidades de diversas outras espécies animais e no próprio ser humano, este estudo poderá trazer contribuições úteis para o controle das infecções ocasionadas pelo mesmo nas demais espécies susceptíveis.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Mastite bovina e importância econômica

A mastite bovina é uma afecção caracterizada pela inflamação da glândula mamária devido à invasão microbiana, principalmente por bactérias, mas também ocorre por fungos, leveduras e algas (BRADLEY, 2002; SORDILLO, 2011). É a doença mais importante dos rebanhos leiteiros em todo o mundo devido à alta incidência de casos clínicos, alta prevalência de infecções subclínicas e aos prejuízos econômicos que acarreta (HOGEVEEN; HUIJPS; LAM, 2011). São calculadas perdas na produção que podem variar de 10 a 30% por lactação, sendo que estes valores são influenciados por fatores como a gravidade da infecção, agente causador, duração da doença, idade do animal, época, estado nutricional e potencial genético (SORDILLO, 2011).

O termo mastite originou-se do grego *masto*-glândula mamária e *itis*-inflamação (PIETERSE; TODOROV, 2010) e esta afecção pode se apresentar sob a forma clínica ou subclínica. A primeira se caracteriza pela presença de sinais do fenômeno inflamatório no quarto acometido, ausentes na forma subclínica. A mastite clínica subaguda apresenta sinais clínicos discretos, caracterizados pela presença de grumos no teste Tamis, podendo evoluir ou não para formas mais graves, denominadas clínicas agudas, caracterizadas por sinais inflamatórios mais evidentes, tais como dor, calor, rubor, edema, perda de função e alterações nas características macroscópicas do leite (COSTA et al., 1998; SANTOS; FONSECA, 2007). Casos superagudos estão geralmente associados à infecção por agentes ambientais do grupo dos coliformes e se caracterizam por sinais inflamatórios muito intensos nos quartos acometidos, com a presença de sinais sistêmicos tais como febre, dispneia, hipotensão, prostração e anorexia (BURVENICH et al., 2003; HOGAN; SMITH, 2003).

Outra forma clínica relevante é a crônica, na qual podem ser observados sinais de fibrose dos quartos acometidos, em alguns casos acompanhados de atrofia glandular e presença de fístulas. *Streptococcus agalactiae* e *Staphylococcus aureus* são agentes frequentemente associados com estes casos (COSTA et al., 1998; SANTOS; FONSECA, 2007).

A forma subclínica da mastite caracteriza-se pela ausência de sinais externos de inflamação do quarto acometido, mas acarreta redução na produção do quarto afetado e alterações na composição do leite (BRITO; BRITO, 1998; COSTA et al., 1998; SANTOS; FONSECA, 2007; VEIGA, 1998;). Sob o ponto de vista econômico, é aquela que se reveste de maior significado, devido ao grande número de animais geralmente acometidos e por causar alterações físico-químicas na qualidade do leite, bem como a redução expressiva na produção dos quartos afetados (BRITO; BRITO, 1998; SANTOS; FONSECA, 2007).

A epidemiologia da mastite varia consideravelmente dependendo da espécie, dose infectante, patogenicidade e infectividade do agente envolvido e há evidências de que os fatores de risco diferem conforme essas características. A literatura relaciona o envolvimento de diversos grupos de microrganismos nas infecções intramamárias (IIM) de bovinos, mas, embora diferentes microrganismos possam estar envolvidos em sua etiologia os *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* e *Escherichia coli* são os responsáveis por cerca de 80% dos casos de IIM. Menos que 5% das infecções são causadas por *Corynebacterium bovis*, *Pseudomonas* sp., *Mycobacterium* sp., *Nocardia asteroides*, *Aspergillus* sp., *Candida* sp., *Serratia* sp. e *Prototheca* sp. (RANJAN et al., 2006).

Como mencionado anteriormente, a mastite consta como a doença infecciosa mais prevalente e economicamente relevante de bovinos leiteiros em todo o mundo, embora nas últimas décadas tenham ocorrido enormes avanços nas áreas de prevenção e controle (AARESTRUP; JENSEN, 1997; PETON;

LOIR, 2014; VINTOV et al., 2003). As perdas econômicas ocorrem devido à redução temporária ou permanente na produção de leite, descarte de leite devido ao uso de antimicrobianos, redução no preço causado pelo aumento das contagens de células somáticas (CCS), redução da vida produtiva do animal, além dos custos com tratamento e mão de obra (HILLERTON; BERRY, 2005; VIGUIER et al., 2009).

Segundo Bradley (2002), as perdas ocasionadas pela mastite na indústria leiteira mundial foram estimadas em 35 bilhões de dólares anuais. Nos Estados Unidos, o Conselho Nacional de Mastite estimou que os custos da mastite para os produtores de leite sejam da ordem de dois bilhões de dólares anuais (OLIVER; MURINDA, 2012). Bar et al. (2008) relataram que a média de custos de um caso de mastite clínica são de US\$ 179, sendo que deste valor US\$ 115 estão relacionados a perdas no rendimento, US\$ 14 devido ao aumento da mortalidade e US\$ 50 referem-se aos gastos com o tratamento. Na Europa, Halasa et al. (2009) relataram custos médios anuais com a mastite de 4.896 euros para rebanho com 100 vacas em lactação.

No Brasil, Lopes et al. (2012) estimaram que o impacto econômico anual da mastite para cada vaca em lactação é da ordem de R\$ 727,13 e R\$ 2.774,11 para frequências anuais de mastite clínica de 1 e 15% respectivamente. Levantamentos anteriores realizados por Benites et al. (1999) em propriedades leiteiras de São Paulo e Minas Gerais apontaram custos com a prevenção da mastite da ordem de US\$ 23,98 por vaca/ano, com perdas estimadas em US\$ 317,38 por vaca/ano, sendo os custos com prevenção, por propriedade, estimados em US\$ 1.558,59 e as perdas totais avaliadas em US\$ 20.611,32 no período de um ano. Em outra publicação, Costa (1998) relatou que as perdas decorrentes da doença eram da ordem de 10-15% da produção total no rebanho nacional.

## 2.2 *Streptococcus agalactiae*

O gênero *Streptococcus* abrange diversas espécies bacterianas associadas a processos infecciosos em seres humanos e animais, bem como microrganismos saprofíticos ou não patogênicos. Atualmente, são descritas 109 espécies e 22 subespécies bacterianas pertencentes a este gênero (LIST OF PROKARYOTIC NAMES, LPSN, 2015). Compreendem cocos Gram-positivos, com diâmetro de 0,5 - 2,0  $\mu\text{m}$ , organizados em pares ou cadeias lineares curtas, catalase negativos, não móveis e não formadores de esporos. Além das características fenotípicas, o tipo de hemólise e a sorotipagem baseada na composição de polissacarídeos têm sido empregadas para caracterizar as diferentes espécies de *Streptococcus* (SHEWMAKER et al., 2007).

Lancefield (1933) caracterizou os membros beta-hemolíticos do gênero *Streptococcus* em grupos sorológicos designados de A a H e de K a V. Esta classificação é baseada na composição antigênica do polissacarídeo da parede celular, denominado carboidrato C. São exceções os grupos D e N, nos quais o antígeno de parede celular detectado é o ácido lipoteicoico. Assim, a espécie *S. agalactiae* foi classificada no grupo B de Lancefield e seu carboidrato C é composto por ramnose, N-acetilgalactosamina e galactose (CURTIS; KRAUSE, 1964). As cepas do grupo B são ainda classificadas em tipos sorológicos de acordo com a composição do polissacarídeo capsular, também referido como polissacarídeo tipo específico (LANCEFIELD, 1934).

*S. agalactiae* é uma das principais espécies do gênero pelo fato de colonizar múltiplos hospedeiros e possuir diversos fatores de virulência cuja expressão permite adaptação do patógeno em diferentes sítios do corpo, incluindo aqueles que são tipicamente estéreis, como o sistema nervoso central (SAMEN et al., 2011). Segundo Hillerton et al. (2004), *S. agalactiae* é um microrganismo bem adaptado à glândula mamária de bovinos e, geralmente, está

envolvido em doenças clínicas agudas e infecções subclínicas persistentes. Embora, frequentemente, não invada o tecido glandular, pode causar fibrose e abscessos no úbere (FONSECA; SANTOS, 2000). Trata-se de um agente altamente contagioso, que causa quadros de mastite com baixa taxa de cura espontânea (KEEFE, 2012). Os animais infectados desempenham importante papel de reservatório no rebanho e a transmissão ocorre principalmente durante o período de ordenha (BAL; BAYAR; BAL, 2010).

Este patógeno destaca-se como agente causador de mastite por determinar índices elevados de casos clínicos, elevação nos escores de contagens de células somáticas (CCS) e contagem bacteriana total (CBT), acarretando em decréscimo na quantidade e qualidade do leite produzido pelo animal ou rebanho infectado (COSTA, 2008; MERL et al., 2003; ZAFALON et al., 1999). A presença de *S. agalactiae* no leite leva à degradação de suas proteínas, sendo que a caseína, que tem grande importância para a indústria láctea, pode ser degradada em até 75% gerando grandes prejuízos (ÅKERSTEDT et al., 2012).

Segundo Duarte et al. (2004), as taxas de infecção por *S. agalactiae* variam bastante entre rebanhos, verificando-se as maiores prevalências em rebanhos nos quais as medidas de controle têm sido negligenciadas. No Brasil, este agente é relacionado como um dos principais agentes etiológicos da mastite bovina com uma prevalência média estimada de 60% dos rebanhos (KEEFE, 2012). Têm sido citadas taxas de isolamento que variam entre 4,6% e 28,05% (BARBALHO; MOTA, 2001; BRANT; FIGUEIREDO, 1994; MOTA et al., 2004) citado por Costa (2008). Brito et al. (1999) relataram a ampla disseminação deste agente em rebanhos do estado de Minas Gerais, sendo isolado em 60% dentre 48 propriedades estudadas nas regiões da Zona da Mata e Campos das Vertentes. Em outros países, como Canadá, estudos apontam que cerca de 40 a 50% dos rebanhos apresentam ao menos uma vaca infectada por *S. agalactiae* (RIEKERINK et al., 2008).

Além do envolvimento na mastite bovina, *S. agalactiae*, também chamado de *Streptococcus* do Grupo B (GBS), tem sido relacionado como importante agente causal de doenças em seres humanos e outras espécies animais. Nos seres humanos, o agente é responsável por casos de pneumonia, septicemia e meningite em neonatos. Apresenta alta taxa de morbidade em gestantes e mortalidade em adultos imunocomprometidos e idosos (JOHRI et al., 2006; MAIONE et al., 2005; NAKIB et al., 2011). Na piscicultura, leva à septicemia e meningoencefalite em peixes de diferentes espécies e ambientes, gerando altas taxas de morbidade e mortalidade que culminam em altos prejuízos econômicos (BOWATER et al., 2012; EVANS et al., 2002). Esporadicamente *S. agalactiae* está associado a casos de doenças em vários outros hospedeiros como aves, camelos, cães, equinos, gatos, rãs, hamsters, camundongos, macacos, dentre outros (ELLIOT; FACKLAM; RITCHTER, 1990; GARCIA et al., 2008; JOHRI et al., 2006).

### **2.3 Fatores de Virulência em *Streptococcus agalactiae***

Os patógenos envolvidos na etiologia da mastite bovina possuem diversificados fatores de virulência que facilitam a colonização e infecção da glândula mamária. Alguns patógenos podem escapar das defesas do hospedeiro ao se aderirem às células epiteliais, pela cápsula que dificulta a captura e destruição pelos neutrófilos ou produzindo endotoxinas e exotoxinas que destroem ou inativam os leucócitos, podendo manter-se no interior das células para escapar à resposta imune do hospedeiro (BRADLEY, 2002; CARNEIRO; DOMINGUES; VAZ, 2009).

Os fatores de patogenicidade representam uma série de estratégias das quais o microrganismo se utiliza para invadir e colonizar um hospedeiro. Para infectar, *S. agalactiae* deve entrar em contato com o hospedeiro, atravessando

barreiras epiteliais (BARON; KASPER, 2005; PIETROCOLA et al., 2005). Para isto, o agente utiliza estruturas presentes em suas superfícies ou secreta produtos no ambiente circundante. Em muitos casos, é vital para a sobrevivência do microrganismo a utilização de vários mecanismos com sobreposição de funções (BARON; KASPER, 2005). Em todos os organismos vivos, a regulação da expressão gênica em resposta aos estímulos externos é realizada pelo Sistema de Transdução de Sinal (STS). O STS responde a sinais externos regulando a função dos fatores transcricionais do DNA mobilizado, sendo mais comum em bactérias o Sistema de Duplo-Componente (RAJAGOPAL, 2009). O sequenciamento do genoma de *S. agalactiae* tem revelado a presença de 17 a 20 Sistemas de Duplo Componentes, que podem responder a mudanças no ambiente externo (GLAZER et al., 2002).

A maior parte dos estudos sobre fatores de virulência de *S. agalactiae* se refere a isolados associados com infecções em seres humanos e peixes, sendo poucos os estudos sobre o tema para amostras obtidas de bovinos. Em peixes, Pereira et al. (2010) demonstraram que as amostras isoladas desses animais apresentaram padrão genético distinto das isoladas de seres humanos e bovinos. Apesar desta diferença genotípica, estes autores demonstraram em condições experimentais, que amostras isoladas de seres humanos e de bovinos foram capazes de infectar alevinos de tilápia do Nilo. Esses dados sugerem que isolados de diferentes animais podem compartilhar fatores de virulência e mecanismos de invasão comuns envolvidos na patogênese das infecções.

Entre os principais fatores de virulência já estudados para *S. agalactiae* associados com a infecção em seres humanos há destaque para a  $\beta$  hemolisina/citolisina que promove a entrada do patógeno na célula, facilitando a sobrevivência e disseminação sistêmica com lise celular e falência de órgãos vitais, C5a peptidase que impede o recrutamento de neutrófilos e promove adesão celular, serina protease que inibe a cascata de coagulação, proteínas

ligantes de penicilina (PBP1a) que conferem resistência aos peptídeos catiônicos antimicrobianos, adesina bacteriana imunogênica (BibA) que promove aderência às células hospedeiras e inibe o sistema complemento, pili que promove a resistência aos peptídeos catiônicos antimicrobianos, assim como aderência à célula hospedeira (RAJAGOPAL, 2009).

### 2.3.1 Proteína C

A proteína C foi o primeiro antígeno de superfície identificado em *S. agalactiae*. Sendo composto por duas subunidades não relacionadas entre si, denominadas proteínas  $\alpha$  e  $\beta$ , codificadas pelos genes *bca* e *bac*, respectivamente (LINDAHL; STALHAMMAR-CARLEMALM; ARESCHOUG, 2005). Isolados de *S. agalactiae* podem expressar uma, ambas as subunidades ou ainda nenhuma delas (BROKER; SPELLERBERG, 2004). A importância do antígeno C como fator de virulência em *S. agalactiae* ainda é controversa devido ao pequeno ou nulo efeito em ensaios de invasão, porém, os componentes dessa proteína são alvos para a produção de anticorpos (LINDAHL; STALHAMMAR-CARLEMALM; ARESCHOUG, 2005).

A proteína  $\alpha$  é o protótipo de uma família de proteínas estreptocócicas caracterizada pela presença de um domínio amino-terminal conservado, longos elementos repetidos em *tandem* e domínio carboxi-terminal conservado (LACHENAUER et al., 2000; WASTFELT et al., 1997). A presença de unidades repetidas, verificada entre as cepas clínicas, é associada à variabilidade genética e fenotípica por originar locais de rearranjo gênico, promovendo diversidade antigênica e variação no peso molecular da proteína final (GRAVEKAMP; ROSNER; MADOFF, 1998). A deleção do gene *bca* atenuou a virulência de *S. agalactiae* em camundongos neonatos (LI et al., 1997).

Adicionalmente, a perda da expressão da proteína  $\alpha$  foi associada à redução na invasão de células epiteliais cervicais (ME180) (BOLDUC et al., 2002).

A proteína  $\beta$ , também referida como Bac ou proteína ligadora de IgA encontra-se localizada na superfície da célula bacteriana (BERNER et al., 2002; JARVA et al., 2003). Diferentemente da proteína  $\alpha$ , a  $\beta$  não contém repetições longas, mas a região carboxi-terminal possui uma sequência rica em prolina, também referida como região XPZ, em alusão aos três resíduos que se repetem periodicamente, arranjada em *tandem*, que resulta em alteração no número de unidades repetitivas e resultam em acentuado polimorfismo genético (BERNER et al., 2002). A sua exposição na superfície celular e o conhecimento prévio de que regiões ricas em prolina comumente participam de interações proteína-proteína sugerem que a região XPZ possa promover interações com proteínas do hospedeiro ou com outras proteínas presentes em superfícies bacterianas (ARESCOUG et al., 2002; WILLIAMSON, 1994). A região amino-terminal possui um sítio de ligação à IgA sérica, mas não à IgA secretória, presente em mucosas (JARVA et al., 2003). A ligação de IgA à superfície bacteriana poderia resultar no bloqueio para deposição de outros anticorpos opsonizantes e complemento, na inibição da fagocitose e outros mecanismos de defesa do hospedeiro e no mascaramento de outros antígenos, desta forma a proteína Bac atuaria na evasão da resposta imune do hospedeiro (MADOFF et al., 1994; MICHEL et al., 1991).

### 2.3.2 Toxinas Formadoras de Poros

*S. agalactiae* apresenta no seu genoma pelo menos dois genes que codificam toxinas formadoras de poros, conhecidas como Beta-hemolisina/citolisina (Beta-H/C) e *Christie Atkins Munch Peterson*, mais conhecida como fator CAMP. Essas toxinas promovem a entrada de patógenos

nas células hospedeiras, facilitam a sobrevivência intracelular e a disseminação sistêmica do agente (RAJAGOPAL, 2009).

A Beta-H/C é uma proteína de superfície que promove a invasão do *S. agalactiae* nas células hospedeiras, permitindo que este atravesse barreiras como as células epiteliais e endoteliais e, inclusive, a barreira hematoencefálica (DORAN; LIU; NIZET, 2003; GIBSON; NIZET; RUBENS, 1999; NIZET, 2002). Além disso, podem induzir à apoptose, liberar citosinas relacionadas com a invasão celular e resistência à fagocitose (DORAN; NIZET, 2004; NIZET, 2002). O fator CAMP tem sido relatado como importante para a patogênese de *S. agalactiae* (LANG; PALMER, 2003; JURGENS; STERZIK; FEHRENBACH, 1987). Esta proteína promove a formação de poros nas membranas das células do hospedeiro, além de se ligar à porção Fc de IgG e IgM, impedindo a ação destes anticorpos (DORAN; NIZET, 2004; LANG; PALMER, 2003).

### **2.3.3 Adesina Bacteriana Imunogênica- BibA**

Após o sequenciamento genômico de *S. agalactiae* foi identificada uma adesina bacteriana imunogênica com atividade antifagocítica, denominada BibA (“*group B Streptococcus Immunogenic Bacterial Adhesin*”). Esta adesina facilita a aderência bacteriana às células epiteliais do hospedeiro, se liga à proteína ligadora de C4 (*C4-binding protein*) e é expressa na superfície celular (SANTI et al., 2007). BibA é codificada por um dos alelos do gene gbs2018, até o momento seis alelos já foram descritos. Existe uma adaptação deste alelo ao hospedeiro, sendo que, o alelo 5 por exemplo, é encontrado somente em isolados de bovinos e o alelo 6 foi identificado em um isolado de truta (BROCHET et al., 2006; SPRINGMAN et al., 2009).

A deleção do gene *bibA* foi associada à redução da virulência de *S. agalactiae* em modelo de infecção em camundongos e ao aumento da fagocitose por neutrófilos humanos. Adicionalmente, a deleção desse gene causa redução na adesão a culturas de células epiteliais cervicais (ME180) e pulmonares (A549). É colocado que BibA seria uma proteína multifuncional envolvida na resistência à ação microbicida fagocítica e na adesão a células do hospedeiro (SANTI et al., 2007).

### 2.3.4 Hialuronidase

Uma proteína também importante para a patogênese do *S. agalactiae* é a hialuronidase (HylB) codificada pelo gene *hylB* (GASE; OZEGOWSKI; MALKE, 1998). Ela pertence a um grupo especial de enzimas, as hialuronidasas, responsáveis pela degradação de polissacarídeos, principalmente a N-acetilglicosamina, que compõe o ácido hialurônico (AKHTAR; KRISHNAN; BHAKUNI, 2006). Esta proteína está presente no genoma de vários microrganismos Gram-positivos como várias espécies de *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium*, *Streptomyces* e *Clostridium*. Em microrganismos Gram-negativos, as hialuronidasas são encontradas nas regiões periplasmáticas ao invés de serem excretadas para o meio extracelular e, por este motivo, apresentam pouca importância na patogênese (HYNES; WALTON, 2000).

O ácido hialurônico participa na composição de tecidos do organismo, tais como pele, líquido sinovial e humor vítreo, estando associado ao preenchimento de espaços entre as células, viscosidade e hidratação. A enzima hialuronidase pode clivá-lo, assim como pode clivar a condroitina e sulfatos de condroitina (AKHTAR; KRISHNAN; BHAKUNI, 2006; LI; JEDRZEJAS, 2001). Desta forma a hialuronidase facilitaria a difusão do *S. agalactiae* durante

a infecção (AKHTAR; KRISHNAN; BHAKUNI, 2006; LIU; NIZET, 2004; RAJAGOPAL, 2009).

### **2.3.5 Proteína ligante de fibrinogênio**

Proteínas de superfície que se ligam à matriz extracelular auxiliam várias bactérias patogênicas a se aderirem às células hospedeiras (SCHUBERT et al., 2004). A matriz extracelular de tecidos de mamíferos é composta por glicoproteínas, como colágeno, laminina, fibronectina e fibrinogênio, formando uma estrutura macromolecular subjacente às células epiteliais e endoteliais (ARAÚJO et al., 2008; SCHUBERT et al., 2004). O fibrinogênio é uma proteína de fase aguda sintetizada pelo fígado e tem sua liberação aumentada no processo inflamatório (VECINI; PATRÍCIO; CIARLINI, 2006). Várias pesquisas têm demonstrado interações de *S. agalactiae* com as proteínas da matriz extracelular e, para cada uma dessas proteínas, existem receptores específicos (SCHUBERT et al., 2004; SPELLERBERG et al., 1999).

A aderência de *S. agalactiae* aos tecidos do hospedeiro é importante no início do processo infeccioso (FROST; WANASINGHE; WOOLCOCK, 1977; RAJAGOPAL, 2009). Enquanto nos *Streptococcus* pertencentes aos outros grupos de Lancefield, a ligação ao fibrinogênio é feita por uma proteína de membrana denominada M (FISCHETTI, 1989; VASI et al., 2000), a ligação de *S. agalactiae* ao fibrinogênio da matriz extracelular é mediada por duas proteínas conhecidas como FbsA e FbsB, que podem ligar tanto ao fibrinogênio solúvel quanto ao imobilizado de humanos e de bovinos (JACOBSSON, 2003; JONSSON et al., 2005; SCHUBERT et al., 2004). Estudos têm demonstrado que a proteína FbsA também tem função de agregação plaquetária, podendo causar outros agravos durante a infecção (PIETROCOLA et al., 2005) como também pode estar envolvida no mecanismo de escape ao sistema imunológico, evitando

a opsonização por macrófagos e neutrófilos (PIETROCOLA et al., 2005; SCHUBERT et al., 2004). Uma mutação no gene *lbsA* pode causar uma redução na habilidade do *S. agalactiae* em se multiplicar no sangue de seres humanos, o que sugere que a proteína FbsA contribui para a resistência à fagocitose (LINDAHL; STÂLHAMMAR-CARLEMALM; ARESCHOUG, 2005). A deleção do gene *lbsB* não resultou em redução na adesão ao fibrinogênio celular, porém, diminuiu a invasão em células epiteliais pulmonares, mostrando que FbsB também tem função de promover a entrada de *S. agalactiae* nas células do hospedeiro (GUTEKUNST; EIKMANN; REINSCHIED, 2004).

### 2.3.6 Pili

Pili, também conhecidos como fímbrias, são estruturas relacionadas à aderência e invasão bacteriana às células e tecidos hospedeiros durante a colonização. Sua primeira descrição em *S. agalactiae* ocorreu em 2005 e desde então diversos estudos têm sido realizados, mostrando sua importância na invasão do hospedeiro (LAUER et al., 2005; MAISEY et al., 2007; PAPASERGI et al., 2011; ROSINI et al., 2006; SORIANI; TELFORD, 2010).

As fímbrias são importantes fatores de virulência em *S. agalactiae* para a infecção em mamíferos, consistindo de subunidades proteicas repetidas, que se estendem desde a superfície bacteriana até o meio circundante (DRAMSI; TRIEU-CUOT; BIERNE, 2005; MARESSO; SCHNEEWIND, 2008). Estas permitem o desenvolvimento de infecções invasivas em seres humanos, principalmente infecções urinárias, genitais e gastrointestinais, podendo contribuir para a ocorrência de meningite e septicemia neonatal (DORAN; NIZET, 2004; MAISEY et al., 2008).

A extremidade dos pili geralmente apresenta propriedades adesivas, que promovem a ligação bacteriana à matriz extracelular e/ou a ligação a receptores

celulares do hospedeiro (MARESSO; SCHNEEWIND, 2008). Em *S. agalactiae*, os pili são mediadores de resistência aos peptídeos catiônicos antimicrobianos, facilitando a aderência e ataque do patógeno às células hospedeiras (DRAMSI; TRIEU-CUOT; BIERNE, 2005; MAISEY et al., 2007; PEZZICOLI et al., 2008). Além destas funções, um estudo realizado por Konto-Ghiorgh et al. (2009) revelou que os pili de *S. agalactiae* também estão envolvidos na formação de biofilmes.

Os pili são codificados pelos genes *pilA*, *pilB* e *pilC* (MAISEY et al., 2007) que estão localizados em dois grupos, ilha de pilus 1 (PI-1) e ilha de pilus 2 (PI-2), sendo que esta última apresenta duas variantes, a PI-2a e PI-2b (LAUER et al., 2005; RAJAGOPAL, 2009; ROSINI et al., 2006). Estas estruturas são formadas por três subunidades proteicas: PilA, PilB e PilC e sua montagem envolve duas classes de proteínas sortases tipo C, StrC3 e StrC4 (KONTO-GHIORGH et al., 2009).

Acredita-se que as sortases tipo C possam polimerizar os pili pela formação de ligações covalentes entre diferentes subunidades. Essas proteínas já foram descritas em outros microrganismos além dos *Streptococcus* do Grupo B (GBS), como em *Actinomyces viscosus*, *Actinomyces naeslundii*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Streptococcus pyogenes* (DRAMSI; TRIEU-CUOT; BIERNE, 2005; MARESSO; SCHNEEWIND, 2008).

Margarit et al. (2009) avaliaram a frequência das ilhas de pilus em 289 amostras de *S. agalactiae* provenientes de humanos e mostraram que pelo menos uma das três ilhas estava presente. PI-2 estava presente em todas (73% possuíam PI-2a e 27%, PI-2b) enquanto o locus PI-1 foi detectado em apenas 28%. A organização mais frequente, observada em 133 amostras, foi a detecção simultânea de PI-1 e PI-2a enquanto a situação mais atípica foi a presença de somente PI-2b em quatro amostras. Houve uma correlação desses dados com o

tipo capsular e a idade do hospedeiro que foi isolada. Sorensen et al. (2010) também observaram a presença de genes PI-2 em 238 bactérias isoladas de bovinos e seres humanos, mostrando o potencial dessas proteínas para desenvolvimento de vacinas. Ao contrário, PI-1 estava ausente em 54% de isolados de bovinos e 24% de isolados de seres humanos.

Embora vários estudos sobre os pili em isolados de *S. agalactiae* de origem humana tenham sido realizados, pouco se sabe sobre a presença e importância deste fator de virulência em isolados associados com a mastite bovina, o que salienta a necessidade de mais estudos sobre o tema.

### **2.3.7 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) no estudo dos fatores de virulência**

Ferramentas de epidemiologia molecular oferecem oportunidades únicas para o avanço no entendimento das doenças através da investigação dos agentes infecciosos ao nível molecular (MUELLNER et al., 2011). Técnicas de estudo da virulência de isolados de seres humanos e bovinos, bem como métodos que determinam a habilidade destes isolados de colonizar certos hospedeiros, de causar doença e até mesmo de cruzar barreiras interespecies, são de grande importância na epidemiologia de *S. agalactiae* (CORRÊA et al., 2010).

Vários estudos recentes têm utilizado a PCR com sucesso para o estudo de fatores de virulência de *S. agalactiae* isolados de humanos, bovinos e peixes (UDO; BOSWIHI; AL-SWEIH, 2013; CORREA et al., 2009; GODOY et al., 2013; LIN et al., 2009; SORENSEN et al., 2010). Métodos baseados em PCR são métodos de tipagem quase universais, com diversas aplicações em sistemas de tipagem de microrganismos, e exibem bons níveis de discriminação. Suas principais vantagens incluem alta reprodutibilidade, alta simplicidade técnica de

execução, grande disponibilidade de equipamentos e reagentes e rapidez para execução (BELKUN et al., 2007).

#### **2.4 Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos**

Programas de controle eficazes e econômicos de mastite se fundamentam mais na prevenção do que no tratamento, e rebanhos que adotam as medidas de prevenção produzem leite de maior qualidade a um menor custo. No entanto, a intervenção terapêutica é parte importante de um programa de controle de mastite bovina, que continua a ser a causa mais frequente do uso de antibacterianos em fazendas leiteiras e contribui para os gastos com medicamentos e custos veterinários na propriedade (ERKSINE; WAGNER; DEGRAVES, 2003). Além disso, o uso indiscriminado de antimicrobianos na medicina humana e veterinária é uma das principais causas de resistência aos antibióticos (TEUBER, 2001).

Segundo Myllys et al. (1994), a resistência a antimicrobianos é um fator importante no estabelecimento e disseminação de clones bacterianos em um rebanho, tendo estreita associação com mudanças no manejo, tais como a implementação de tratamento antibiótico sistemático, estabulação e introdução de ordenhadeira mecânica, fatores que atuam como forças seletivas sobre patógenos causadores de mastite.

Segundo Guérin-Faubleé et al. (2002), a terapia antimicrobiana continua a ser um componente importante dos programas de saúde do rebanho para controlar infecções intramamárias em vacas leiteiras. Para tratar a mastite clínica com sucesso e implementar as terapias de vaca seca de forma eficiente, é preciso conhecer a prevalência e os padrões de susceptibilidade antimicrobiana de microrganismos isolados da glândula mamária. No entanto, as restrições financeiras e de tempo muitas vezes tornam impraticáveis a identificação dos

agentes envolvidos na etiologia e a realização de testes de susceptibilidade a antimicrobianos pelos veterinários, antes de tratar a mastite clínica. Assim, a escolha da terapêutica geralmente é feita empiricamente ou, muitas vezes, com base na informação anterior sobre tendências de susceptibilidade.

A resistência a antimicrobianos em agentes patogênicos na produção animal é um problema de saúde animal, mas também traz implicações para a saúde pública (WITTE, 2000). Desta forma, a realização de estudos para incrementar os conhecimentos sobre o perfil de susceptibilidade aos agentes patogênicos responsáveis pelas mastites em bovinos leiteiros é fundamental (ERSKINE; WAGNER; DEGRAVES, 2003). Estes trabalhos contribuem para a vigilância epidemiológica contínua da susceptibilidade aos antimicrobianos para estes microrganismos, permitindo monitorar o aparecimento de estirpes microbianas resistentes a alguns antibióticos. Deve-se ressaltar que os padrões de resistência aos antimicrobianos utilizados em mastites podem variar entre países, com o tempo, e até mesmo entre propriedades, desta forma, devem ser permanentemente monitorados (VINTOV et al., 2003).

Estudos sobre concentração inibitória mínima (MIC) para *S. agalactiae* têm sido realizados (BENGTSSON et al., 2009; GUÉRIN-FAUBLÉE et al., 2002). Gao et al. (2012) avaliaram o MIC para 55 amostras de *S. agalactiae* isoladas de bovinos com mastite, tendo verificado susceptibilidade de 27,5% para a tetraciclina, 70,6% para gentamicina e amicacina, 76,5% para eritromicina e de 100% para penicilina. Devido aos níveis expressivos de resistência a aminoglicosídeos e tetraciclina, os autores preconizaram o uso criterioso destes antimicrobianos nos casos de mastite por *S. agalactiae*, preferencialmente com suporte do teste antibiograma.

Pesquisas relacionadas ao perfil de sensibilidade a antimicrobianos em amostras de *S. agalactiae* isoladas de bovinos acometidos por mastite em rebanhos brasileiros são limitados. Nos poucos estudos realizados, a

identificação do agente se limitou ao gênero e utilizou a técnica de difusão em discos, que embora padronizada internacionalmente, é mais passível de erros que o MIC. Estes aspectos impedem a percepção mais ampla do problema de resistência em *S. agalactiae* em âmbito nacional (FERREIRA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2011).

#### **2.4.1 Genes de resistência a antimicrobianos**

A resistência aos antibióticos tem sido documentada em bactérias, podendo ocorrer em decorrência de mutações (MARTINEZ; BAQUERO, 2000) ou através da aquisição de genes de resistência a antibióticos (PINTO et al., 2014). Os genes de resistência podem ser adquiridos através de transferência horizontal de genes, incluindo a transferência de plasmídeos com capacidade de replicação autônoma e transposons que podem transportar genes de resistência de cromossomos para plasmídeos e vice-versa (MARTINEZ et al., 2009). O fenômeno de conjugação e transferência de plasmídeos com determinantes de resistência a antimicrobianos ocorre naturalmente entre cepas de bactérias de origem humana ou animal, mesmo na ausência de antibióticos (KRUSE; SORUM, 1994).

A possibilidade de resistência cruzada entre antimicrobianos pode ocorrer nas diferentes classes de antimicrobianos que, apesar de estruturalmente diferentes, ligam-se a porções relacionadas nas bactérias. Um exemplo são os macrólidos, lincosamidas e estreptogaminas (MLS) que se ligam à subunidade 50S do ribossoma em locais estreitamente relacionados, possibilitando a ocorrência de resistência cruzada em bactérias Gram-positivas. Um dos mecanismos descritos de múltipla resistência é devido a modificações no rRNA 23S devido à enzima adenina-N6- metiltransferase. Estas modificações têm como resultado a alteração do local no rRNA 23S onde os antibióticos MLSB

(macrólidos, lincosamidas e estreptogramina B) se ligam. A modificação deste local do ribossoma confere resistência cruzada a estes antibióticos (fenótipo de resistência MLSB) e refere-se a um dos mecanismos de resistência mais comuns, sendo os genes que codificam para essas metilases designados de *erm* (“erythromycin ribosome methylation”) (FLUIT et al., 2001).

A resistência a um determinado antimicrobiano também pode ocorrer devido a bombas de efluxo. Estas são responsáveis pela expulsão do antimicrobiano da célula bacteriana, de forma a proteger o meio intracelular, em particular os ribossomas. Os genes que codificam para o mecanismo de efluxo de antibióticos da classe dos macrolídeos designam-se genes *mef* (“macrolide efflux”). Estes genes podem estar associados a elementos genéticos localizados no cromossoma e podem ser transferidos entre bactérias durante a conjugação (LUNA et al., 1999). A presença deste gene nos isolados de *Streptococcus* spp. resulta na resistência a macrolídeos sem interferir na susceptibilidade as lincosamidas e estreptogramina B (fenótipo M) (ROBERTS et al., 1999).

Poyart et al. (2003) detectaram os genes *erm(A)*, *erm(B)* e *mef(A)* associados à resistência a macrolídeos e lincosamidas em isolados *S. agalactiae* de origem humana. Loch et al. (2005) detectou o gene *erm(B)* em isolados *Streptococcus* spp. associados a mastites bovinas.

A resistência a macrolídeos associada à resistência à tetraciclina tem sido observada. Estes autores observaram que todas as estirpes *S. agalactiae* de origem humana e origem animal resistentes à eritromicina também eram resistentes à tetraciclina contendo associações dos genes *erm*, principalmente *erm(B)*, responsável pela resistência à eritromicina e *tet(O)*, responsável pela resistência à tetraciclina (DUARTE et al., 2005).

Determinantes de resistência à tetraciclina no gênero *Streptococcus* foram descritos pela primeira vez por Brown e Roberts (1991). Existem dois mecanismos codificados pelos genes de resistência à tetraciclina. Um é o

mecanismo de efluxo do antibiótico (através de proteínas codificadas pelos genes *tetK* e *tetL*) da célula bacteriana e o outro confere proteção ao ribossoma (proteínas citoplasmáticas codificadas pelos genes *tetM*, *tetO*, *tetQ*, *tetS*, *tetT* e *tetW*) (FLUIT et al., 2001; LEVY et al., 1999; ROBERTS, 1996). A maioria dos genes *tet* está associada a elementos genéticos móveis, o que parece justificar a sua grande distribuição por diferentes espécies bacterianas (CHOPRA; ROBERT, 2001; ROBERTS, 1996; SALYERS et al., 1995).

Outros determinantes de resistência que vêm sendo estudados em *S. agalactiae* são os genes *aphA-3* e *aad-6*, cuja expressão confere fenótipos de resistência aos antimicrobianos da classe dos aminoglicosídeos. Gao et al. (2012) e Poyart et al. (2003) relataram a presença desses genes em amostras de *S. agalactiae* provenientes de bovinos e humanos, ambos os trabalhos mostraram que a presença destes genótipos estava associada aos fenótipos de resistência aos aminoglicosídeos, como a gentamicina e a amicacina.

#### **2.4.2 Técnicas de estudo *in vitro* para avaliação da susceptibilidade aos antimicrobianos**

O surgimento de bactérias resistentes é um dos principais fatores que limita a eficácia dos antimicrobianos no combate às doenças. Portanto, a determinação da resistência ou susceptibilidade de uma bactéria representa um dos elementos críticos no delineamento de terapias racionais e adequadas. O padrão de susceptibilidade bacteriana aos antimicrobianos pode ser determinado por testes laboratoriais, mas os dados gerados devem ser utilizados de acordo com o contexto clínico de cada caso (COYNE et al., 2004). Para extrapolação do resultado dos testes laboratoriais para uso *in vivo*, é necessário observar as características farmacocinéticas e farmacodinâmicas da droga, a fim de

determinar a probabilidade de o fármaco atingir uma concentração satisfatória nos órgãos onde o patógeno pode estar localizado (MILLER, 2007).

Diversos métodos laboratoriais podem ser utilizados para mensurar a sensibilidade *in vitro* das bactérias aos agentes antimicrobianos (CLSI, 2008). Estes incluem métodos de difusão da droga em meio de crescimento sólido (teste de difusão em discos) e métodos de difusão das drogas em meio líquido (microdiluição para determinação da concentração inibitória mínima – MIC) (BELKUM et al., 2007). A utilidade desses métodos pode variar de acordo com a estabilidade dos padrões de resistência, pois, alguns determinantes de resistência são transmitidos por plasmídeos, por exemplo, sendo facilmente perdidos na ausência de condições seletivas (TENOVER et al., 1994). Os perfis de susceptibilidade gerados podem fornecer dados de caracterização bacterianas complementares às técnicas de tipagem molecular (BELKUN et al., 2007).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivos gerais

Realizar a prospecção de genes de virulência, de genes de resistência a antimicrobianos e avaliar a susceptibilidade a antimicrobianos em amostras de *Streptococcus agalactiae* isolados de mastite em rebanhos bovinos do Brasil.

#### 3.2 Objetivos específicos

- a) Realizar a PCR para pesquisar a presença dos seguintes genes de virulência: *hylB*, *bca*, *bac*, *fbsA*, *fbsB*, *cfb*, *bibA*, PI-1, PI-2a e PI-2b;
- b) Realizar a PCR para pesquisar a presença dos seguintes genes de resistência antimicrobiana: *ermA*, *ermB*, *mefA*, *tetO*, *tetM*, *aphA3*, *aad-6*;
- c) Avaliar os padrões de susceptibilidade antimicrobiana de *S. agalactiae* isolados de casos de mastite bovina em rebanhos brasileiros por meio da técnica de Concentração Inibitória Mínima (MIC) para os antibióticos Eritromicina, Clindamicina, Tetraciclina, Gentamicina, Penicilina, Ceftiofur, Cefalotina e Sulfonamida;
- d) Comparar genótipos e fenótipos de resistência aos antimicrobianos Eritromicina, Clindamicina, Tetraciclina e Gentamicina.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Amostras estudadas**

Para a realização do estudo, foram utilizadas 61 amostras de *Streptococcus agalactiae* associadas com a mastite bovina, provenientes de rebanhos bovinos das regiões Nordeste (n=10), Sudeste (n=38) e Sul (n=13) do país. Estas amostras, que já se encontravam congeladas a 70°C negativos no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Medicina Veterinária da UFLA, foram gentilmente cedidas por pesquisadores de instituições de pesquisa e de ensino das referidas regiões.

### **4.2 Testes moleculares**

Os testes moleculares realizados para análise das amostras estão descritos nos itens seguintes.

#### **4.2.1 Extração de DNA**

As amostras de *S. agalactiae* foram cultivadas em ágar tripticaseína soja (Himedia<sup>®</sup>, Índia) suplementadas com 5% de sangue ovino a 37°C durante 48 horas. Após esse período foram inoculadas em caldo BHI (*brain heart infusion*) (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Índia) a 37°C por 48 horas para que a extração do DNA genômico fosse procedida de acordo com o protocolo padrão para extração de bactérias Gram-positivas, do kit Wizard<sup>®</sup> Genomic DNA Purification Kit (Promega<sup>®</sup>, Estados Unidos).

#### 4.2.2 Reações de PCR

A detecção dos genes de virulência e dos genes de resistência antimicrobiana foi avaliada por PCR individual, em termociclador Peltier Thermal Cycler Multi-Purpose (Biocycle®, China), utilizando condições e iniciadores previamente descritos na literatura, sendo que, quando necessário, às reações foram otimizadas (Tabelas 1 e 2).

Foram estudados os genes de virulência *hylB* (hialuronidase), *bca* e *bac* (subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  da proteína C), *fbsA* e *fbsB* (proteínas ligantes de fibrinogênio), *cfb* (fator CAMP), *bibA* (adesina bacteriana imunogênica de GBS) e dos genes que codificam as ilhas de pilus PI-1, PI-2a e PI-2b. Em relação aos genes de resistência antimicrobiana, foram estudados os genes *ermA* e *ermB* (resistência cruzada a macrólídeos, lincosamidas e estreptogaminas), *mefA* (resistência aos macrolídeos por bomba de efluxo), *tetO* e *tet M* (resistência à tetraciclina por proteção ao ribossoma) e *aphA3* e *aad-6* (resistência aos aminoglicosídeos).

Para avaliar a reprodutibilidade dos ensaios de PCR, as amostras foram submetidas à retestes em cada bateria de testes e, a avaliação da especificidade das reações foi realizada através da análise do tamanho dos produtos de amplificação formados e pela presença de amplicón único. Ao encontrar uma amostra positiva esta era utilizada como controle nas demais baterias de testes para determinado gene.

Tabela 1 Iniciadores utilizados, tamanho esperado dos produtos de amplificação e suas respectivas referências para detecção dos genes de virulência em *S. agalactiae* isolados de mastite em rebanhos bovinos brasileiros

Gene alvo	Tamanho dos produtos	Sequência (5'-3')	Referências
<i>hylB</i>	503 pb	F:5'-CACCAATCCCCACTCTACTA-3' R:5'-TGTGTCAAACCATCTATCAG-3'	(CORRÊA et al., 2009)
<i>bca</i>	376 pb	F:5'-CTACAATTCCAGGGAGTGCA-3' R:5'-ACTTICTTCCGTCCACTTAG-3'	(CORRÊA et al., 2009)
<i>bac</i>	479 pb	F:5'-AAGCAACTAGAAGAGGAAGC-3' R:5'-TTCTGCTCTGGTGTTTTAGG-3'	(CORRÊA et al., 2009)
<i>fbsB</i>	417 pb	F:5'-GCGCAAACCTTCTGTCCAA-3' R:5'-CCGATACGATTGTCCAAATG-3'	(GODOY et al., 2013)
<i>fbsA</i>	556 pb	F:5'-GAACCTTCTTGTCACACTTG-3' R:5'-TTGATCCTAGCACTCCCA-3'	(GODOY et al., 2013)
<i>cfb</i>	317 pb	F:5'-AAGCGTGTATTCCAGATTTCC-3' R:5'-AGACTTCATTGCGTGCCAAC-3'	(GODOY et al., 2013)
<i>bibA</i>	2816pb	F:5'-AATCGAAAACAACGTTGGAAAG-3' R:5'-AAACCAGGCTTCATCAGTCATT-3'	(SANTI et al., 2009)
PI-1	735 pb	F:5'-CTCATCAGTTGACGATTGTTC-3' R:5'-CCATTGCCTGTTGCTCAC-3'	(ARPINI, 2011)
PI-2a	575 pb	F:5'-CTATGACACTAATGGTAGAAC-3' R: 5'-CACCTGCAATAGACATCATAG-3'	(MARTINS et al., 2010)
PI-2b	721 pb	F: 5'-ACACGACTATGCCTCCTCATG-3' R: 5'-TCTCCTACTGGAATAATGACAG-3'	(MARTINS et al., 2010)

Tabela 2 Iniciadores utilizados, tamanho esperado dos produtos de amplificação e suas respectivas referências para detecção dos genes de resistência antimicrobiana em *S. agalactiae* isolados de mastite em rebanhos bovinos brasileiros

Gene alvo	Tamanho dos produtos	Sequência (5'-3')	Referências
<i>ermA</i>	640pb	F:5'-TCTAAAAAGCATGTAAAAGA-3' R:5'-CTTCGATAGTTTATTAATATTAGT-3'	(SUTCLIFFE et al., 1996)
<i>ermB</i>	640 pb	F:5'-GAAAAGRTACTCAACCAAATA-3' R:5'AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC-3'	(SUTCLIFFE et al., 1996)
<i>mefA</i>	328 pb	F:5'-AGTATCATTAATCACTAGTGC-3' R:5'-TTCTTCTGGTACTAAAAGTGG-3'	(SUTCLIFFE et al., 1996)
<i>tetM</i>	359 pb	F:5'-GTGGAGTACTACATTTACGAG-3' R:5'-GAAGCGGATCACTATCTGAG-3'	(POYART et al., 1995)
<i>tetO</i>	538 pb	F:5'-GCGGAACATTGCATTTGAGGG-3' R:5'-CTCTATGGACAACCCGACAGAAG-3'	(CLERMONT et al., 1997)
<i>aphA3</i>	848 pb	F:5'-GGGGTACCTTTAAATACTGTAG-3' R:5'-TCTGGATCCTAAAACAATTCATCC-3'	(POYART et al., 1995)
<i>aad6</i>	978 pb	F:5'-AGAAGATGTAATAATATAG-3' R:5'-CTGTAATCACTGTTCCCGCCT-3'	(POYART-SALMERON et al., 1990)

### 4.2.3 Eletroforese

Os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% (Invitrogen Brasil, São Paulo) corados com 0,5x Gelred™ (Biotium®, Hayward, CA) utilizando tampão de corrida TAE 1X (Tris-Acetate, 0,04 M; EDTA, 0,001 M), e as imagens foram reveladas e registradas em aparelho transluminador (L-Pix Chemi Photo Digitizer - Loccus Biotecnologia, Brasil) para serem analisadas. Foram utilizados marcadores de tamanho molecular de 100 pb e 1kb (New England Biolabs®Inc). Os perfis genéticos de virulência foram determinados com base na presença ou ausência dos genes de virulência rastreados e as frequências dos perfis foram estatisticamente avaliadas utilizando o *software* SPSS 20.0, pelo Teste Exato de Fisher, com nível de significância de 95% (p=0,05).

### 4.3 Teste de Susceptibilidade Antimicrobiana – MIC

A técnica de microdiluição para a obtenção das Concentrações Inibitórias Mínimas - MIC, classificando os isolados como susceptíveis ou resistentes, foi realizada segundo as normas do *Clinical Laboratory Standarts Institute* (CLSI, 2008).

Foi utilizada a técnica de microdiluição em microplacas estéreis. Para tal, foi utilizado caldo Mueller-Hinton (Himedia®, India) suplementado com os cátions divalentes Ca +2 e Mg +2 (CAMHB) e 5% de soro equino. Todos os antibióticos (Sigma-Aldrich®, EUA) foram solubilizados e diluídos de acordo com o indicado pelo CLSI, 2008, a fim de obter as concentrações a serem testadas (Tabela 3).

Tabela 3 Concentrações dos antibióticos ( $\mu\text{g/mL}$ ) usados no teste de Concentração Inibitória Mínima – MIC em *S. agalactiae* isolados de mastite em rebanhos bovinos brasileiros

<b>Antibiótico</b>	<b>Faixas de Concentração (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>
<b>Eritromicina</b>	32 - 0,06
<b>Tetraciclina</b>	128 – 0,25
<b>Gentamicina</b>	128 – 0,25
<b>Penicilina</b>	8 – 0,015
<b>Ceftiofur</b>	32 – 0,06
<b>Sulfonamida</b>	2048 – 4
<b>Clindamicina</b>	16 – 0,03
<b>Cefalotina</b>	8 – 0,015

As amostras foram previamente cultivadas em ágar tripticaseína soja (Himedia<sup>®</sup>, India) suplementadas com 5% de sangue ovino a 37°C por 24 – 48 horas. Para cada amostra, foram preparadas suspensões bacterianas em solução salina (0,9%), ajustadas à turbidez de 0,5 da escala de Mac Farland que equivale a  $1,5 \times 10^8$  (UFC/mL). Em cada poço contendo as devidas concentrações de antibiótico e caldo Muller Hinton, foram adicionados 5 microlitros da suspensão bacteriana, as placas foram agitadas e posteriormente incubadas, por 24 horas, a 37 °C. Todos os testes foram realizados em duplicata, utilizando controles negativos e positivos do crescimento bacteriano. Após o período de incubação, o valor da MIC foi determinado como a menor concentração de cada antibiótico em que não foi possível a detecção visual do crescimento bacteriano.

Os resultados dos oito antimicrobianos testados foram avaliados a partir dos padrões do CLSI (2008).

A associação entre a presença/ausência dos genes de resistência antimicrobiana e os fenótipos de resistência aos antimicrobianos eritromicina, clindamicina e tetraciclina foi estatisticamente avaliada utilizando o *software* SPSS 20.0, pelo Teste Exato de Fisher com nível de significância de 99% ( $p=0.01$ ).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Virulência em *S. agalactiae*

Os resultados da pesquisa de genes de virulência demonstraram a ocorrência de sete perfis de virulência nos isolados estudados (Tabela 4). O perfil 1 (n=31) foi o mais frequente, seguido pelos perfis 7 (n=17) e 4 (n=8) cujas frequências não diferiram significativamente. A frequência do perfil 6 (n=2) também não teve diferença significativa do perfil 4 (n=8), e dos perfis 2, 3, e 5 (n=1) ( $p>0,05$ ) (Tabela 4).

O perfil 1 (n=31), que foi o mais frequente, contém os genes PI-2b, *fsbB*, *cfb* e *hylB*. A presença desses genes, nos isolados deste perfil, pode estar relacionada à melhor adaptação para a colonização e para a infecção da glândula mamária dos bovinos, o que explica também a maior distribuição deste perfil. Os genes *fsbB*, *cfb* e *hylB* estiveram presentes em todos os isolados estudados, corroborando a hipótese pré-citada.

O perfil 7 (n=17) diferiu-se do perfil 1 pela presença do gene *fsbA*, assim como o perfil 4 (n=8) diferiu-se do perfil 1 pela presença de *fsbA* e *bibA*. O gene *fsbA* esteve presente em 44,2% das amostras e *bibA* em 15%. Essas frequências apontam para o fato que esses genes podem não ser essenciais para a ocorrência de mastite por *S. agalactiae* nos bovinos ou que as funções desempenhadas pelos mesmos estão sendo desempenhadas em parte por outros genes de virulência.

Com relação às ilhas de pilus, PI-2b esteve presente em 59 (96,7%) amostras estudadas, enquanto a PI-1 foi encontrada em uma única (1,6%) amostra e PI-2a, em duas amostras (3,3%). A amostra portadora de PI-1 era uma das duas portadoras de PI-2a. As duas amostras que não apresentavam PI-2b foram as portadoras de PI-2a.

O gene *bca*, relacionado à subunidade  $\alpha$  da proteína C, foi encontrado em duas amostras e sua presença compôs o perfil 6. O gene relacionado à subunidade  $\beta$  (*bac*) da proteína C não foi encontrado neste estudo.

Tabela 4 Perfis gênicos de virulência encontrados em amostras de *S. agalactiae* isolados de mastite em rebanhos bovinos brasileiros

Perfil/Gene	PI-2a	PI-2b	PI-1	<i>bibA</i>	<i>fbsA</i>	<i>fbsB</i>	<i>cfB</i>	<i>hylB</i>	<i>bca</i>	<i>bac</i>	Nº de amostras
<b>Perfil 1</b>	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	31 <sup>a</sup>
<b>Perfil 2</b>	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	1 <sup>d</sup>
<b>Perfil 3</b>	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	1 <sup>d</sup>
<b>Perfil 4</b>	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	8 <sup>bc</sup>
<b>Perfil 5</b>	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	1 <sup>d</sup>
<b>Perfil 6</b>	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	2 <sup>cd</sup>
<b>Perfil 7</b>	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	17 <sup>b</sup>

<sup>a,b,c,d</sup>: Representam frequências diferentes entre os perfis – Teste Exato de Fisher ( $p < 0,05$ )

O estabelecimento e a severidade das doenças bacterianas podem ser influenciados pela expressão de genes de virulência (AITKEN; CORL; SORDILLO, 2011). Desta forma, destaca-se a importância de estudos que explorem o potencial de virulência em bactérias. Os resultados encontrados mostram que a população estudada, embora de forma não significativa, possui diferentes combinações de genes de virulência, além de um núcleo comum de virulência representado pelos genes *cfb*, *hylB*, *fbxB* e PI2 (principalmente PI-2b). Richards et al. (2011) comparando amostras de bovinos e humanos, concluíram que *S. agalactiae* de origem bovina possui potenciais genes de virulência obtidos, principalmente, através da transferência de elementos genéticos móveis o que o tornaram “bovino-específico” e continuamente se adaptaram ao hospedeiro, porém, apesar dessa adaptação, Richards et al. (2014) mostraram que os isolados de *S. agalactiae* bovino possuem maior *turnover* de genes que isolados humanos, este fato pode refletir uma adaptação mais recente ao hospedeiro bovino.

Dentre os determinantes de virulência estudados neste trabalho, encontra-se o fator CAMP, codificado pelo gene *cfb*. Estudos *in vivo* mostraram que o fator CAMP parcialmente purificado foi letal para coelhos e que a administração de fator CAMP junto a doses subletais de *S. agalactiae* foi capaz de induzir septicemia e morte em camundongos (RAJAGOPAL, 2009). A presença do gene *cfb* em todas as amostras deste estudo (provenientes de mastite bovina clínica e subclínica) mostra que o fator CAMP deve estar envolvido na patogenia de *S. agalactiae* em bovinos. Altas frequências também têm sido descritas em outros trabalhos recentes referentes a amostras de outras espécies. Udo, Boswihi e Al-Sweih (2013) encontraram uma frequência de 99,4% *cfb* positivos em amostras clínicas de humanos e Godoy et al. (2013) mostraram que todos os 46 isolados estudados, provenientes de surtos de doença estreptocócica em peixes, eram *cfb* positivos.

A hialuronidase, codificada pelo gene *hylB*, vem sendo descrita como um fator que contribui na disseminação do patógeno nos tecidos do hospedeiro (RAJAGOPAL, 2009; YILDIRIM; FINK; LAMMLER, 2002). Embora relatos anteriores mostrassem que sua ação não era absolutamente requerida para a invasão, pois, cepas com *hylB* silenciado foram isoladas de infecções invasivas (ROLLAND et al., 1999), em estudo recente realizado por Wang et al. (2014) foi demonstrado que a inativação de *hylB* reduziu a sobrevivência intracelular de *S. agalactiae* em macrófagos, desta forma este estudo indicou que a hialuronidase tem um papel chave na sobrevivência do patógeno no interior das células do hospedeiro.

No presente estudo, a presença de *hylB* foi observada em todas as amostras estudadas. Corrêa et al. (2009), estudando isolados humanos com origem clínica e Dmitriev et al. (2002), trabalhando com isolados humanos e bovinos também, encontraram 100% de amostras *hylB* positivas. Godoy et al. (2013) relataram que 80, 4% das cepas provenientes de surtos da doença em peixes eram *hylB* positivas, além de demonstrar que a presença de *hylB* levava à maior virulência de *S. agalactiae* em tilápias do Nilo e aparecimento mais rápido dos sinais clínicos. Foi demonstrado que *hylB* é um determinante crucial nas infecções intramamárias bovinas e que existe uma alta atividade dessa enzima em cepas de origem bovina quando comparadas as de humanos (SUKHNANAND et al., 2005).

Os antígenos  $\alpha$  e  $\beta$  da proteína C, codificados pelos genes *bca* e *bac* têm sido investigados como possíveis candidatos à produção de vacinas, devido à capacidade de induzirem imunidade protetora contra infecções por GBS (MAIONE et al., 2005). Considerando os resultados obtidos neste estudo, em que a frequência de *bca* foi muito baixa (presente em dois dos 61 isolados estudados) e *bac* foi ausente, entende-se que essas duas proteínas não seriam antígenos vacinais eficientes para a mastite bovina causada por *S. agalactiae* em

rebanhos brasileiros, embora o número de amostras testadas tenha sido reduzido. Johnson e Ferrieri (1984) já haviam descrito que um número significativo de cepas de GBS não expressa as proteínas  $\alpha$  e  $\beta$  em sua superfície, tornando limitado o interesse na detecção fenotípica dessas proteínas. Trabalhos recentes apontaram baixa frequência desses genes em outras espécies de isolados brasileiros, *bca* foi encontrado em 22% e *bac* foi ausente em amostras humanas (CORRÊA et al., 2009), enquanto ambos foram ausentes em estudo realizado em amostras de peixes (GODOY et al., 2013).

Corrêa (2009) demonstrou através de infecção experimental em camundongos que a ausência dos genes *bca* e *bac* na cepa bovina 87159 não foi fundamental para a sua virulência. A baixa frequência desses genes observada no presente estudo corrobora que esses genes não são essenciais para a ocorrência da doença nos bovinos, uma vez que os isolados estudados são provenientes de casos clínicos ou subclínicos de mastite.

A presença de pelo menos uma das variantes das ilhas de pilus foi descrita em todas as amostras deste estudo, sendo que 59 amostras foram PI-2b positivas, as outras duas foram PI-2a positivas e uma dessas também continha PI-1. Corroborando os resultados do presente trabalho, PI-2b foi relatada como a variante de pilus mais frequente em isolados de bovinos em estudos realizados em várias regiões do mundo (SORENSEN et al., 2010; YANG et al., 2013; SPRINGMAN et al., 2014). Em amostras de humanos, PI-2a foi a variante mais frequente, sendo algumas vezes associadas à PI-1 (MARTINS et al., 2010). Margarit et al. (2009) também mostraram que PI-1 não está presente em todas as amostras enquanto PI-2 é ubiquamente expressa em isolados de *S. agalactiae* de origem humana. Existe uma facilidade para a transferência horizontal de PI-1, enquanto PI-2a e PI-2b encontram-se em um local entre os genes *sag1410* e *sag1403*, portanto, apenas um ou outro pode estar presente em cada isolado (SPRINGMAN et al., 2014).

Funções específicas para os pili em GBS ainda não foram identificadas, porém, têm sido relatado que essas estruturas podem estar envolvidas na adesão, invasão e translocação em células epiteliais (KONTO-GHIORGHI et al., 2009; MAISEY et al., 2007; PEZZICOLI et al., 2008), além de ser descrito como importante na formação dos biofilmes (RINAUDO et al., 2010). Estudos e análises das frequências das ilhas de pilus nas diferentes espécies e regiões são fundamentais para o desenvolvimento futuro de vacinas para *S. agalactiae* com base nessas proteínas. Vacinas dessa natureza já se mostraram eficientes em camundongos recém-nascidos (MARGARIT et al., 2009; MARTINS et al., 2013). Os resultados obtidos neste trabalho apontam para o fato de que uma vacina contendo combinações das variantes de pilus, principalmente com PI-2b e PI-2a poderia ser eficiente para a profilaxia da mastite bovina. Um trabalho recente de Liu, Zhang e Lu (2013) mostrou que PI-2b tem se mostrado bastante presente em isolados provenientes de peixes, bovinos e crianças, o que destaca a importância dessa proteína como candidata para desenvolvimento de uma vacina que poderia ter boa eficiência em várias espécies.

Os genes *fbsA* e *fbsB*, que codificam proteínas ligantes de fibrinogênio, foram pesquisadas neste trabalho, sendo que *fbsB* foi encontrada em todos os isolados e *fbsA* em 44% deles. É possível sugerir que *fbsB* esteja mais relacionado à infecção nos bovinos que *fbsA*. Rato et al. (2013) também descreveu *fbsB* presente em todas as amostras bovinas estudadas e não encontrou *fbsA* em nenhuma dessas amostras. Esses genes já foram descritos em frequências bastante diferentes, variando de 3 a 80%, em isolados humanos (UDO; BOSWIHI; AL-SWEIH, 2013; ROSENAU et al., 2007). As funções das proteínas codificadas por estes genes vêm sendo estudadas e, enquanto FbsA têm sido relacionada à diminuição da fagocitose por macrófagos humanos (PIERNO et al., 2006), FbsB têm se mostrado importante para a entrada do

patógeno em células epiteliais (GUTEKUNST; EIKMANN; REINCHEID, 2004).

A detecção do gene *bibA* em somente 15% das cepas estudadas torna o interesse com relação à BibA “Adesina Bacteriana Imunogênica” limitado. Godoy et al. (2013) não encontraram esse gene em nenhuma das amostras provenientes de surtos da doença em peixes, desta forma podemos inferir que esta proteína parece não estar diretamente relacionada à doença em peixes e bovinos. Em humanos, BibA foi proposta como candidata à vacina, uma vez que foi expressa em todos os isolados estudados e sua expressão foi correlacionada com a proteção em camundongos (SANTI et al., 2009).

Estudos dessa natureza fornecem informações importantes sobre potenciais elementos de virulência em *S. agalactiae*, embora, estudos mais aprofundados e que levem em conta, por exemplo, a expressão dos fatores de virulência estudados, sejam necessários para permitir conclusões mais fidedignas sobre os mecanismos envolvidos na infecção deste patógeno na glândula mamária de bovinos. A compreensão da interação entre GBS e seus hospedeiros fornece informações valiosas sobre a evolução do patógeno e sobre alvos moleculares de destaque para possíveis intervenções terapêuticas (MAISEY; DORAN; NIZET, 2008).

## **5.2 Susceptibilidade antimicrobiana em *S. agalactiae* e genes de resistência**

Nos isolados de *S. agalactiae* (n = 61) testados pela concentração inibitória mínima (MIC) foram encontrados diferentes índices de resistência: eritromicina (26,23%), tetraciclina (47,54%), gentamicina (3,28%), sulfonamida (98,36%), e clindamicina (29,51%), por outro lado, todos os isolados foram susceptíveis à penicilina, ceftiofur e cefalotina. A distribuição das MIC, bem como a localização das amostras resistentes, estão descritas na Tabela 5.

Dentre os genes de resistência pesquisados, *ermB* foi encontrado em 12 (19,67%) isolados, *tetO* em 20 (32,78%) e *tetM* em 9 (14,75%) isolados. Os genes *ermA*, *mefA*, *apha3* e *aad6* não foram detectados em nenhum dos isolados.

A associação entre a presença de fenótipos de resistência aos antimicrobianos eritromicina, clindamicina e tetraciclina e a presença dos genes de resistência *ermB*, *tetM* e *tetO* estão descritos na Tabela 6 ( $p < 0,01$ ). Entre os 12 isolados *ermB* positivos, 10 (83,3%) apresentavam fenótipo de resistência à eritromicina, porém, seis isolados resistentes à eritromicina não continham o gene *ermB*. Com relação à clindamicina, os 12 isolados *ermB* positivos (100%) eram fenotipicamente resistentes, porém, seis isolados resistentes à clindamicina eram *ermB* negativos, sendo os mesmos seis isolados resistentes à eritromicina.

Sobre a associação dos genes que conferem a resistência à tetraciclina e os fenótipos de resistência para esse antimicrobiano, 100% dos isolados *tetM* positivos e 95% dos *tetO* positivos eram fenotipicamente resistentes. Foram encontrados dois isolados resistentes à tetraciclina que não possuíam *tetM* ou *tetO*, um isolado que possuía a combinação de *tetO* e *tetM* e ainda um isolado *tetO* positivo sensível à tetraciclina. Outra associação verificada foi a presença de *tetO* e *ermB* nas mesmas amostras. Esta análise mostrou que 91,7% das amostras que carregavam *ermB* também carregavam *tetO*.

Tabela 5 Distribuição das Concentrações Inibitórias Mínimas de oito antimicrobianos em amostras de *S. agalactiae* isolados de mastite em rebanhos bovinos brasileiros

Número de isolados em cada MIC (µg/mL)									
<b>Concentração</b>							<b>&gt;32</b>	<b>32</b>	<b>16</b>
Eritromicina							15	0	0
Ceftiofur							0	0	0
<b>Concentração</b>				<b>&gt; 128</b>	<b>128</b>		<b>64</b>	<b>32</b>	<b>16</b>
Tetraciclina				3	0		6	19	1
Gentamicina				0	0		0	0	0
<b>Concentração</b>								<b>&gt;16</b>	<b>16</b>
Clindamicina								18	0
<b>Concentração</b>									<b>&gt;8</b>
Cefalotina									0
Penicilina									0
<b>Concentração</b>	<b>&gt; 2048</b>	<b>2048</b>	<b>1024</b>	<b>512</b>	<b>256</b>	<b>128</b>	<b>64</b>	<b>32</b>	<b>16</b>
Sulfonamida		28	25	7	0	1	0	0	0

“Tabela 5, conclusão”

Número de isolados em cada MIC (µg/mL)										
<b>Concentração</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0,5</b>	<b>0,25</b>	<b>0,12</b>	<b>&lt; 0,06</b>		
Eritromicina	1	0	0	0	0	0	2	43		
Ceftiofur	0	0	0	0	0	0	0	61		
<b>Concentração</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0,5</b>	<b>&lt; 0,25</b>				
Tetraciclina	0	0	0	0	1	31	0	0		
Gentamicina	2	15	29	8	6	1	0	0		
<b>Concentração</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0,5</b>	<b>0,25</b>	<b>0,12</b>	<b>0,06</b>	<b>&lt; 0,03</b>	
Clindamicina	0	0	0	0	0	1	0	11	31	
<b>Concentração</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0,5</b>	<b>0,25</b>	<b>0,12</b>	<b>0,06</b>	<b>0,03</b>	<b>&lt;0,015</b>
Cefalotina	0	0	0	0	1	45	14	1	0	0
Penicilina	0	0	0	0	0	0	0	28	24	9
<b>Concentração</b>	<b>8</b>	<b>&lt; 4</b>								
Sulfonamida	0	0								

As células em destaque representam os isolados resistentes, ou seja, aqueles que possuem MIC  $\geq$  ao ponto de corte referente aos padrões de cada antimicrobiano.

Tabela 6 Comparação dos genótipos e fenótipos de resistência a antimicrobianos encontrados em amostras de *S. agalactiae* isolados de mastite em rebanhos bovinos brasileiros

Antibióticos	Características dos isolados					Associação <sup>a</sup>	
	Genes	F+/G+ <sup>b</sup>	F-/G- <sup>c</sup>	F+/G- <sup>d</sup>	F-/G+ <sup>e</sup>	p	OR (IC 95%)
Eritromicina	<i>ermB</i>	10	43	6	2	<0,001	35,8 (6,2 - 204,5)
Clindamicina	<i>ermB</i>	12	43	6	0	<0,001	88,7 (9,2 - 726,3)
Tetraciclina	<i>tetO</i>	19	31	10	1	<0,001	58,9 (6,9 - 497,4)
	<i>tetM</i>	9	32	20	0	<0,001	15,7 (1,9 - 131,9)

<sup>a</sup> Associação entre fenótipos resistentes e os genes de resistência. Teste Exato de Fisher (p<0,01)

<sup>b</sup> Número de isolados que expressam fenótipo de resistência para o antibiótico indicado (F+) e possui o gene indicado (G+).

<sup>c</sup> Número de isolados que não expressam fenótipo de resistência para o antibiótico indicado (F-) e não possui o gene indicado (G-).

<sup>d</sup> Número de isolados que expressam fenótipo de resistência para o antibiótico indicado (F+) e não possui o gene indicado (G-).

<sup>e</sup> Número de isolados que não expressam fenótipo de resistência para o antibiótico indicado (F-) e possui o gene indicado (G+).

A prevenção permanente realizada de forma eficiente e o tratamento precoce são metas cruciais para o controle adequado da mastite, uma vez que os casos não tratados geralmente evoluem para a cronicidade, levando a perdas permanentes (TENHAGEM et al., 2006). As infusões intramamárias contendo altos níveis de um ou mais antibióticos incluindo principalmente penicilinas, cefalosporinas, tetraciclina, aminoglicosídeos e macrolídeos são amplamente utilizadas no controle da mastite bovina (KEEFE, 2012). Desta forma, estudos como este que visam determinar os padrões de resistência e a disseminação de elementos genéticos relacionados à resistência são importantes, auxiliando na tomada de decisão relacionada aos tratamentos no campo.

A resistência à eritromicina vem sendo descrita em trabalhos realizados com cepas de *S. agalactiae*, de origem humana e bovina, em todo o mundo. Nos Estados Unidos e na Europa, já foram descritas taxas de resistência em torno de

4 a 50% (DOGAN et al., 2005; DIPERSIO; DIPERSIO, 2006; GUÉRIN-FAUBLÉE et al., 2002; SADOWY et al., 2010). No Brasil, a resistência a esse antibiótico vem sendo relatada e as taxas não têm ultrapassado 10% (DUARTE et al., 2004; DUARTE et al., 2005; PALMEIRO et al., 2010; CORRÊA et al., 2011), porém, Pinto et al. (2013) relataram resistência de 27,6% em isolados bovinos, estando em acordo com a taxa encontrada no presente trabalho (26,23%).

Neste trabalho, foi encontrada em torno de 50% de resistência à tetraciclina, índices também elevados de resistência a este antimicrobiano (60-90%) já foram bem relatados, tanto em isolados humanos como em bovinos (DUARTE et al., 2004; DOGAN et al., 2005; GAO et al., 2012; PINTO et al., 2013; RATO et al., 2013). Esses elevados índices de resistência à tetraciclina podem ser justificados pelo uso indiscriminado desse antimicrobiano para combater diversas afecções em animais durante muitos anos (RATO et al., 2013).

Rato et al. (2013) não encontraram resistência à cefazolina e ao cefoperazone quando avaliaram 60 cepas de *S. agalactiae* causadores de mastite em Portugal. No presente trabalho, foi encontrado 100% de susceptibilidade à cefalotina e ao ceftiofor, esses antimicrobianos são cefalosporinas de primeira e terceira geração, respectivamente, assim como a cefazolina e o cefoperazone avaliados por Rato et al. (2013). Lindeman et al. (2013) também encontraram altos níveis de susceptibilidade ao ceftiofur e à cefalotina em amostras de *S. agalactiae* provenientes de rebanhos norte-americanos.

Alta susceptibilidade à penicilina foi descrita por Minst et al. (2012), Guérin-Faubleé et al. (2002) e Rato et al. (2013) em isolados de *S. agalactiae* provenientes de mastite em bovinos. Neste trabalho, de acordo com a literatura, não foi demonstrada resistência para esse antimicrobiano, mostrando que esse antibiótico é uma boa opção para o tratamento dessa afecção. Em humanos, a

penicilina é preconizada como primeira opção para o tratamento das infecções por *S. agalactiae* em todas as faixas etárias, bem como na profilaxia em gestantes (VERANI; MCGEE; SCHRAG, 2010).

Níveis variáveis de resistência à gentamicina já foram descritos. Gao et al. (2012), em um estudo com 55 isolados de *S. agalactiae* provenientes de rebanhos chineses, encontraram 29,4% de resistência para esse antimicrobiano. Enquanto Duarte et al. (2004), em um estudo com 85 isolados de rebanhos brasileiros, obtiveram 100% de resistência. Rato et al. (2013), estudando 108 isolados de *Streptococcus* bovinos portugueses, encontraram uma taxa de 80,6% de resistência para esse agente. Os resultados obtidos no presente estudo diferem dos resultados citados, uma vez que foi observada resistência de 3,28% à gentamicina nas amostras testadas.

Uma alta taxa de resistência a sulfadoxina (98%) foi detectada neste estudo, mostrando que esta não é uma opção adequada para o tratamento das mastites por *S. agalactiae* no Brasil. Rajala-Shultz et al. (2004) encontraram 86,4% de resistência a sulfadimetoxine em *Streptococcus* isolados de casos de mastite bovina nos Estados Unidos, antimicrobiano semelhante à sulfadoxina testada no presente estudo. Estes antibióticos normalmente não são utilizados nos tratamentos de mastite, e quando utilizados, são associados a outros como o trimetoprim. Em humanos, as sulfonamidas, o trimetoprim e suas associações não são recomendados para o tratamento das infecções materno fetais por *S. agalactiae* (BROCHET et al., 2008).

Os determinantes genéticos de resistência avaliados neste trabalho têm sido bastante descritos em *S. agalactiae* e os resultados encontrados estão em acordo com os dados da literatura.

Os genes *ermA* e *ermB* medeiam fenótipos de resistência cruzada a eritromicina e a clindamicina. Neste trabalho, *ermB* foi encontrado em 19% das amostras e sua presença foi associada à resistência à eritromicina e à

clindamicina, enquanto *ermA* não foi encontrado. Têm sido descrito que *ermB* é o determinante *erm* mais frequente em *S. agalactiae* bovino, enquanto *ermA* é mais frequente em amostras de humanos (DUTRA et al., 2014; DUARTE et al., 2004). Foram encontrados seis isolados com fenótipo de resistência para a eritromicina e para a clindamicina que não apresentavam *ermA* ou *ermB*. Isto pode ter ocorrido porque existe uma grande variedade de mecanismos genéticos associados com um único fenótipo de resistência, neste caso, esses isolados poderiam abrigar determinantes menos frequentes como *ermC*, *ermF* e *ermT*, todos já descritos em *Streptococcus* (ROBERTS, 2008).

O determinante de resistência à tetraciclina, o *tetO* (32,7%) foi mais frequente neste trabalho que *tetM* (14,7%), sendo que ambos foram associados ao fenótipo de resistência à tetraciclina. Esses determinantes têm sido os mais frequentemente descritos em *S. agalactiae*, tanto em bovinos como em humanos (PINTO et al., 2014; DUTRA et al., 2014; DUARTE et al., 2005; DOGAN et al., 2005). Outros, menos frequentes, como *tetS* e *tetK* também têm sido encontrados (RATO et al., 2013; DUARTE et al., 2004). Em dois dos isolados estudados com fenótipo de resistência à tetraciclina, não foi encontrado *tetM* ou *tetO*, sugerindo que outro determinante, como *tetS* e *tetK* poderia estar presente e deveria ser investigado nessa população. Um dos isolados avaliados possuía *tetO* e *tetM*, associações desse tipo também foram encontradas por Duarte et al. (2004).

No presente estudo, foram encontrados dois isolados *ermB* positivos e um isolado *tetO* positivo que não apresentavam os fenótipos de resistência. As razões que levam à falta de expressão de alguns genes de resistência ainda precisam ser mais bem avaliadas, sendo que as explicações possíveis incluem promotores ausentes, fracos ou distantes e a presença de mutações (GAO et al., 2012).

Foi verificado que 91% das amostras que carregavam *tetO* também carregavam *ermB*. Esse tipo de associação já foi verificada anteriormente e tem sido descrito que a vigilância dos elementos genéticos relacionados à tetraciclina é importante, pois, frequentemente os genes *tet* se encontram nos mesmos elementos genéticos móveis que genes que codificam a resistência aos macrolídeos, lincosamidas e cloranfenicol (CHOPRA; ROBERTS, 2001). Há várias descrições de associação entre genes *tet* e *erm* presentes no mesmo elemento genético móvel em *Streptococcus pyogenes* e *Streptococcus pneumoniae* (VARALDO et al., 2009). Tal associação, no entanto, raramente tem sido avaliada em *S. agalactiae* (VARALDO et al., 2009; HAENNI et al., 2010), e pode ser subestimada.

O gene *mefA* não foi encontrado, porém também não foi observado o fenótipo M (resistência à eritromicina e susceptibilidade à clindamicina). Rato et al.(2013) e Palmeiro et al. (2010) também não detectaram o gene *mefA* e seu respectivo fenótipo M em suas coleções de *S. agalactiae* de origem bovina e humana, respectivamente.

Os genes *aphA3* e *aad6*, que conferem fenótipos de resistência aos aminoglicosídeos não foram detectados neste trabalho, estando estes resultados de acordo com a alta susceptibilidade descrita para gentamicina. Esses genes já foram descritos em amostras de *S. agalactiae* humanos e bovinos em outros países, estando nestes casos correlacionados a fenótipos de resistência a um ou mais antimicrobianos do grupo dos aminoglicosídeos (POYART et al., 2003; GAO et al., 2012), mas até o momento não existem relatos da detecção desses genes em amostras de *S. agalactiae* brasileiras.

Em resumo, o grupo de isolados de *S. agalactiae* bovino aqui estudado foi heterogêneo quanto à presença dos elementos genéticos de resistência estudados e na resistência fenotípica aos antimicrobianos. Os altos índices de resistência à tetraciclina, sulfonamida, clindamicina e eritromicina indicam a

limitação do uso terapêutico desses agentes antimicrobianos para o tratamento de vacas infectadas e sugere que medidas de controle e prevenção, incluindo o controle do uso de antimicrobianos, podem não estar sendo devidamente aplicadas nos rebanhos. Por outro lado, a susceptibilidade à penicilina, ao ceftiofur e à cefalotina mostra que os betalactâmicos e as cefalosporinas constituem boas opções profiláticas e terapêuticas para o controle das infecções intramamárias de bovinos.

O presente trabalho permitiu incrementar os conhecimentos sobre a virulência, difusão de determinantes genéticos de resistência e susceptibilidade aos antimicrobianos de *S. agalactiae* provenientes de casos de mastite bovina clínica e subclínica em rebanhos brasileiros. Os dados obtidos podem auxiliar o desenvolvimento de métodos de diagnóstico, profiláticos e terapêuticos para as patologias causadas pelo agente em questão, não só em bovinos, mas também em humanos e outros animais que podem ser acometidos por este agente.

## 6 CONCLUSÕES

Os resultados do estudo dos determinantes de virulência apontaram a existência de um núcleo comum entre as amostras de *S. agalactiae* de bovinos no Brasil representado pelos genes *cfb*, *hylB*, *fbsB* e PI-2 (principalmente PI-2b).

Com relação à resistência aos antimicrobianos, foram observados diferentes índices de resistência: eritromicina com 26,23%; tetraciclina, 47,54%; gentamicina, 3,28%; sulfonamida, 98,36% e clindamicina com 29,51%, por outro lado, todos os isolados foram susceptíveis à penicilina, ao ceftiofur e à cefalotina. Os determinantes genéticos de resistência encontrados e suas respectivas frequências foram *ermB* (19,67%), *tetO* (32,78%) e *tetM* (14,75%). Os genes *ermA*, *mefA*, *apha3* e *aad6* não foram detectados em nenhum dos isolados.

Este trabalho incrementou os conhecimentos sobre virulência e susceptibilidade aos antimicrobianos de amostras de *S. agalactiae* isolados de bovinos, auxiliando nas tomadas de decisão sobre os antimicrobianos mais eficientes para o tratamento das patologias causadas por esse agente e na identificação de isolados e ou fatores de virulência que possam ser utilizados na imunoprofilaxia da mastite bovina.

## REFERÊNCIAS

- AARESTRUP, F. M.; JENSEN, N. E. Prevalence and duration of intramammary infection in danish heifers during the peripartum period. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 80, n. 2, p. 307-312, Feb. 1997.
- AITKEN, S. L.; CORL, C. M.; SORDILLO, L. M. Immunopathology of mastitis: insights into disease recognition and resolution. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, London, v. 16, n. 4, p. 291–304, Dec. 2011.
- ÅKERSTEDT, M. et al. Protein degradation in bovine milk caused by *Streptococcus agalactiae*. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 79, n. 3, p. 297-303, Aug. 2012.
- AKHTAR, M. S.; KRISHNAN, M. Y.; BHAKUNI, V. Insights into the mechanism of action of hyaluronate lyase: role of C-terminal domain and Ca<sup>2+</sup> in the functional regulation of enzyme. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 281, n. 38, p. 28336-28344, Sept. 2006.
- ARAÚJO, B. B. et al. Extracellular matrix components and regulators in the airway smooth muscle in asthma. **The European Respiratory Journal**, London, v. 32, n. 1, p. 61-69, July 2008.
- ARESCOUG, T. et al. A proline-rich region with a highly periodic sequence in streptococcal  $\beta$ protein adopts the polyproline II structure and is exposed on the bacterial surface. **Journal Bacteriology**, Washington, v. 184, n. 22, p. 6376-6383, Nov. 2002.
- ARPINI, C. M. **Genes de virulência de *Streptococcus agalactiae* associados à mastite bovina em rebanhos de Minas Gerais**. 2011. 84 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

BAL, E. B. B.; BAYAR, S.; BAL, M. A. Antimicrobial susceptibilities of Coagulase-Negative Staphylococci (CNS) and Streptococci from bovine subclinical mastitis cases. **Journal of Microbiology**, Seoul, v. 48, n. 3, p. 267-274, June 2010.

BARLOW, J. Mastitis therapy and antimicrobial susceptibility: a multispecies review with a focus on antibiotic treatment of mastitis in dairy cattle. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, London, v. 16, n. 4, p. 383-407, Dec. 2011.

BARON, M. J.; KASPER, D. L. Anchors away: contribution of a glycolipid anchor to bacterial invasion of host cells. **The Journal of Clinical Investigation**, Oxford, v. 115, n. 9, p. 2325-2327, Sept. 2005.

BAR, D. et al. The cost of generic clinical mastitis in dairy cows as estimated by using dynamic programming. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 91, n. 6, p. 2205-2214, June 2008.

BELKUM, A. van et al. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. **Clinical Microbiology and Infection**: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Paris, v. 13, n. 3, p.1-46, 2007.

BENGTSSON, B. et al. Antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of acute clinical mastitis in dairy cows. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 136, n. 1-2, p. 142-149, Apr. 2009.

BENITES, N. R. Mastite subclínica: prejuízos causados e os custos de prevenção em propriedades leiteiras. **Revista do Núcleo Pesquisa da FAPESP: apoio à pesquisa em glândula mamária e produção leiteira**, São Paulo, v. 2, n. 2, p. 16-20, 1999.

BERNER, R. et al. Polymorphisms in the cell wall-spanning domain of the C protein  $\beta$ -antigen in clinical *Streptococcus agalactiae* isolates are caused by genetic instability of repeating DNA sequences. **Pediatrics Research**, Baltimore, v. 51, n. 1, p. 106-111, Jan. 2002.

BOLDUC, G. R. et al. The alpha C protein mediates internalization of group B *Streptococcus* within human cervical epithelial cells. **Cellular Microbiology**, Oxford, v. 4, n. 11, p. 751-758, Nov. 2002.

BOWATER, R. O. et al. Natural outbreak of *Streptococcus agalactiae* (GBS) infection in wild giant Queensland grouper, *Epinephelus lanceolatus* (Bloch), and other wild fish in northern Queensland, Australia. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 35, n. 3, p. 173–186, Mar. 2012.

BRADLEY, A. J. Bovine mastitis: an evolving disease. **The Veterinary Journal**, London, v. 164, n. 2, p. 116-128, Sept. 2002.

BRITO, J. R. F.; BRITO, M. A. V. **Programas de controle das mastites causadas por microrganismos contagiosos e do ambiente**. Juiz de Fora: EMBRAPA/CNPGL, 1998. 25 p.

BRITO, M. A. V. P. et al. Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários de vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 51, n. 2, p. 129-135, Apr. 1999.

BROCHET, M. et al. Genomic diversity and evolution within the species *Streptococcus agalactiae*. **Microbes and Infection**, Paris, v. 8, n. 5, p. 1227-1243, Apr. 2006.

BROCHET, M. et al. A naturally occurring gene amplification leading to sulfonamide and trimethoprim resistance in *Streptococcus agalactiae*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 190, n. 2, p. 672-680, 2008.

BROKER, G.; SPELLERBERG, B. Surface proteins of *Streptococcus agalactiae* and horizontal gene transfer. **International Journal of Medical Microbiology**, Jena, v. 294, n. 2-3, p. 169-175, Sept. 2004.

BROWN, M. B.; ROBERTS, M. C. Tetracycline resistance determinants streptococcal species isolated from the bovine mammary gland. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 29, n. 2, p. 173-180, Oct. 1991.

BURVENICH, C. et al. Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. **Veterinary Research**, Les Ulis, v. 34, n. 5, p. 521-564, Sept./Oct. 2003.

CARNEIRO, D. M. V. F.; DOMINGUES, P. F.; VAZ, A. K. Imunidade inata da glândula mamária bovina: resposta à infecção. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 6, p. 1934-1943, Sept. 2009.

CHOPRA, I.; ROBERTS, M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. **Microbiology Molecular Biology Reviews**, New York, v. 65, n. 2, p. 232-260, June 2001.

CLERMONT, D. et al. New tetracycline resistance determinants coding for ribosomal protection in streptococci and nucleotide sequence of *tet(T)* isolated from *Streptococcus pyogenes* A498. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, Washington, v. 41, n. 1, p.112–116, Jan. 1997.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests for bacteria isolated from animals**: approved standard. 3. ed. Wayne, 2008. v. 28, 99 p. (CLSI Document M31-A3, 8).

CORRÊA, A. B. A. et al. Pulsed-field gel electrophoresis, virulence determinants and antimicrobial susceptibility profiles of type la group B streptococci isolated from humans in Brazil. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n. 4, p. 599-603, jul. 2009.

CORRÊA, A. B. A. et al. The genetic diversity and phenotypic characterisation of *Streptococcus agalactiae* isolates from Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 106, n. 8, p. 1002-1006, dez. 2011.

CORRÊA, A. B. A. et al. Virulence characteristics of genetically related isolates of group B streptococci from bovines and humans. **Veterinary Microbiology**, London, v. 143, n. 2/4, p. 429-433, July 2010.

COSTA, E. O. et al. Infectious bovine mastitis caused by environmental organisms. **Journal of Veterinary Medicine**, Berlin, v. 45, n. 2, p. 65-71, Mar. 1998.

COSTA, G. M. **Mamite bovina em rebanhos leiteiros da região sul do estado de Minas Gerais**. 2008. 123 p. Tese (Doutorado em Veterinária – Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

COYNE, R. et al. On the validity of setting breakpoint minimum inhibitory concentration at one quarter of the plasma concentration achieved following oral administration of oxytetracycline. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 239, n. 1-4, p. 23-35, May 2004.

CURTIS, S. N.; KRAUSE, R. M. Antigenic relationships between groups B and G streptococci. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v.120, n. 4, p. 629-637, Oct. 1964.

DIPERSIO, L. P.; DIPERSIO, J. R. High rates of erythromycin and clindamycin resistance among OBGYN isolates of group B *Streptococcus*. **Diagnostic Microbiology Infection Disease**, New York, v. 54, n. 1, p. 79-82, Jan. 2006.

DMITRIEV, A. et al. Genetic heterogeneity of the pathogenic potentials of human and bovine Group B Streptococci. **Folia Microbiology**, Praha, v. 47, n. 3, p. 291-295, July 2002.

DOGAN, B. et al. Distribution of serotypes and antimicrobial resistance genes among *Streptococcus agalactiae* isolates from bovine and human hosts. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, n. 12, p.5899-5906, Dec. 2005.

DORAN, K. S.; LIU, G.; NIZET, V. Group B Streptococcal  $\beta$ -hemolysin/cytolysin activates neutrophil signaling pathways in brain endothelium and contributes to development of meningitis. **The Journal of Clinical Investigation**, Oxford, v. 112, n. 5, p. 736-744, Sept. 2003.

DORAN, K. S.; NIZET, V. Molecular pathogenesis of neonatal group B streptococcal infection: on longer in its infancy. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 54, n. 1, p. 23-31, Oct. 2004.

DRAMSI, S.; TRIEU-CUOT, P.; BIERNE, H. Sorting sortases: a nomenclature proposal for the various sortases of Gram-positive bacteria. **Research in Microbiology**, Netherlands, v. 156, n. 3, p.289-297, Apr. 2005.

DUARTE, R. S. et al. Distribution of antimicrobial resistance and virulence-related genes among Brazilian Group B streptococci recovered from bovine and human sources. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, Washington, v. 49, n. 1, p. 97-103, Jan. 2005.

DUARTE, R. S. et al. Phenotypic and molecular characteristics of *Streptococcus agalactiae* isolated recovered from milk of dairy cows in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, n. 9, p. 4214-4222, Sept. 2004.

DUTRA, V. G. et al. *Streptococcus agalactiae* in Brazil: serotype distribution, virulence determinants and antimicrobial susceptibility. **BMC Infectious Diseases**, London, v. 14, n. 14, p. 1-9, 2014.

ELLIOT, J. A.; FACKLAM, R. R.; RITCHTER, C. B. Whole-cell protein patterns of nonhemolytic group B, types 1b, streptococci isolated from humans, mice, cattle, frogs, and fish. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 28, n. 3, p. 628-630, Mar. 1990.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Produção, industrialização e comercialização (Produção)**. 2012. Disponível em: <<http://www.cnpqgl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/producao.php>> . Acesso em: 1 fev. 2015.

ERSKSINE, R. J.; WAGNER, S.; DEGRAVES, F. J. Mastitis therapy and pharmacology. **Clinical Veterinary of North America Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 19, n. 1, p. 109-138, Mar. 2003.

EVANS, J. J. et al. Characterization of  $\beta$ -haemolytic group B *Streptococcus agalactiae* in cultured seabream, *Sparus auratus* L., and wild mullet, *Liza klunzingeri* (Day), in Kuwait. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 25, n. 9, p. 505-13, Sept. 2002.

FERREIRA, J. L. et al. Bactérias causadoras de mastite subclínica em rebanhos leiteiros no município de Teresina, Piauí. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça, v. 8, n. 14, p. 1-13, jan. 2010.

FISCHETTI, V. A. Streptococcal M protein: molecular design and biological behavior. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 2, n. 3, p. 285-314, July 1989.

FLUIT, A. D. C. et al. Molecular detection of antimicrobial resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 14, p. 836-871, 2001.

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

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **The agricultural production domain**. 2013. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>> . Acesso em: 5 fev. 2015.

FROST, A. J.; WANASINGHE, D. D.; WOOLCOCK, J. B. Some factors affecting selective adherence of microorganisms in the bovine mammary gland. **Infection and Immunity**, Washington, v. 15, n. 1, p. 245-253, Jan. 1977.

GAO, J. et al. Antibiotic resistance of *Streptococcus agalactiae* from cows with mastitis. **The Veterinary Journal**, London, v. 194, n. 3, p. 423-424, Dec. 2012.

GARCIA, J. C. et al. Non-infectivity of cattle *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* and channel catfish, *Ictalurus punctatus*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 81, p. 151-154, Apr. 2008.

GASE, K.; OZEGOWSKI, J.; MALKE, H. The *Streptococcus agalactiae* *hylB* gene encoding hyaluronate lyase: completion of the sequence and expression analysis. **Biochimica Biophysica Acta**, Netherlands, v. 1398, n. 1, p. 86-98, May 1998.

GIBSON, R. L.; NIZET, V.; RUBENS, C. E. Group B Streptococcal  $\beta$ -hemolysin promotes injury of lung microvascular endothelial cells. **Pediatric Research**, Baltimore, v. 45, n. 5, Parte 1, p. 626-634, May 1999.

GLAZER, P. et al. Genome sequence of *Streptococcus agalactiae*, a pathogen causing invasive neonatal disease. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 45, n. 6, p. 1499-1513, Sept. 2002.

GODOY, D. T. et al. Genetic diversity and new genotyping scheme for fish pathogenic *Streptococcus agalactiae*. **Letters in Applied Microbiology**, Washington, v. 57, n. 6, p. 476-483, Dec. 2013.

GRAVEKAMP, C.; ROSNER, B.; MADOFF, L. C. Deletion of repeats in the alpha c protein enhances the pathogenicity of group B streptococci in immune mice. **Infection and Immunity**, Washington, v. 66, n. 9, p.4347-4354, Sept. 1998.

GUÉRIN-FAUBLÉE, V. et al. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus* species isolated from clinical mastitis in dairy cows. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 19, n. 3, p. 219-226, Mar. 2002.

GUTEKUNST, H.; EIKMANN, B. J.; REINSCHEID, J. The novel fibrinogen-binding protein FbsB promotes *Streptococcus agalactiae* invasion into epithelial cells. **Infection and Immunity**, Washington, v. 72, n. 6, p.3495-3504, June 2004.

HAENNI, M. et al. Diversity and mobility of integrative and conjugative elements in bovine isolates of *Streptococcus agalactiae*, *S.dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*, and *S. uberis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 24, p. 7957-7965, Dec. 2010.

HALASA, T. et al. Production loss due to new subclinical mastitis in Dutch dairy cows estimated with a test-day model. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 92, n. 2, p. 599–606, Feb. 2009.

HILLERTON, J. E.; BERRY, E. A. Treating mastitis in the cow – a tradition or an archaism. **Journal of Applied Microbiology**, Washington, v. 98, n. 6, p. 1250–1255, Sept. 2005.

HILLERTON, J. E. et al. *Streptococcus agalactiae* infection in dairy cows. **Veterinary Record**, London, v. 154, n. 21, p. 671-672, May 2004.

HOGAN, J. S.; SMITH, K. L. Coliform mastitis. **Veterinary Research**, Les Ulis, v. 34, n. 5, p. 507-519, Sept./Oct. 2003.

HOGVEEN, H.; HUIJPS, K.; LAM, T. J. G. M. Economic aspects of mastitis: new developments. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 59, n. 1, p. 16-32, Jan. 2011.

HYNES, W. L.; WALTON, S. L. Hyaluronidases of Gram-positive bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 183, n. 2, p. 201-207, Feb. 2000.

JACOBSSON, K. A novel family of fibrinogen-binding proteins in *Streptococcus agalactiae*. **Veterinary Microbiology**, Netherlands, v. 96, n. 1, p. 103-113, Oct. 2003.

JAIN, B. et al. Antibiotic resistance and virulence genes in *Streptococcus agalactiae* isolated from cases of bovine subclinical mastitis. **Veterinarski Arhiv**, Zagreb, v. 82, n. 5, p. 423-432, 2012.

JARVA, H. et al. Complement resistance mechanisms of Streptococci. **Molecular Immunology**, Elmsford, v. 40, n. 2/4, p. 95-107, Sept. 2003.

JOHNSON, D. R.; FERRIERI, P. Group B streptococcal Ibc protein antigen: distribution of two determinants in wild-type strains of common serotypes. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 19, n. 4, p. 506-510, Apr. 1984.

JOHRI, A. K. et al. Group B *Streptococcus*: global incidence and vaccine development. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 4, n. 12, p. 932-942, Dec. 2006.

JONSSON, I. et al. Role of fibrinogen-binding adhesin expression in septic arthritis and septicemia caused by *Streptococcus agalactiae*. **Journal of Infectious Disease**, Oxford, v. 192, n. 8, p. 1456-1464, 2005.

JURGENS, D.; STERZIK, B.; FEHRENBACH, F. J. Unspecific binding of group B Streptococcal cocytolysin (CAMP factor) to immunoglobulins and its possible role in pathogenicity. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 165, n. 3, p. 720-732, Mar. 1987.

KEEFE, G. Update on Control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for management of mastitis. **Veterinary Clinics Food Animal**, Philadelphia, v. 28, n. 2, p. 203-216, July 2012.

KONTO-GHIORGHI, Y. et al. Dual role for pilus in adherence to epithelial cells and biofilm formation in streptococcus agalactiae. **PLOS Pathogens**, San Francisco, v. 5, n. 5, p. 1-13, May 2009.

KRUSE, H.; SORUM, H. Transfer of multiple drug resistance plasmids between bacteria of diverse origins in natural microenvironments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 11, p. 4051-4021, Nov. 1994.

LACHENAUER, C. S. et al. Mosaicism in the alpha-like protein genes of group B streptococci. **Proceedings of the National Academy Sciences**, v. 97, n. 17, p. 9630-9635, Aug. 2000.

LANCEFIELD, R. D. Serological differentiation of human and other groups of haemolytic streptococci. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 57, n. 4, p. 571-595, Mar. 1933.

LANCEFIELD, R. D. Serological differentiation of specific types of bovine haemolytic streptococci (Group B). **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 59, n. 4, p. 444-458, Mar. 1934.

LANG, S.; PALMER, M. Characterization of *Streptococcus agalactiae* CAMP factor as a pore-forming toxin. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 278, n. 40, p. 38167-38173, Oct. 2003.

LAUER, P. et al. Genome analysis reveals pili in Group B Streptococcus. **Science**, New York, v. 309, n. 5731, p. 105-106, July 2005.

LEVY, S.B. et al. Nomenclature for new tetracycline resistance determinants. **Antimicrobial Agents e Chemotherapy**, Washington, v.43, n. 6, p. 1523-1524, June 1999.

LI, J. et al. Inactivation of the a C protein antigen gene, bca, by a novel shuttle/suicide vector results in attenuation of virulence and immunity in group B streptococcus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 24, p. 133251-13256, Nov. 1997.

LI, S.; JEDRZEJAS, M. J. Hyaluronan binding and degradation by *Streptococcus agalactiae* hyaluronate lyase. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 276, n. 44, p. 41407-41416, Nov. 2001.

LIN, F. et al. Commonly used molecular epidemiology markers of *Streptococcus agalactiae* do not appear to predict virulence. **Pathology**, Sidney, v. 41, n. 6, p. 576-581, Jan. 2009.

LINDAHL, G.; STÄLHAMMAR-CARLEMALM, M.; ARESCHOUG, T. Surface proteins of *Streptococcus agalactiae* and related proteins in other bacterial pathogens. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 18, n. 1, p. 102-127, Jan. 2005.

LINDEMAN, C. J. et al. Susceptibility to antimicrobial agents among bovine mastitis pathogens isolated from North American dairy cattle, 2002-2010. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 25, n. 5, p. 581-591, Sept. 2013.

LIST OF PROKARYOTIC NAMES. **Genus *Streptococcus***. 2015. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/streptococcus.html>>. Acesso em: 3 fev. 2015.

LIU, G. Y.; NIZET, V. Extracellular virulence factors of group B Streptococci. **Frontiers in Bioscience**, New York, v. 9, p. 1794-1802, May 2004.

LIU, G; ZHANG, W; LU, C. Comparative genomics analysis of *Streptococcus agalactiae* reveals that isolates from cultured tilapia in China are closely related to the human strain A909. **BMC Genomics**, v. 14, n. 775, p. 1-10, Nov. 2013.

LOCH, I. M. et al. Macrolide and lincosamide resistance genes of environmental streptococci from bovine milk. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 111, n. 1-2, p.133-138, Nov. 2005.

LOPES, M. A. et al. Avaliação do impacto econômico da mastite em rebanhos bovinos leiteiros. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 79, n. 4, p. 477-483, 2012.

LUNA, V. A. et al. A variety of gram-positive bacteria carry mobile *mef* genes. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 44, n. 1, p. 19-25, July 1999.

MADOFF, L. C. et al. Maternal immunization of mice with group B streptococcal type III polysaccharide-beta C protein conjugate elicits protective antibody to multiples serotypes. **The Journal of Clinical Investigation**, Oxford, v. 94, n. 1, p. 286-292, July 1994.

MAIONE, D. et al. Identification of a Universal Group B *Streptococcus* Vaccine by Multiple Genome Screen. **Science**, Washington, v. 309, n. 5731, p. 148-150, July 2005.

MAISEY, H. C.; DORAN, K. S.; NIZET, V. R. Recent advances in understanding the molecular basis of group B *Streptococcus* virulence. **Expert Reviews Molecular Medicine**, Cambridge, v. 10, n. 27, p. 1-16, Sept. 2008.

MAISEY, H. C. et al. Group B Streptococcal Pilus proteins contribute to adherence to and invasion of brain microvascular endothelial cells. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 189, n. 4, p. 1464-1467, Feb. 2007.

MAISEY, H. C. et al. Group B Streptococcal Pilus protein promote sphagocyte resistance and systemic virulence. **The FASEB Journal**, Bethesda, v. 22, p. 1715-1724, June 2008.

MARESSO, A. W.; SCHNEEWIND, O. Sortase as a target of anti-infective therapy. **Pharmacological Reviews**, Baltimore, v. 60, n. 1, p. 128-141, Mar. 2008.

MARGARIT, I. et al. Preventing bacterial infections with pilus-based vaccines: the Group B *Streptococcus* paradigm. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 199, n. 1, p. 108-115, Jan. 2009.

MARTINEZ, J. L.; BAQUERO, F. Mutation frequencies and antibiotic resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 44, n. 7, p. 1771-1777, July 2000.

MARTINEZ, J. L. et al. A global view of antibiotic resistance. **FEMS Microbiology Review**, Delf, Holanda, v. 33, n. 1, p. 44-65, Jan. 2009.

MARTINS, E. R. et al. Distribution of pilus islands in *Streptococcus agalactiae* that cause human infections: insights into evolution and implication for vaccine development. **Clinical Vaccine Immunology**, Washington, v. 20, n. 2, p. 313-316, Feb. 2013.

MARTINS, E. R. et al. Evidence for rare capsular switching in *Streptococcus agalactiae*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 192, n. 5, p. 1361-1369, Mar. 2010.

MERL, K. et al. Determination of epidemiological relationships of *Streptococcus agalactiae* isolated from bovine mastitis. **FEMS Microbiology Letters**, London, v. 226, n. 1, p.87-92, Sept. 2003.

MICHEL, J. L. et al. Cloned alpha and beta C-protein antigens of group B streptococci elicit protective immunity. **Infection and Immunity**, Washington, v. 59, n. 6, p. 2023-2028, June 1991.

MILLER, R. A. **Development of standardized antimicrobial susceptibility testing methods and *Aeromonas salmonicida* epidemiologic cutoff values for antimicrobial agents used in aquaculture.** 2007. 186p. Tese (Doctor of Philosophy) – University of Maryland, Beltimore, 2007.

MINST, K. et al. Short communication: *Streptococcus* species isolated from mastitis milk samples in Germany and their resistance to antimicrobial agents. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 95, n. 12, p. 6957-6962, Dec. 2012.

MYLLYS, V. et al. Association of changes in the bacterial ecology of bovine mastitis with changes in the use of milking machines and antibacterial drugs. **Acta Veterinaria Scandinavica**, Copenhagen, v. 35, n. 4, p. 363-369, 1994.

MUELLNER, P. et al. The integration of molecular tools into veterinary and spatial epidemiology. **Spatial and Spatio-temporal Epidemiology**, Philadelphia, v. 2, n. 3, p. 159-171, Sept. 2011.

NAKIB, M. A. et al. Comparison of the Diversilab® system with multi-locus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis for the characterization of *Streptococcus agalactiae* invasive strains. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 85, n. 2, p. 137–142, May 2011.

NIZET, V. Streptococcal hemolysins: genetics and role in disease pathogenesis. **Trends in Microbiology**, Netherlands, v. 10, n. 12, p. 575-580, Dec. 2002.

OLIVEIRA, C. M. et al. Prevalência e etiologia da mastite bovina na bacia leiteira de Rondon do Pará, Estado do Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 2, p. 104-110, Feb. 2011.

OLIVER, S. P.; MURINDA, S. E. Antimicrobial resistance of mastitis pathogens. **Veterinary Clinics of North America-Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 28, n. 2, p. 165- 185, July 2012.

PALMEIRO, J. K. et al. Phenotypic and genotypic characterization of group B streptococcal isolates in southern Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 48, n. 12, p. 4397-4403, Dec. 2010.

PAPASERGI, S. P. et al. The GBS PI-2a Pilus is required for virulence in miceneonates. **Plos One**, San Francisco, v. 6, n. 4, p. e18747, Apr. 2011.

PEREIRA, U. P. et al. Genotyping of *Streptococcus agalactiae* strains isolated from fish, human and cattle and their virulence potential in Nile tilapia. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 140, n. 1-2, p. 186-192, Jan. 2010.

PETON, V.; LOIR, Y. L. *Staphylococcus aureus* in veterinary medicine. **Infection, Genetics and Evolution**, Linn, v. 21, p. 602–615, Jan. 2014.

PEZZICOLI, A. et al. Pilus backbone contributes to group B *Streptococcus* paracellular translocation through epithelial cells. **The Journal of Infectious Diseases**, Oxford, v. 198, n. 6, p. 890-898, Sept. 2008.

PIERNO, M. et al. FbsA-driven fibrinogen polymerization: a bacterial “deceiving strategy”. **Physical Review Letters**, v. 96, n. 2, p. 028108, Jan. 2006.

PIETERSE, R.; TODOROV, S. D. Bacteriocins – exploring alternatives to antibiotics in mastitis treatment. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 41, n. 3, p. 542-562, July 2010.

PIETROCOLA, G. et al. FbsA, a fibrinogen-binding protein from *Streptococcus agalactiae*, mediates platelet aggregation. **Blood**, New York, v. 105, n. 3, p. 1052-1059, Feb. 2005.

PINTO, T. C. A. et al. Conjugative transfer of resistance determinants among human and bovine *Streptococcus agalactiae*. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 45, n. 3, p. 785-789, Oct. 2014.

PINTO, T. C. A. et al. Distribution of serotypes and evaluation of antimicrobial susceptibility among human and bovine *Streptococcus agalactiae* strains isolated in Brazil between 1980 and 2006. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 17, n. 2, p. 131-136, Mar./Apr. 2013.

POYART, C. et al. Conjugative transposition of Tn916-related elements from *Enterococcus faecalis* to *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, Washington, v. 39, n. 2, p. 500-506, Feb. 1995.

POYART, C. et al. Genetic basis of antibiotic resistance in *Streptococcus agalactiae* strains isolated in a French hospital. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, Washington, v. 47, n. 2, p. 794-797, Feb. 2003.

POYART-SALMERON, C. et al. Transferable plasmid-mediated antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes*. **The Lancet**, London, v. 335, n. 8703, p. 1422-1426, June 1990.

RAJAGOPAL, L. Understanding the regulation of group B Streptococcal virulence factors. **Future Microbiology**, London, v. 4, n. 2, p. 201-221, Feb. 2009.

RAJALA-SCHULTZ, P. J. et al. Antimicrobial susceptibility of mastitis pathogens from first lactation and older cows. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 102, n. 1-2, p. 33-42, Aug. 2004.

RANJAN, R. et al. Bovine protothecal mastitis: a review. **CAB Reviews: perspectives in agriculture, veterinary sciences, nutrition and natural resources**, Wallingford, v. 1, n. 17, p. 1-7, 2006.

RATO, M. G. et al. Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of streptococci from bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 161, n. 3-4, p. 286-294, Jan. 2013.

RIBEIRO, M. G. et al. Fatores de virulência em linhagens de *Escherichia coli* isoladas de mastite bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, n. 5, p. 724-731, 2006.

RICHARDS, V. P. et al. Comparative genomics and the role of lateral transfer in the evolution of bovine adapted *Streptococcus agalactiae*. **Infection Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 11, n. 6, p. 1263-1275, Aug. 2011.

RICHARDS, V. P. et al. Phylogenomics and dynamic genome evolution of the Genus *Streptococcus*. **Genome Biology and Evolution**, Oxford, v. 6, n.4, p.741-753, Apr. 2014.

RIEKERINK, R. G. M. O. et al. Incidence rate of clinical mastitis on Canadian dairy farms. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 91, n. 4, p. 1366-1377, Apr. 2008.

RINAUDO, C. D. et al. Specific involvement of pilus type 2a in biofilm formation in group B *Streptococcus*. **PLoS One**, San Francisco, v. 5, p. e9216, 2010.

ROBERTS, M. C. et al. Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide- streptogramin B resistance determinants. **Antimicrobial Agents e Chemotherapy**, Washington, v. 43, n. 12, p. 2823-2830, Dec. 1999.

ROBERTS, M. C. Tetracycline resistance determinants:mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. **FEMS Microbiology Review**, Delf, Holanda, v. 19,n. 1, p. 1-24, Oct. 1996.

ROBERTS, M. C. Update on macrolide-lincosamide-streptogramin, ketolide and oxazolidinone resistance genes. **FEMS Microbiology Letters**, Delf, Holanda, v. 282, n. 2, p.147-159, May 2008.

ROLLAND, K. et al. Genetic features of *Streptococcus agalactiae* strains causing severe neonatal infections, as revealed by pulse-field gel electrophoresis and hylB gene analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n. 6, p. 1892-1898, June 1999.

ROSENAU, A. et al. Evaluation of the ability of *Streptococcus agalactiae* strains isolated from genital and neonatal specimens to bind to human fibrinogen and correlation with characteristics of the *fbsA* and *fbsB* genes. **Infection and Immunity**, Washington, v. 75, n. 3, p. 1310–1317, Mar. 2007.

ROSINI, R. et al. Identification of novel genomic islands coding for antigenic pilus-like structures in *Streptococcus agalactiae*. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 61, n. 1, p. 126-141, July 2006.

SADOWY, E. et al. Population structure, virulence factors and resistance determinants of invasive, non-invasive and colonizing *Streptococcus agalactiae* in Poland. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 65, n. 9, p. 1907-1914, Sept. 2010.

SALYERS, A. A. et al. Conjugative transposons: an unusual and diverse set of integrated gene transfer elements. **Microbiology**, New York, v. 59, n. 4, p. 579-590, Dec. 1995.

SAMEN, U. et al. Rga is a regulator of adherence 1 and pili formation in *Streptococcus agalactiae*. **Microbiology**, New York, v. 157, Parte 8, p. 2319-2327, Aug. 2011.

SANTI, I. et al. BibA: a novel immunogenic bacterial adhesin contributing to group B *Streptococcus* survival in human blood. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 63, n. 3, p. 754–767, Feb. 2007.

SANTI, I. et al. Bib A induces opsonizing antibodies conferring in vivo protection against group B *Streptococcus*. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 200, n. 4, p. 564-570, Aug. 2009.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. **Estratégias para controle da mastite e melhoria da qualidade do leite**. São Paulo: Manole, 2007. 314 p.

SCHUBERT, A. et al. Fibrinogen receptor FbsA promotes adherence of *Streptococcus agalactiae* to human epithelial cells. **Infection and Immunity**, Washington, v. 72, n. 11, p. 6197-6205, Nov. 2004.

SCHWARZ, S. et al. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 17, n. 6, p. 431-437, June 2001.

SHEWMAKER, P. L. et al. *Streptococcus ictaluri* sp. nov., isolated from channel catfish *Ictalurus punctatus* broodstock. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Washington, v. 57, Parte 7, p. 1603-1606, July 2007.

SORDILLO, L. M. New concepts in the causes and control of mastitis. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, London, v. 16, n. 4, p. 271-273, Dec. 2011.

SORENSEN, U. B. S. et al. Emergence and global dissemination of host-specific *Streptococcus agalactiae* clones. **mBio**, Washington, v. 1, n. 3, e00178, Aug. 2010.

SORIANI, M.; TELFORD, J. L. Relevance of pili in pathogenic streptococci pathogenesis and vaccine development. **Future Microbiology**. London, v. 5, n. 5, p. 735-747, May 2010.

SPELLERBERG, B. et al. Lmb, a protein with similarities to the LraI adhesin family, mediates attachment of *Streptococcus agalactiae* to human laminin. **Infection and Immunity**, Washington, v. 67, n. 2, p. 871-878, Feb. 1999.

SPRINGMAN, A. C. et al. Pilus distribution among lineages of group b streptococcus: an evolutionary and clinical perspective. **BMC Microbiology**, London, v. 14, p. 159-170, June 2014.

SPRINGMAN, A. C. et al. Selection recombination and virulence genes among group B streptococcal genotype. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 191, n. 17, p. 5419-5427, Sept. 2009.

SUKHNANAND, S. et al. Molecular subtyping and characterization of bovine and human *Streptococcus agalactiae* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, n. 3, p. 1177-1186, Mar. 2005.

SUTCLIFFE, J. et al. Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 40, n. 11, p. 2562-2566, Nov. 1996.

TENHAGEN, B. A. et al. Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 89, n. 7, p. 2542–2551, July 2006.

TENOVER, F. et al. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *S.aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 32, n. 2, p. 407-415, Feb. 1994.

TEUBER, M. Veterinary use and antibiotic resistance. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 4, n. 5, p. 493–499, Oct. 2001.

UDO, E. E.; BOSWIHI, S. S.; AL-SWEIH, N. Genotypes and virulence genes in Group B *Streptococcus* isolated in the Maternity Hospital, Kuwait. **Medical Principles and Practice**. Kuwait, v. 22, n. 5, p. 453-457, Apr. 2013.

VARALDO, P. E. et al. Genetic elements responsible for erythromycin resistance in streptococci. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 2, p. 343-353, Feb. 2009.

VASI, J. et al. M-like proteins of *Streptococcus dysgalactiae*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 68, n. 1, p. 294-302, Jan. 2000.

VECINI, J. F.; PATRÍCIO, R. F.; CIARLINI, P. C. Importância do fibrinogênio plasmático na identificação de processos inflamatórios de cães. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, Recife, v. 9, n. 1, p. 31-35, jan./abr. 2006.

VEIGA, V. M. O. **Diagnóstico da mastite bovina**. Juiz de Fora: EMBRAPA-CNPGL-ADT, 1998. 24 p. (Circular Técnica, 51).

VERANI, J. R.; MCGEE, L; SCHRAG, S. J. **Prevention of Perinatal Group B Streptococcal disease** – revised guidelines from CDC, 2010. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention/Division of Bacterial Diseases, National Center for Immunization and Respiratory Diseases, 2010. p. 1-32. (MMWR Recommendations and Reports, 59).

VIGUIER, C. et al. Mastitis detection: current trends and future perspectives. **Trends in Biotechnology**, Philadelphia, v. 27, n. 8, p.486-493, Aug. 2009.

VINTOV, J. et al. Association between phage types and antimicrobial resistance among bovine *Staphylococcus aureus* from 10 countries. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 95, n. 1-2, p. 133-147, Aug. 2003.

WANG, Z. et al. Two novel functions of hyaluronidase from *Streptococcus agalactiae* are enhanced intracellular survival and inhibition of proinflammatory cytokine expression. **Infection and Immunity**, Washington, v. 82, n. 6, p. 2615-2625, June 2014.

WASTFELT, M. et al. The Rib and alpha proteins define a family of group B streptococcal surface proteins that confer protective immunity. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, New York, v. 418, p. 619-622, 1997.

WILLIAMSON, M. P. The structure and function of proline-rich regions in proteins. **The Biochemical Journal**, London, v. 297, Parte 2, p. 249-260, Jan. 1994.

WITTE, W. Ecological impact of antibiotic use in animals on different complex microflora: environment. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 14, n. 4, p. 321–325, May 2000.

YANG, Y. et al. Molecular characterization of *Streptococcus agalactiae* isolated from bovine mastitis in Eastern China. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 7, p. e67755, July 2013.

YILDIRIM, A. O.; FINK, K.; LAMMLER, C. H. Distribution of the hyaluronate lyase encoding gene *hylB* and the insertion element *IS1548* in streptococci of serological group B isolated from animals and humans. **Research in Veterinary Science**, London, v. 73, n. 2, p. 131-135, Oct. 2002.

ZADOCKS, R. N. et al. Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and comparative relevance to humans. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, London, v. 16, n. 4, p. 357–372, Dec. 2011.

ZAFALON, L. F. Influência de bactérias do gênero *Corynebacterium* e estafilococos coagulase positivos e negativos sobre a contagem de células somáticas e a produção láctea de quartos mamários com mastite subclínica. **Revista do Núcleo Pesquisa da FAPESP: apoio à pesquisa em glândula mamária e produção leiteira**, São Paulo, v. 2, n. 6, p. 4-6, 1999.