



RAFAEL AMBRÓSIO LOURES

**DIVERSIDADE GENÉTICA, FATORES DE
VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA A
ANTIMICROBIANOS EM *Streptococcus uberis*
ISOLADOS DE MASTITE BOVINA**

LAVRAS – MG

2011

RAFAEL AMBRÓSIO LOURES

**DIVERSIDADE GENÉTICA, FATORES DE VIRULÊNCIA E
RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS EM *Streptococcus uberis*
ISOLADOS DE MASTITE BOVINA**

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

LAVRAS – MG

2011

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Loures, Rafael Ambrósio.

Diversidade genética, fatores de virulência e resistência a antimicrobianos em *Streptococcus uberis* isolados de mastite bovina / Rafael Ambrósio Loures. – Lavras : UFLA, 2011.

90 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: Geraldo Márcio da Costa.

Bibliografia.

1. Mastite ambiental. 2. PFGE. 3. Ativadores de plasminogênio.
4. Molécula de adesão. 5. Concentração inibitória mínima. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 636.2089692

RAFAEL AMBRÓSIO LOURES

**DIVERSIDADE GENÉTICA, FATORES DE VIRULÊNCIA E
RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS EM *Streptococcus uberis*
ISOLADOS DE MASTITE BOVINA**

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 28 de janeiro de 2011.

Dra. Ana Paula Peconick	UFLA
Dra. Gláucia Frasnelli Mian	UFLA
Dra. Sandra Maria Pinto	UFLA

Dr. Geraldo Márcio da Costa
Orientador

**LAVRAS – MG
2011**

Aos meus pais, Alfredo e Alzira

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, Senhor de tudo. Princípio e Fim.

Ao Professor Geraldo Márcio da Costa, pela confiança, amizade e pelas orientações na realização deste trabalho.

A minha família. Aos meus pais, Alfredo e Alzira, pelo amor incondicional. Por serem a base da minha vida.

Aos meus irmãos, Tiago, Filipe e Marcos, pontos de apoio nas dificuldades. Aos familiares que me incentivaram.

A minha namorada Elisângela, por dividir comigo cada momento, sempre motivando meu trabalho. A sua família, Toninho, Nair, Rogério, Elisângela, Rosemeire e Germano pelo apoio e pelas orações.

Aos professores da Universidade Federal de Lavras em especial aos professores Christian Hirsch, Gláucia Mian e Patrícia Gomes Cardoso, pelos ensinamentos, conselhos e orientações.

Às professoras Dra. Ana Paula Peconick, Dra. Gláucia Frasnelli Mian, Dra. Sandra Maria Pinto, membros da comissão avaliadora, pelas correções e contribuição no trabalho.

Aos colegas de Pós-Graduação e funcionários do DMV pela convivência agradável nesse período.

Aos amigos do Laboratório de Bacteriologia, incluindo os estagiários e pós-graduandos que por lá passaram nesse tempo. Em especial a Dircéia Aparecida da Costa Custódio e Ulisses de Pádua Pereira pela enorme contribuição na execução desse trabalho.

Agradeço a todos aqueles que passaram pelo meu caminho e que, de uma forma ou outra, foram importantes na minha vida. São pessoas especiais que não preciso indicar seus nomes, pois elas sabem quais são.

RESUMO

Streptococcus uberis é um importante patógeno ambiental associado à mastite bovina, responsável por grande proporção das infecções. Apesar da crescente importância, a patogênese das infecções ocasionadas por este agente ainda é pouco conhecida. Estudos moleculares e genéticos do patógeno podem contribuir muito para melhorar o conhecimento sobre a patogenia, permitindo identificar moléculas que tenham papel relevante no estabelecimento da infecção, fornecendo informações importantes para a adoção de medidas mais eficazes para o controle e a prevenção da doença. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) tem sido utilizado com sucesso no objetivo de fornecer informações sobre a epidemiologia de *S. uberis*. Informações de susceptibilidade aos antimicrobianos podem ser valiosas na eleição de fármacos adequados no tratamento da mastite por *S. uberis*. Neste estudo, *S. uberis* isolados de mastite bovina na região sul do estado de Minas Gerais, no Brasil, foram investigados com o objetivo de descrever o perfil genético por PFGE e a frequência de importantes genes de virulência desses patógenos, *pauA*, *skc* e *sua*. Os resultados mostraram alta frequência dos genes de virulência pesquisados e grande diversidade genética da população de *S. uberis* estudada. Também se pesquisou a susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados pela determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Foi determinada a CIM para 50% e 90% dos *S. uberis* para ampicilina, cefalotina, ceftiofur, enrofloxacina, estreptomicina, florfenicol, gentamicina, lincomicina, penicilina e tetraciclina. Encontrou-se níveis elevados de resistência a estreptomicina e baixos níveis de resistência aos demais antimicrobianos testados.

Palavras-chave: Mastite bovina. *Streptococcus uberis*. Diversidade genética. Fatores de virulência. Concentração inibitória mínima

ABSTRACT

Bovine mastitis is a multifactorial disease in whose etiology are involved different agents that can be classified as contagious or environmental. *Streptococcus uberis* is an important environmental pathogen associated with bovine mastitis, responsible for a large proportion of infections. Despite the increased importance, the pathogenesis is still unknown. Searches of genetic and molecular characteristics of the pathogen can do much to improve the knowledge about bacterial activity and identify molecules that have definite role in the establishment of infection, to propose effective measures to control and disease prevention. *Pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE) has been used successfully for the purpose of providing information on the epidemiology of *S. uberis*. Information about antimicrobial susceptibility can be valuable in the election of suitable drugs for the treatment of mastitis by *S. uberis*. In this study, *S. uberis* isolated from bovine mastitis in the southern state of Minas Gerais, Brazil, were investigated in order to describe the genetic profile by PFGE and the frequency of important virulence genes of these pathogens, *sua*, *pauA* e *skc*. The results showed a high frequency of the virulence genes and great genetic diversity of *S. uberis* studied. Also searched was the antimicrobial susceptibility of isolates by determining the minimum inhibitory concentration (MIC). We determined the MIC for 50% and 90% of *S. uberis* researched to ampicillin, cephalothin, ceftiofur, enrofloxacin, streptomycin, florfenicol, gentamicin, lincomycin, penicillin and tetracycline. It was found elevated levels of resistance to streptomycin and low levels of resistance to other antimicrobials.

Keywords: Bovine mastitis. *Streptococcus uberis*. Genetic diversity. Virulence factors. Minimum inhibited concentration.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 Resultado de PCR para identificação genotípica de *Streptococcus uberis*. Produto de amplificação (1,2,3) obtidos com *primers Stru-ubi* e *Stru-ubiII* espécie-específicos de *Streptococcus uberis*. As amostras 4 5 e 6 são referentes a amostras que apresentaram resultado negativo na PCR. *Streptococcus sp.* (7) foi utilizado como controle negativo56
- Figura 2 Resultado de PCR para detecção do gene *sua* em *Streptococcus uberis*. Produto de amplificação com tamanho 942pb utilizando *primers* específicos para o gene *sua* de *Streptococcus uberis*. Reação sem adição de DNA molde foi usada como controle negativo (12).....57
- Gráfico 1 Frequência dos genes *pauA* e *skc* em *Streptococcus uberis* associados a mastite bovina.....59
- Figura 3 Resultados de PCR para detecção de genes *pauA* e *skc* de *Streptococcus uberis*. a) produtos de amplificação com tamanho de 800pb gerados com uso de *primers* p38 e p39 direcionados para o gene *pauA* (1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7) b) produtos de amplificação com tamanho 1130pb gerados com uso de *primers* *skc-I* e *skc-II* específicos para o gene *skc* de *Streptococcus uberis* (1, 3, 4, 6, 7, 8). Reações sem a adição de DNA molde foram empregadas como controle negativo (8 em a e 2 em b)61
- Figura 4 Resultado de PFGE de *Streptococcus uberis*. Letras iguais com números diferentes identificam cepas geneticamente relacionadas, letras iguais com números iguais identificam isolados indistinguíveis. Retângulos delimitam isolados de um mesmo rebanho64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	CIM de alguns antimicrobianos para <i>S. uberis</i> relatados na literatura	35
Tabela 2	Intervalos de diluição dos antimicrobianos usados na determinação da concentração inibitória mínima para <i>Streptococcus uberis</i> associados a mastite bovina	77
Tabela 3	Distribuição da concentração inibitória mínima (CIM) de nove antibióticos para 47 <i>Streptococcus uberis</i> associados à mastite bovina em rebanhos leiteiros no sul de Minas Gerais, Brasil	79

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 <i>Streptococcus uberis</i>, um patógeno emergente da mastite bovina	11
1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	Bovinocultura leiteira no Brasil	15
2.2	Mastite na bovinocultura	16
2.2.1	Mastites ambientais	18
2.3	<i>Streptococcus uberis</i>	19
2.4	Diversidade genética e epidemiologia molecular	23
2.5	Fatores de virulência	27
2.6	Resistência aos antimicrobianos	31
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS	37
	REFERÊNCIAS	38
	CAPÍTULO 2 Fatores de virulência e diversidade genética de <i>Streptococcus uberis</i> isolados de mastite bovina no sul de Minas Gerais	47
1	INTRODUÇÃO	49
2	MATERIAL E MÉTODOS	52
2.1	Amostras	52
2.2	Estudos moleculares	52
2.2.1	Identificação genotípica de <i>S. uberis</i>	53
2.2.2	Amplificação de fatores de virulência	53
2.2.3	PFGE – <i>pulsed-field gel electrophoresis</i>	54
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
4	CONCLUSÕES	67
	REFERÊNCIAS	68
	CAPÍTULO 3 Concentração inibitória mínima de antimicrobianos contra <i>Streptococcus uberis</i> associados à mastite bovina	72
1	INTRODUÇÃO	74
2	MATERIAL E MÉTODOS	76
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	79
4	CONCLUSÕES	87
	REFERÊNCIAS	88

CAPÍTULO 1

Streptococcus uberis, um patógeno emergente da mastite bovina

RESUMO

A mastite é a principal doença da bovinocultura leiteira, causando importantes perdas a diferentes níveis da cadeia produtiva. Existem vários microrganismos associados à doença, classificados como contagiosos ou ambientais. *Streptococcus uberis* é um importante patógeno ambiental associado à mastite bovina, responsável por grande proporção das infecções. Apesar da crescente importância, a patogênese ainda é pouco conhecida. Pesquisas de características moleculares e genéticas do patógeno podem contribuir muito para melhorar o conhecimento sobre a atividade bacteriana e identificar moléculas que tenham papel definitivo no estabelecimento da infecção, visando propor medidas mais eficazes no controle e prevenção da doença. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) tem sido utilizados com sucesso no objetivo de fornecer informações sobre a epidemiologia de *S. uberis*. Dados sobre o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos podem ser valiosos na eleição de fármacos adequados para o tratamento da mastite por *S. uberis*. Foram revisados, nesta sessão, estudos relacionados à *S. uberis* associados a mastite bovina quanto a identificação e caracterização de importantes fatores de virulência, a diversidade genética associada a epidemiologia e a susceptibilidade aos antimicrobianos pelo método de microdiluição.

Palavras-chave: *Streptococcus uberis*. Epidemiologia. Fatores de virulência. Diversidade genética. Resistência aos antimicrobianos.

ABSTRACT

Mastitis is the major disease of dairy cattle, causing significant losses to different levels of the supply chain. There are several microorganisms associated with disease classified as contagious or environmental. *Streptococcus uberis* is an important environmental pathogen associated with bovine mastitis, responsible for a large proportion of infections. Despite the increased importance, the pathogenesis is still unknown. Searches of genetic and molecular characteristics of the pathogen can do much to improve the knowledge about bacterial activity and identify molecules that have definite role in the establishment of infection, to propose effective measures to control and disease prevention. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) has been used successfully for the purpose of providing information on the epidemiology of *S. uberis*. Data on the antimicrobial susceptibility profile can be valuable in the election of suitable drugs for the treatment of mastitis by *S. uberis*. Were reviewed in this section, studies related to *S. uberis* associated with bovine mastitis, identification and characterization of important virulence factors, genetic diversity associated with epidemiology and antimicrobial susceptibility by microdilution method.

Keywords: *Streptococcus uberis*. Epidemiology. Virulence factors. Genetic diversity. Antimicrobial resistance

1 INTRODUÇÃO

A mastite bovina é a doença de maior importância econômica para a indústria leiteira mundial, sendo responsável por perdas produtivas, redução na qualidade do leite e aumento de custos de produção por utilização de medicamentos (SANTOS; FONSECA, 2007).

O desenvolvimento de programas de controle de mastite baseado em práticas de manejo na ordenha, desinfecção pós ordenha, antibioticoterapia terapêutica e profilática (terapia da vaca seca), segregação ou descarte de animais persistentemente infectados tem possibilitado controlar de forma eficaz as infecções intramamárias (IIM) causadas por patógenos contagiosos. Entretanto, essas medidas têm sido pouco efetivas contra patógenos ambientais, consequentemente, a mastite ambiental tornou-se um problema crescente, principalmente em rebanhos bem manejados que obtiveram sucesso no controle dos agentes contagiosos (JAYARAYO et al., 1999; PHUEKTES et al., 2001).

Um importante patógeno associado à mastite ambiental é o *Streptococcus uberis*, responsável por grande proporção das infecções. IIM causadas por *S. uberis* tem aumentado nos rebanhos leiteiros em todo o mundo. Atribui-se a esse patógeno prevalências de até 23% dos casos de mastite em alguns países (BRADLEY, 2002). Contudo, apesar de sua importância, a epidemiologia da mastite ocasionada por *S. uberis* ainda é pouco estudada (PHUEKTES et al., 2001).

Dado o limitado impacto das medidas clássicas de controle contra as mastites provocadas por *S. uberis*, a vacinação poderia ser uma medida mais efetiva para o controle da doença. Para isto, no entanto, faz-se necessário compreender a atividade bacteriana e identificar moléculas que tenham papel relevante no estabelecimento da infecção (LEIGH, 1999). Pesquisas de

características moleculares, genéticas e fenotípicas do patógeno podem contribuir muito nesse sentido.

Métodos moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR), usada na investigação de possíveis genes de virulência, e a eletroforese em campo pulsante (*pulsed-field gel electrophoresis* – PFGE), que permite identificar se isolados são geneticamente relacionados, podem contribuir de maneira consistente para a caracterização molecular de *S. uberis* e permitir maior conhecimento a respeito da patogenia e da epidemiologia da mastite causada por esse agente.

O levantamento do perfil de resistência a antimicrobianos de *S. uberis*, associado a informações relativas à diversidade genética da população, pode permitir a identificação de cepas mais resistentes ou mais patogênicas e a definição dos fármacos mais eficientes contra infecções ocasionadas por esse agente, o que poderia facilitar a indicação do tratamento, em algumas situações, em nível de campo.

O objetivo do autor com a pesquisa registrada neste trabalho é o de revisar estudos sobre a diversidade genética e fatores de virulência de *Streptococcus uberis* isolados de mastite e sobre a susceptibilidade do patógeno a diferentes antimicrobianos, utilizando a Concentração Inibitória Mínima (CIM).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Bovinocultura leiteira no Brasil

Estima-se a produção mundial de leite no ano de 2010, em cerca de 440.000.000 de toneladas, somando-se os principais países produtores. Já para a produção nacional em 2010, a previsão é de aproximadamente 30.000.000 toneladas (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE - USDA, 2009), desse montante, aproximadamente 28% correspondem à produção do Estado de Minas Gerais, que é o maior produtor de leite entre os estados brasileiros (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2010).

Nos últimos anos cresceu a importância do leite na balança comercial do Brasil. O país passou de importador a exportador do produto, ainda em valores não tão significativos como outras cadeias do agronegócio, como soja, carne e café, mas com perspectivas bastante promissoras de expansão no mercado internacional do leite e derivados. Embora a participação do Brasil no comércio internacional de lácteos seja ainda muito pequena em relação aos principais países exportadores, como Nova Zelândia (34%), União Europeia (31%) e Austrália (15%), que disponibilizam cerca de 30 bilhões de toneladas de leite no mercado internacional, o país apresentou um crescimento considerável nas exportações, passando de 8.900 mil toneladas em 2000 para cerca de 64.000 toneladas em 2009, montante menor do que o ano anterior, 2008, no qual houve recorde da exportação de lácteos pelo Brasil, com acumulado de cerca de 148.000 toneladas (BRASIL, 2009; ZUGE; CORTADA, 2001).

O incremento da produção e da exportação de leite está diretamente relacionado à melhoria da qualidade do produto, ponto de extrema importância para o futuro da cadeia produtiva do leite no Brasil. Neste cenário, a melhoria da

qualidade gera crescimento, tanto nas exportações, quanto no consumo interno (ZUGE; CORTADA, 2001). Neste sentido, tem grande importância a realização de estudos que possibilitem propor medidas eficientes de combate e controle da mastite bovina, que é uma importante causa de queda na produção e na qualidade do leite.

2.2 Mastite na bovinocultura

A mastite é a principal doença dos rebanhos leiteiros. É a afecção mais prevalente e causa perdas econômicas consideráveis em função, principalmente, da diminuição da produção (PHILPOT; NICKERSON, 2002).

Estima-se que a redução na produção de leite nas vacas acometidas por mastite esteja entre 12 e 15% (SANTOS; FONSECA, 2007), o que atualmente pode representar, somente no Brasil, algo em torno de 4,5 milhões de toneladas de leite, anualmente. Só o que se deixa de produzir representa prejuízos de cerca de três bilhões de reais por ano, isso levando em consideração apenas o prejuízo ao produtor, causado diretamente pela queda na produção. Se levados em conta outros custos gerados pela mastite como gastos com medicamentos, descarte de leite, morte e descarte de animais cronicamente infectados, além das perdas na indústria em consequência da redução na qualidade do leite o prejuízo atinge cifras bem mais expressivas.

Em um estudo recente realizado na Holanda sobre o custo real da mastite e percepção dos produtores foi relatado um custo médio de €140,00/vaca/ano e concluiu-se, ainda, que a maioria dos produtores subestima as perdas econômicas geradas pela mastite em suas fazendas (HUIJPS; LAM; HOGEVEEN, 2008).

Nielsen (2009) relatou que casos de mastite clínica e mastite subclínica foram em média associados com perdas econômicas de €275,00 e €60,00

respectivamente e que a redução na produção de leite constituiu o maior componente entre os custos das perdas econômicas causadas pela doença.

No Brasil, Bueno et al. (2002) encontraram perdas de produção de 7,69% em função da mastite subclínica, em propriedades rurais na região de Pirassununga-SP, e frequência média, em vacas, de 7,46% de mastite clínica e 63,68% de mastite subclínica.

Ferreira et al. (2007) encontraram, em Teresina, Piauí, 41,10% de quartos positivos em diferentes graus no teste de CMT, destes 72,83% foram confirmados pelo isolamento dos microrganismos patogênicos.

Costa et al. (2001) divulgaram os dados sobre o acompanhamento dos índices de mastite clínica e subclínica de em 19.388 animais de 257 rebanhos localizados nos estados de Minas Gerais e de São Paulo, no período de 1993 a 1997. Foram registradas as médias anuais de 14,53% para casos clínicos e de 72,46% para casos subclínicos. Os autores relataram uma proporção média de casos clínicos em relação aos subclínicos de 1:6, mas com variações entre rebanhos de 1:2 até 1:43.

Costa (2008) realizou um estudo com 35 rebanhos do sul de Minas Gerais e relatou índices médios de 52,2% de mastite subclínica e 9,87% de mastite clínica.

Os índices de mastite clínica e subclínica observados nos rebanhos brasileiros encontram-se muito distantes dos patamares de 1-2% para casos clínicos e de 15% para casos subclínicos que segundo Santos e Fonseca (2007) seriam aceitáveis para rebanhos nos quais a mastite tem um controle satisfatório.

A mastite pode ser causada por inúmeros microrganismos que podem ser classificados em contagiosos ou ambientais de acordo com a origem e as características da infecção. Apesar da ampla variedade de patógenos potencialmente causadores de mastite, os que causam infecção de forma mais freqüente nos rebanhos bovinos são poucos. Segundo Ranjan et al. (2006),

Staphylococcus aureus, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* e coliformes são os patógenos mais comumente envolvidos no processo, responsáveis por aproximadamente 80% de todas as infecções intramamárias.

A prevalência de mastite causada por patógenos contagiosos tais como *S. aureus* e *S. agalactiae* tem diminuído nas últimas décadas em função de programas estratégicos de controle fundamentado na manutenção da ordenhadeira mecânica, segregação ou descarte e animais cronicamente acometidos, utilização da anti-sepsia de tetos e da terapia da vaca seca (LOPEZ-BENAVIDES et al., 2007). No entanto, observa-se o aumento da importância relativa das mastites ambientais quando a mastite contagiosa é mantida sobre controle (OLIVER; MITCHELL, 1984; PHUEKTES et al., 2001). De fato, a mastite ambiental tem se tornado o maior problema em muitos rebanhos bem manejados que obtém sucesso no controle da mastite contagiosa (JAYARAO et al., 1999).

2.2.1 Mastites ambientais

Os três grupos principais de bactérias causadoras de mastite ambiental são representados por bactérias do gênero *Streptococcus* (estreptococos ambientais), coliformes e enterococos. As espécies mais comumente isoladas desses grupos são: *Streptococcus uberis* e *Streptococcus dysgalactiae*, entre os estreptococos ambientais; *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter aerogenes* entre os coliformes; *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* entre os enterococos (PHILPOT; NICKERSON, 2002).

Uma significativa proporção dos casos clínicos e subclínicos de mastites causadas por patógenos ambientais, em vacas lactantes e não lactantes, é causada por *Streptococcus* ambientais (OLIVER; MITCHELL, 1984; SMITH;

TODHUNTER; SCHOENBERGER, 1985; TODHUNTER; SMITH; HOGAN, 1995). Diversas espécies desse grupo podem ser isoladas de casos de mastite, como *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus equinus*, *Streptococcus parauberis*, *Streptococcus canis*, *Streptococcus alactolyticus*, *Streptococcus acidimonius* e *Streptococcus equi* (WATTS, 1988).

A taxa de novas infecções por *Streptococcus* ambientais pode ser influenciada por vários fatores como a idade da vaca, o estágio de lactação e a estação climática. No outono e no verão, período de maior pluviosidade, observa-se número mais elevado de IIM por *Streptococcus* ambientais, em relação ao inverno e primavera, tanto em vacas lactantes como não lactantes (JAYARAO et al., 1999). O período seco (fim do período lactacional) também é um momento muito importante para a ocorrência de novas infecções por *Streptococcus* ambientais. Todhunter, Smith e Hogan (1995) relataram que cerca de metade das infecções por essas espécies ocorre nesse estágio.

2.3 *Streptococcus uberis*

S. uberis é um dos patógenos mais frequentemente isolados de casos de mastite ambiental. Jayarao et al. (1999) relataram 14,2% de lactações concorrendo com IIM por *S. uberis* nos Estados Unidos e prevalência de 2% de quartos infectados por esse microrganismo. Dados estatísticos recentes da VLA (*Veterinary Laboratories Agency*^R), no Reino Unido, relacionam *S. uberis* como agente etiológico de 23% dos casos de mastite, a partir de análise das amostras enviadas a esses laboratórios (VETERINARY LABORATORIES AGENCY, 2008). Em estudo realizado por Costa (2008) em rebanhos no sul do Estado de Minas Gerais verificou-se que o *S. uberis* foi o agente predominante entre os patógenos ambientais, sendo isolado em 85,71% dos rebanhos investigados.

À observação do aspecto macroscópico de crescimento em meio sólido observa-se colônias pequenas, com aproximadamente 1 mm de diâmetro, circulares, translúcidas, de superfície lisa e brilhante que podem apresentar hemólise. À análise microscópica, são cocos gram positivos em cadeias. Na tragem fenotípica, são catalase-negativos, oxidase negativos, capazes de hidrolizar a esculina e tem crescimento inibido pela presença de sais biliares (HILLERTON; BERRY, 2003).

O *S. uberis*, por ser de difícil controle, tem sido considerado uma “barreira permante” no controle da mastite. É um microrganismo ubíquo e amplamente disseminado no ambiente das fazendas leiteiras, sendo inclusive muito comum na superfície corporal dos animais, e, além disso, possui grande variabilidade genética (LEIGH, 1999).

A importância do *S. uberis* na bovinocultura é crescente. Há relatos que apontam que a prevalência da mastite causada por esse agente parece estar aumentando nos rebanhos leiteiros ao redor do mundo (DOUGLAS et al., 2000), um possível fator que contribui para este quadro é o fato de que os agentes contagiosos, como *S. aureus* e *S. agalactiae* são eficientemente controlados com a adoção das medidas clássicas de controle da mastite, ao contrário dos patógenos ambientais, como *S. uberis*, sobre o qual as medidas preventivas tem pouco impacto na incidência (BRADLEY, 2002; LEIGH, 1999; OLIVER; MITCHELL, 1984; SMITH; TODHUNTER; SCHOENBERGER, 1985). Outro aspecto a ser considerado é que o controle dos agentes contagiosos gerado pelas medidas profiláticas na ordenha causa redução nos níveis de células somáticas no úbere e com isso os animais se tornam mais susceptíveis aos agentes ambientais ubíquos (BRADLEY, 2002).

Pode se isolar *S. uberis* em diversos ambientes dentro de um rebanho leiteiro, mas o local que possui maior importância para a infecção dos tetos dos animais, onde geralmente há maior nível de contaminação, são as camas usadas

pelo gado em sistemas de confinamento. Em comparação às camas formadas por material orgânico, naquelas em que se utiliza matéria inorgânica, como a areia, a população bacteriana é menor, no entanto, à medida que aumenta o nível de contaminação orgânica das camas, as taxas de infecção também aumentam. Nas camas formadas por material orgânico, o tipo de material utilizado parece ter influência sobre a microbiota predominante. Em subprodutos de processamento de madeiras, como a serragem, predominam bactérias gram negativas, tais como *Escherichia coli*, enquanto *S. uberis* parece ser predominante em camas compostas por palhas, que é um bom substrato para a replicação desse microrganismo (HILLERTON; BERRY, 2003; TAMILSELVAM et al., 2006; ZADOKS; TIKOFSKY; BOOR, 2005).

Mastites por *S. uberis* podem ocorrer em rebanhos mantidos em diferentes tipos de manejo. Há estudos que descrevem *S. uberis* como relevante agente causador de mastite em áreas onde o gado é criado sob pastejo o ano todo, como é o caso da Nova Zelândia (MCDUGALL et al., 2004; WIELICZKO et al., 2002), também há relatos de ocorrência em países com alternância entre confinamento e pastejo, como a Holanda, país no qual o pico de incidência ocorre justamente no período de pastejo (BARKEMA, 1999) e até mesmo em países onde predomina o confinamento total, como em Portugal (RATO et al., 2008).

Há indicações de que *S. uberis* tenha como principal veículo as fezes dos bovinos, meio pelo qual poderia acontecer a contaminação do solo e a disseminação do microrganismo pelo ambiente (LOPEZ-BENAVIDES et al., 2007). No entanto, discute-se ainda a possibilidade de que o agente seja capaz de se replicar também no solo. *S. uberis* possui ainda várias outras fontes ambientais descritas, como água, matéria vegetal das pastagens, moscas e feno (ZADOKS; TIKOFSKY; BOOR, 2005).

Pode ser isolado *S. uberis* de numerosos sítios no corpo de bovinos, incluindo lábios, tetos, trato urogenital, tonsilas, reto, rúmen, narinas e olhos. Alguns autores sugerem que a pele e a superfície do úbere são o principal reservatório de *S. uberis*, no corpo do animal, para as infecções da glândula mamária (KHAN et al., 2003).

A infecção intramamária causada por *S. uberis* pode progredir com sintomas clínicos ou pode ser subclínica. Alguns pesquisadores sustentam que a infecção pelo agente raramente se manifesta na forma de mastite clínica e que pode permanecer subclínica por um longo tempo. Em uma pesquisa epidemiológica, Jayarao et al. (1999) observaram que 95% de infecções subclínicas. Em outra mão, há também pesquisadores que sustentam que agentes ambientais, entre eles *S. uberis*, são responsáveis pela maior parte dos casos clínicos de mastite. Costa (2008) verificou que agentes ambientais apresentaram uma associação maior com mastite clínica em relação ao *S. aureus* e observou, ainda, que 18% das amostras de *S. uberis* identificadas foram associadas a casos clínicos.

A forma de apresentação da mastite por *S. uberis* também pode ser influenciada por outros fatores. A proporção de casos clínicos é maior no estágio inicial da lactação e também aumenta com a ordem de lactação (JAYARAO et al., 1999).

É muito freqüente a infecção por *S. uberis* tornar-se crônica e subclínica e, desse modo, o agente pode persistir infectando a glândula mamária até por mais de uma lactação (TAMILSELVAM et al., 2006; ZADOKS et al., 2003). Um fator associado a infecções crônicas por este agente e que agrava as perdas é a ausência de tratamento (KHAN et al., 2003).

IIM ocasionadas por *S. uberis* são mais frequentes nos períodos próximos ao parto, como no período seco e o início da lactação (WILLIAMSON; WOOLFORD; DAY, 1995). O agente é apontado como a

causa predominante de novas IIM no período seco e no periparto. Durante a lactação, a anti-sepsia dos tetos antes e após a ordenha causa grande redução da contaminação bacteriana, mas durante o período seco, quando a sanitização não é realizada, há aumento da contaminação do teto por patógenos ambientais, como *S. uberis* (LOPEZ-BENAVIDES et al., 2007; SMITH, 1983). Estudos recentes verificaram associação entre contaminação do teto durante o período seco e infecção intramamária por *S. uberis* ao parto, em novilhas. O risco é ainda maior quando há uso de palhadas no piquete de pré-parto ou na maternidade (HILLERTON; BERRY, 2003; LOPEZ-BENAVIDES et al., 2007). Os programas de controle para redução de IIM por *S. uberis* poderiam dar maior atenção nos períodos adjacentes ao período seco, pois possibilitariam maior impacto na redução das infecções (JAYARAO et al., 1999).

A prevalência de mastite é consideravelmente maior em vacas com mais de três lactações, podendo, em alguns rebanhos, chegar aos 40% nos animais com mais de cinco lactações (JAYARAO et al., 1999). Além da ordem de parto e da idade da vaca, outros fatores ligados ao animal têm sido apontados como fatores de risco de mastite no pós parto, como histórico de mastite (ZADOKS et al., 2001), edema de úbere e edema de tetos (WAAGE et al., 2001).

2.4 Diversidade genética e epidemiologia molecular

Algumas técnicas moleculares permitem a identificação das diferentes espécies de *Streptococcus* ambientais, facilitando o estudo de nichos ambientais dessas espécies e dos fatores que influenciam na ocorrência da doença (BASEGGIO et al., 1997).

Pesquisas utilizando técnicas moleculares têm fornecido informações epidemiológicas importantes sobre os subtipos do *S. uberis*. Uma das técnicas utilizadas para estes fins é a RFLP (polimorfismo de tamanho de fragmentos de

restrição), entretanto, o grande número de bandas gerado nessa técnica dificulta a diferenciação entre tipos geneticamente mais relacionados (WANG et al., 1999). Amplificação randômica de DNA polimórfico (RAPD) também tem sido acessada por pesquisadores dessa linha e revela distintos tipos de *S. uberis*, contudo, a limitada reprodutibilidade dessa técnica torna a mesma pouco útil (BASEGGIO et al., 1997).

A tipificação por sequência de multilocos (MLST – *multilocus sequence typing*), que consiste no sequenciamento de sete genes conservados (*housekeeping*), é outra técnica que permite investigações sobre a estrutura populacional e evolução de diversos patógenos, incluindo o *S. uberis* (PULLINGER et al., 2006, 2007). Esse método também tem sido muito utilizado em estudos epidemiológicos das IIM por *S. uberis* (PULLINGER et al., 2006; TOMITA et al., 2008). Lopez-Benavides et al. (2007) fizeram um estudo com o objetivo de avaliar e quantificar as concentrações de *S. uberis* em diversos nichos ecológicos na Nova Zelândia, durante diferentes estações do ano e avaliaram a diversidade genética dos isolados por MLST, tendo verificado grande diversidade tanto nos isolados do ambiente como dos animais.

Um método muito promissor para o estabelecimento de sistema unificado de tipagem para investigações epidemiológicas de muitas bactérias patogênicas é a digestão de DNA genômico com endonuclease de restrição. Essas enzimas cortam em intervalos infreqüentes, produzindo fragmentos relativamente grandes, que podem ser separados por meio da técnica de eletroforese em campo pulsante (PFGE – *Pulsed field gel electrophoresis*) (BASEGGIO et al., 1997). A PFGE é considerada uma técnica referência para a diferenciação de isolados dentro de espécies bacterianas, porque provê alta reprodutibilidade, perfil de restrição de interpretação relativamente simples, representação de todo o genoma bacteriano e alto poder discriminatório (MAGALHÃES et al., 2005). Essa técnica apresenta excelente habilidade em

apontar similaridades e distinções entre isolados (WANG et al., 1999). Tem sido amplamente adotada em estudos com vários patógenos de animais e humanos, sendo mais usados na investigação de surtos de doenças bacterianas (TENOVER et al., 1995).

Os padrões de fragmentos de restrição por endonuclease (REF) gerados na técnica de PFGE são relativamente simples, e, como os fragmentos podem ser individualmente identificados, permitem classificar em tipos e subtipos os isolados de *S. uberis* (BASEGGIO et al., 1997; HILL; LEIGH, 1989; JAYARAO et al., 1992). O padrão de restrição obtido com a enzima *Sma*I para *S. uberis* determina um número suficiente de fragmentos para permitir a diferenciação entre subtipos dessa espécie (BASEGGIO et al., 1997).

Os estudos epidemiológicos baseados na técnica de PFGE para agentes contagiosos, como o *S. agalactiae*, revelam padrões de fragmentos sem grandes variações genéticas entre os isolados de uma mesma propriedade. No entanto, para *S. uberis*, o perfil de fragmentos de DNA é amplamente variado, confirmando a enorme diversidade populacional para este agente. Considerando-se que se trata de um agente ambiental, é compreensível que haja alto grau de variação entre bactérias isoladas de diferentes vacas, já que os animais estão expostos a diferentes fontes de contaminação no ambiente (BASEGGIO et al., 1997; PHUEKTES et al., 2001; WIELICZKO et al., 2002).

Pesquisas utilizando PFGE em *S. uberis* em geral apontam pouca similaridade entre amostras isoladas de quartos distintos da mesma vaca ou de diferentes vacas dentro de uma mesma propriedade. Wang et al. (1999) encontraram *S. uberis* isolados de vacas diferentes apresentando, quase invariavelmente, padrões genômicos distintos. Esses autores sugerem que essa alta heterogeneidade encontrada confirma os clássicos estudos epidemiológicos sobre essa espécie, que indicam o ambiente como sendo o principal reservatório,

com limitados casos de transmissão de uma vaca a outra durante o processo de ordenha.

Apesar da ampla diversidade genética da população de *S. uberis* podem ser encontrados tipos indistinguíveis entre vacas de um mesmo rebanho (RATO et al., 2008) ou em quartos diferentes em uma mesma vaca (DOUGLAS et al., 2000). Tais fatos sugerem que a transmissão direta de vaca para vaca pode ocorrer no momento da ordenha. Também não se pode descartar completamente a possibilidade de que esses tipos indistinguíveis nas diferentes vacas sejam provenientes de uma fonte ambiental comum (BASEGGIO et al., 1997).

O estudo epidemiológico com uso da técnica de PFGE permite ainda melhor entendimento sobre o comportamento clínico da infecção por *S. uberis*. Importantes aspectos relativos à mastite por esse patógeno, tais como a severidade da lesão (clínica ou subclínica) e a persistência da infecção têm sido pesquisadas com emprego dessa técnica e resultados esclarecedores sobre a epidemiologia do patógeno têm sido fornecidos. Jayarao et al. (1991) estudaram *S. uberis* isolados de amostras de leite e verificaram a existência de infecção persistente pelo isolamento de tipos similares, de um mesmo quarto, em diferentes dias de coleta. Phuektes et al. (2001) encontraram em um mesmo rebanho um mesmo tipo de *S. uberis* predominante em duas lactações e discutem que é possível que esse tipo seja amplamente disseminado no ambiente e relativamente estável ao longo do tempo ou, alternativamente, que seja persistente, entre as lactações, em um quarto cronicamente infectado. A disseminação desse tipo no rebanho poderia ser influenciada por fatores relacionados ao manejo, especialmente manejo na ordenha. É também possível que esse tipo seja mais transmissível ou tenha maior capacidade de aderir ao epitélio da glândula mamária em relação aos demais. Wang et al. (1999) observaram também infecções persistentes por cinco meses em alguns animais e encontraram apenas dois tipos associados essas infecções entre 74 perfis

distintos revelados por PFGE e consideraram improvável que houvesse reinfecção por um mesmo tipo, diante da grande variabilidade encontrada na espécie.

Quartos cronicamente infectados pode ser uma importante fonte de infecção dentro do rebanho. A existência de tipos indistinguíveis isolados de diferentes quartos da mesma vaca e tipos predominantes em um rebanho sugere que a transmissão direta entre quartos e entre vacas pode ter um importante significado na disseminação do patógeno no rebanho (PHUEKTES et al., 2001).

A maioria das pesquisas com epidemiologia molecular realizadas até então revelam que uma ampla variedade de tipos de *S. uberis* é capaz de causar IIM, sugerindo que a maioria dos casos de mastite por esse patógeno ocorre devido à contaminação de origem ambiental. A observação de infecções persistentes e tipos predominantes, relatadas em alguns estudos demonstram a complexidade epidemiológica da mastite por *S. uberis*. Mais investigações poderiam determinar se há tipos mais virulentos que outros e esclarecer a relativa importância dos quartos cronicamente infectados, de tipos particulares e outros fatores tais como práticas de manejo do rebanho na ocorrência de IIM por *S. uberis* (PHUEKTES et al., 2001; WANG et al., 1999).

2.5 Fatores de virulência

Para um organismo colonizar a glândula mamária deve ser capaz de ganhar acesso a glândula e de se aderir para prevenir sua eliminação pelo fluxo do leite durante a ordenha. Para que a infecção tenha êxito, o microrganismo deve ser capaz de resistir aos mecanismos inatos de defesa da glândula mamária, principalmente à ação bactericida de células fagocíticas (LEIGHT, 1999). Algumas das propriedades que possibilitam ao *S. uberis* superar os mecanismos de defesa do hospedeiro tem sido alvo de estudos moleculares. Embora a

patogênese da mastite por *S. uberis* ainda esteja longe de ser completamente elucidada os estudos moleculares podem ajudar a compreender o papel de alguns fatores de virulência, especialmente quando associados a informações epidemiológicas.

Pesquisas visando identificar e caracterizar potenciais fatores de virulência associados com a patogênese de *S. uberis* sugerem que a adesão e posterior internalização de patógenos nas células do epitélio mamário são eventos importantes no início do estabelecimento de infecções (LUTHER; ALMEIDA; OLIVER, 2008), visto que a localização intracelular de alguns patógenos causadores de mastite é um importante mecanismo de evasão do sistema imune e também de fatores antimicrobianos não específicos presentes no leite bovino (ALMEIDA; OLIVER, 2001).

Pesquisas prévias demonstraram a interação entre proteínas da superfície celular de *S. uberis* e a lactoferrina (Lf), um componente bacteriostático inespecífico da glândula mamária, encontrada no soro de leite bovino e em secreções de vacas não lactantes em altas concentrações (FANG; OLIVER, 1999). A lactoferrina é uma proteína quelante de ferro produzida por células epiteliais e leucócitos que, na presença de bicarbonato, sequestra íons ferro livres no leite. Tem ação bacteriostática por sua habilidade em evitar o crescimento de bactérias como *Staphylococcus* e coliformes, que possuem alto requerimento de ferro (BISHOP et al., 1976; CHANETON et al., 2008). A retenção do ferro pela lactoferrina facilita o extermínio das bactérias por fagócitos por prevenir a produção de superóxido-dismutase, uma enzima bacteriana que inativa radicais superóxido. A Lf também pode ter atividade na modulação e regulação da função de macrófagos, linfócitos e neutrófilos (FANG; OLIVER, 1999; FANG; ALMEIDA; OLIVER, 2000).

Chaneton et al. (2008) observaram diferenças na concentração de lactoferrina bovina em quartos mamários infectados com diferentes patógenos, o

que gerou especulação sobre a existência de uma relação causa-efeito entre agentes invasores e produção mediada de lactoferrina. Bactérias associadas a altas concentrações de lactoferrina bovina podem ser adaptadas a essa condição ambiental que os próprios microrganismos contribuem para gerar. Esses pesquisadores mostraram que alguns isolados de *S. uberis* são resistentes à atividade da lactoferrina e que essa característica é amplamente disseminada na população dessa espécie. Essa alta concentração de Lf bovina desencadeada pelo *S. uberis* poderia representar uma vantagem dessa espécie sobre outros potenciais competidores do mesmo nicho, como *E. coli* e *S. aureus* que, nesse mesmo estudo, apresentaram maior susceptibilidade à lactoferrina. Além da resistência aos efeitos antimicrobianos da lactoferrina bovina, *S. uberis* produz uma proteína que se liga a Lf, utilizando-a para realizar aderência e internalização nas células epiteliais da glândula mamária (FANG; OLIVER, 1999; FANG; ALMEIDA; OLIVER, 2000).

Após a descoberta desta proteína que interage com a Lf que foi denominada molécula de adesão de *S. uberis* (SUAM), Almeida et al. (2006) realizaram a purificação, o seqüenciamento da porção N-terminal e a produção de anticorpos contra a mesma. Estes autores relataram que anticorpos contra essa proteína inibiram a adesão e internalização em células epiteliais mamárias de bovinos, *in vitro*, fortalecendo a suspeita de que SUAM tem importante papel na patogênese da mastite por *S. uberis*.

Patel et al. (2009) pesquisaram, *in vitro*, o papel da SUAM na internalização do *S. uberis* e confirmaram a importância da ligação do *S. uberis* a Lf nesse processo e concluíram que *S. uberis* liga-se a Lf através da SUAM de forma a criar uma ponte molecular com o receptor de Lf presente nas células epiteliais mamárias de bovinos, o que facilita a internalização do microrganismo na mucosa mamária. A localização intracelular de patógenos de mastite

permitiria ao patógeno escapar dos mecanismos de defesa do hospedeiro (DOGAN et al., 2006; PATEL et al., 2009).

Estudos *in vitro* com a SUAM têm confirmado que anticorpos contra a molécula são efetivos na inibição da internalização do *S. uberis* nas células epiteliais mamárias, o que deixa claro o potencial dessa adesina como antígeno para o desenvolvimento de vacinas para controle das mastites causadas por esse patógeno (ALMEIDA et al., 2006; PATEL et al., 2009). Endossam a perspectiva de utilização de SUAM como antígeno vacinal sua ampla frequência e alto nível de conservação do gene codificador na população de *S. uberis*, características indicadas por alguns estudos (LUTHER et al., 2008), embora ainda existam poucos relatos nesse sentido.

Outro fator de virulência que parece ter importante função na aderência e internalização de *S. uberis* são os ativadores de plasminogênio. Os ativadores de plasminogênio fisiológicos dos mamíferos desempenham atividades regulatórias sobre a plasmina que tem papel fundamental na degradação da fibrina e outras proteínas da matriz extracelular e no processo de remodelação de tecidos. Muitas bactérias patogênicas possuem mecanismos que lhes permitem beneficiar-se dessa atividade de proteases e da ligação ao plasminogênio da superfície celular (WARD et al., 2004).

Para que possam se ligar ao plasminogênio na superfície celular, um seletivo grupo de patógenos, incluindo muitos *Streptococcus* e *S. aureus*, produz uma gama de ativadores de plasminogênio capazes de converter plasminogênio de mamíferos em plasmina de um modo espécie-específico. Diferentes moléculas dotadas desta função têm sido descritas no gênero *Streptococcus*, entre elas a estreptoquinase (SK). Em *S. uberis*, dois ativadores de plasminogênio específicos foram descritos: PauA e PauB (JOHNSEN et al., 1999; LEIGH, 1994; ROSEY et al., 1999; WARD; LEIGH, 2002). Tem sido demonstrada a interação do plasminogênio com essas moléculas na maioria dos

hospedeiros animais, indicando que a patogênese dos *Streptococcus* é, em algumas vias, dependente da ativação do plasminogênio do hospedeiro, entretanto, o papel dos ativadores de plasminogênio PauA e PauB na patogênese da mastite por *S. uberis* ainda não está bem definido.

Pesquisas apontam que o gene *pauA*, que codifica a proteína ativadora de plasminogênio de *S. uberis*, tem ampla distribuição na população de *S. uberis* e que nas poucas amostras onde esse gene é ausente o *pauB* foi encontrado como um ativador de plasminogênio alternativo (JOHNSEN et al., 1999; ROSEY et al., 1999; WARD; LEIGH, 2004).

Ward e Leigh (2004) relataram alta frequência de alelos *pauA* em isolados de campo coletados de diferentes localidades da Europa e ainda encontraram um alto nível de conservação na sequência de aminoácidos da proteína entre os isolados de diversas fontes da Europa e América do Norte, o que suportaria a teoria de que os ativadores de plasminogênio conferem vantagem com respeito a colonização e crescimento e possuem um papel crítico na patogênese da mastite por *S. uberis*.

2.6 Resistência aos antimicrobianos

A crescente preocupação com relação à saúde pública quanto a presença de resíduos de antimicrobianos em alimentos e a disseminação de resistências aos mesmos pelas bactérias determinaram recomendações para uma redução gradual da utilização de antibióticos em medicina veterinária (WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2001). Assim, a identificação dos agentes etiológicos de qualquer infecção e a avaliação do seu perfil de sensibilidade a fármacos antimicrobianos torna-se essencial para a adequada indicação do antimicrobiano (GENTILINI et al., 2002). Para os *Streptococcus* ambientais envolvidos na etiologia da mastite, grupo no qual o principal agente é o *S.*

uberis, há descrições de distintos perfis de sensibilidade e resistência a drogas antimicrobianas (MALINOWSKI et al., 2008; NUNES et al., 2007; POL; RUEGG, 2007; ROSSITTO et al., 2002), bem como há relatos da presença de genes de resistência para algumas famílias de fármacos (CHUNG et al., 1999; HUNG et al., 2008; ROSSITO et al., 2002) o que ratifica a necessidade de estudos frequentes e avaliações periódicas sobre o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos nessa espécie.

Diversos métodos laboratoriais podem ser utilizados para se avaliar *in vitro* a sensibilidade das bactérias aos agentes antimicrobianos. O método rotineiramente utilizado para testar os patógenos mais comuns, de crescimento rápido e determinadas bactérias fastidiosas é o de difusão em ágar. Nos testes de disco-difusão, deve se utilizar a metodologia padronizada e medidas do diâmetro do halo de inibição correlacionados às concentrações inibitórias mínimas (CIMs) com cepas reconhecidamente sensíveis e resistentes a diversos agentes antimicrobianos (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE - CLSI, 2008).

Com base na resposta *in vitro* do Teste de Sensibilidade Antimicrobiana de um microrganismo a um agente antimicrobiano é feita a classificação qualitativa em três categorias: ‘Sensível’ – Categoria que implica que a infecção causada por este isolado pode ser tratada apropriadamente com a dosagem de um agente antimicrobiano recomendado para esse tipo de infecção e patógeno; ‘Intermediária’ – Categoria que implica que uma infecção causada por este isolado pode ser tratada apropriadamente em locais do corpo, onde as drogas se concentram fisiologicamente ou quando for possível a prescrição de uma dosagem mais alta da droga que a habitual; ‘Resistente’ – Os isolados considerados resistentes não são inibidos pelo agente antimicrobiano (CLSI, 2008).

Os diâmetros dos halos de inibição nos testes de disco-difusão estão inversamente correlacionados às CIMs dos testes de diluição padronizados. Esses correlatos das CIMs se baseiam em comparações entre os diâmetros do halo e as CIMs e, em geral, são idênticos aos critérios interpretativos das CIMs (CLSI, 2008).

A concentração inibitória mínima é considerada o padrão ouro para a determinação da susceptibilidade de microrganismos aos antimicrobianos e, por isso, é utilizada para julgar o desempenho de todos os demais métodos de teste de sensibilidade aos antimicrobianos (ANDREWS, 2001).

A CIM é definida como a menor concentração de determinada droga que inibe o crescimento visível de um microrganismo após o devido tempo de incubação. No teste por diluição em caldo ou em Agar, utiliza-se uma série de tubos de ensaio ou placas contendo inóculo padronizado e incorporam-se, em cada tubo, quantidades crescentes do antibiótico estudado, visando expor a bactéria a diferentes concentrações do antimicrobiano, normalmente por diluições múltiplas de dois. O material é incubado aos 37 °C, por 16-24 h, observando-se, após a incubação, o aspecto macroscópico, verificando-se se há turvação do meio. A menor concentração de antibiótico capaz de inibir o crescimento do microrganismo é considerada a CIM daquele organismo para aquele antimicrobiano. O microrganismo é considerado suscetível, intermediário ou resistente por meio da comparação do resultado obtido com o CIM padrão de interpretação no CLSI (CLSI, 2008). No entanto, o uso de critérios interpretativos baseados em dados de humanos para classificar os isolados em susceptíveis ou resistentes pode gerar equívocos nos resultados (ROSSITTO et al., 2002).

A vantagem do teste de susceptibilidade CIM em comparação ao teste de difusão por disco é que ele fornece informações quantitativas, enquanto o teste por difusão em Agar fornece resultados apenas qualitativos. A CIM

possibilita estimar a concentração do antimicrobiano necessária para inibir o crescimento dos microrganismos *in vitro*, mas pode não expressar a concentração real possível de ser alcançada no tecido mamário. Para melhor eficácia dos agentes terapêuticos, devem se considerar o nível alcançado do antimicrobiano no leite e a correlação entre resultados de testes *in vitro* e *in vivo* (OWENS et al., 1990).

Possíveis imprecisões na identificação de estreptococos ambientais afetam a confiabilidade dos perfis de resistência de *S. uberis* aos antimicrobianos relatados. Embora *S. uberis* seja usualmente susceptível à penicilina, existem relatos de resistência a penicilina em estreptococos ambientais e *S. uberis* (ERSKINE et al., 2002; GUÉRIN-FAUBLÉE et al., 2002; RAJALA-SHULTZ et al., 2004). Nesses relatos, nem sempre é claro se os isolados testados foram validamente diferenciados de outros cocos, catalase-negativos e esculina-positivos, tais como *Enterococcus* spp. que possuem diferentes perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos (PITKÄLÄ; KOORT; BJÖRKROTH, 2008).

Tabela 1 CIM de alguns antimicrobianos para *S. uberis* relatados na literatura

CIM50 e CIM90				
Autores (Ano)	Owens et al. (1997)	Watts, Salmon e Yancey Junior (1995)	Salmon et al. (1998)	Kirk et al. (2005)
País	EUA	EUA	Dinamarca e Nova Zelândia	EUA
Ampicilina	---	---	≤0,06 e 2,0	0,12 e 0,25
Ceftiofur	≤0,06 e 0,5	≤0,06 e 0,5	1,0 e 2,0	0,5 e 1,0
Cefapirina	≤0,06 e 0,25	0,25 e 2,0	≤0,06 e 0,13	0,5 e 1,0
Cloxaciclina	0,5 e 4,0	0,5 e 32,0	0,5 e 0,5	---
Enrofloxacina	0,5 e 2,0	0,5 e 1,0	0,5 e 1,0	---
Eritromicina	0,06 e 1,0	0,25 e 64,0	≤0,06 e 0,13	0,06 e >64,0
Novobicina	2,0 e 4,0	1,0 e 8,0	0,5 e 2,0	---
Penicilina	≤0,06 e 0,125	0,13 e 4,0	≤0,06 e ≤0,06	---
Novobicina + Penicilina	0,035 e 0,035; 0,007 e 0,007	---	≤0,06 e 0,5	0,12 e 0,25
Pirlimicina	---	≤0,06 e 32	≤0,06 e ≤0,06	0,12 e 64,0

* CIM50 – Concentração inibitória mínima para 50% dos isolados; CIM 90 – Concentração inibitória mínima para 90% dos isolados

Na Tabela 1 estão relacionadas concentrações inibitórias mínimas de alguns dos antibióticos mais utilizados na medicina veterinária para *Streptococcus uberis* isolados de amostras de leite bovino. Pode-se verificar nos dados de CIM apresentados, que esse patógeno possui perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos bastante variáveis, o que reafirma a importância de se determinar a CIM em diferentes países ou localidades geográficas para *S. uberis* isolados de IIM.

O perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos tem valor limitado para diferenciar tipos relacionados, mas a concordância entre os agrupamentos por resultados de antibiograma e PFGE pode ser observada, como foi encontrado em muitos isolados em um estudo realizado por Phuektes et al. (2001). Esses

autores relataram ainda a presença de tipos mais virulentos, que apresentavam prevalência mais alta e maior resistência ao tratamento com antibióticos em comparação aos demais tipos.

A avaliação da sensibilidade a antimicrobianos *in vitro* é uma boa maneira de monitorar a existência de mecanismos de resistência entre patógenos de mastite, entretanto, nem sempre a razão para a fraca resposta a terapia é ocasionada pela resistência ao antimicrobiano. A resistência ao tratamento pode ser devida a grande habilidade para aderir e invadir as células epiteliais e persistir no ambiente intracelular, onde é difícil o alcance do fármaco numa concentração suficiente para inibir a bactéria. Outra possível explicação seria que estes tipos mais virulentos poderiam causar inflamação mais severa e fibrose, impossibilitando o antibiótico de reagir nas áreas infectadas da glândula (PHUEKTES et al., 2001).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar da crescente importância de *S. uberis* na bovinocultura leiteira e a despeito de ser o patógeno mais prevalente em alguns países, estudos acerca do conhecimento da patogenia da doença e de características moleculares do agente visando propor medidas eficazes de controle e combate, ainda são pouco comuns.

A caracterização e determinação da frequência, distribuição e conservação de genes de virulência em diferentes localidades, bem como estudos moleculares sobre a diversidade populacional associado a informações epidemiológicas pode fornecer informações relevantes no intuito de compreender melhor a patogenia e epidemiologia do agente e, assim, possibilitar medidas de controle, como o desenvolvimento de vacina contra a mastite por *S. uberis*.

Da mesma maneira, dados sobre resistência aos antimicrobianos por determinação da CIM, também são escassos. Estudos sobre a CIM são importantes para monitoramento do desenvolvimento de resistência na população da espécie bacteriana e podem ser referências para escolha de fármacos mais efetivos no tratamento da mastite.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, R. A. et al. Identification, isolation, and partial characterization of a novel *Streptococcus uberis* adhesion molecule (SUAM). **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 115, n. 1/3, p. 183-191, June 2006.

ALMEIDA, R. A.; OLIVER, S. P. Role of collagen in adherence of *Streptococcus uberis* to bovine mammary epithelial cells. **Journal Veterinary Medicine**, Berlin, v. 48, n. 10, p. 759-763, Dec. 2001.

ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Birmingham, v. 48, n. 1, p. 5-16, Mar. 2001.

BARKEMA, H. W. Udder health on dairy farms: results of a longitudinal study on 300 Dutch farms. **Tijdschr**, Diergeneeskd, v. 124, n. 11, p. 338-344, June 1999.

BASEGGIO, N. et al. Strain differentiation of isolates of streptococci from bovine mastitis by pulsed-field gel electrophoresis. **Molecular and Cellular Probes**, London, v. 11, n. 5, p. 349-354, Oct. 1997.

BISHOP, J. G. et al. *In vitro* growth inhibition of mastitis-causing coliform bacteria by bovine apo-lactoferrin and reversal of inhibition by citrate and high concentrations of apo-lactoferrin. **Infection and Immunity**, Washington, v. 14, n. 4, p. 911-915, Oct. 1976.

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

BRASIL. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. **Sistema Alice**. Brasília, 2009. Disponível em: <http://www.milkpoint.com.br/estatisticas/exportacoes_brasileiras.htm>. Acesso em: 20 jun. 2010.

BUENO, V. F. F. et al. Mastite bovina clínica e subclínica, na região de Pirassununga, SP: frequências e redução na produção. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 3, n. 2, p. 47-52, jul./dez. 2002.

CHANETON, L. et al. Relationship between milk lactoferrin and etiological agent in the mastitic bovine mammary gland. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 91, n. 5, p. 1865-1873, May 2008.

CHUNG, W. O. et al. Host range of the *ermF* rRNA methylase gene in bacteria of human and animal origin. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 43, n. 1, p. 5-14, Oct. 1999.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**: document M100-S18. Wayne, 2008. Disponível em: <<http://www.clsi.org/am/Template.cfm?Section=Search&Template=/search/searchdisplay.cfm>>. Acesso em: 10 fev. 2011.

COSTA, E. O. et al. Proporção de ocorrência da mastite clínica em relação à subclínica correlacionada com os principais agentes etiológicos. **Revista do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira**, São Paulo, v. 4, n. 3, p. 10-13, ago. 2001.

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

DOGAN, B. et al. Adherent and invasive *Escherichia coli* are associated with persistent bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 116, n. 4, p. 270-282, Sept. 2006.

DOUGLAS, V. L. et al. Genomic typing of *Streptococcus uberis* isolates from cases of mastitis, in New Zealand dairy cows, using pulsed-field gel electrophoresis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 75, n. 1, p. 27-41, July 2000.

ERSKINE, R. J. et al. Trends in antibacterial susceptibility of mastitis pathogens during a seven-year period. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, n. 5, p. 1111-1118, May 2002.

FANG, W.; ALMEIDA, R. A.; OLIVER, S. P. Effects of lactoferrin and milk on adherence of *Streptococcus uberis* to bovine mammary epithelial cells. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 61, n. 3, p. 275-279, Mar. 2000.

FANG, W.; OLIVER, S. P. Identification of lactoferrin-binding proteins in bovine mastitis-causing *Streptococcus uberis*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 176, n. 1, p. 91-96, July 1999.

FERREIRA, J. L. et al. Prevalência e etiologia da mastite bovina no município de Teresina, Piauí. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 8, n. 2, p. 261-266, abr./jun. 2007.

GENTILINI, E. et al. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis in Argentina. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, n. 8, p. 1913-1917, Aug. 2002.

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

HILL, A. W.; LEIGH, J. A. DNA fingerprinting of *Streptococcus uberis*: a useful tool for epidemiology of bovine mastitis. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 103, n. 1, p. 165-171, Aug. 1989.

HILLERTON, J. E.; BERRY, E. A. The management and treatment of environmental streptococcal mastitis. **Veterinary Clinics Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 19, n. 1, p. 157-169, Mar. 2003.

HUIJPS, K.; LAM, T. J. G. M.; HOGEVEEN, H. Costs of mastitis: facts and perception. **Journal of Dairy Research**, London, v. 75, n. 1, p. 113-120, Jan. 2008.

HUNG, S. et al. Antibiotic susceptibility and prevalence of erythromycin ribosomal methylase gene, *erm(B)* in *Streptococcus* spp. **The Veterinary Journal**, Amsterdam, v. 176, n. 2, p. 197-204, May 2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa trimestral do leite**: resultados mensais. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 20 jun. 2010.

JAYARAO, B. M. et al. Differentiation of *Streptococcus uberis* from *Streptococcus parauberis* by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis of 16s ribosomal DNA. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v. 29, n. 12, p. 2774-2778, Dec. 1991.

_____. Epidemiology of *Streptococcus uberis* intramammary infections in a dairy herd. **Journal of Veterinary Medicine**, Berlin, v. 46, n. 7, p. 433-442, Sept. 1999.

_____. Subtyping of *Streptococcus uberis* by DNA amplification fingerprinting. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v. 30, n. 5, p. 1347-1350, May 1992.

JOHNSEN, L. B. et al. Purification and cloning of a streptokinase from *Streptococcus uberis*. **Infection and Immunity**, Berlin, v. 67, n. 3, p. 1072-1078, Mar. 1999.

KHAN, I. U. et al. Identification and epidemiological characterization of *Streptococcus uberis* isolated from bovine mastitis using conventional and molecular methods. **Journal of Veterinary Science**, Suwon, v. 4, n. 3, p. 213-223, Dec. 2003.

KIRK, J. H. et al. Association of minimum inhibitory concentration cluster patterns with dairy management practices for environmental bacteria isolated from bulk tank milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 88, n. 10, p. 3710-3720, Oct. 2005.

LEIGH, J. A. Purification of a plasminogen activator from *Streptococcus uberis*. **FEMS Microbiology Letters**, Malden, v. 118, n. 1/2, p. 153-158, May 1994.

_____. Review *Streptococcus uberis*: a permanent barrier to the control of bovine mastitis? **The Veterinary Journal**, Amsterdam, v. 157, n. 3, p. 225-238, May 1999.

LOPEZ-BENAVIDES, M. G. et al. Field observations on the variation of *Streptococcus uberis* populations in a pasture-based dairy farm. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, n. 12, p. 5558-5566, Dec. 2007.

LUTHER, D. A.; ALMEIDA, R. A.; OLIVER, S. P. Elucidation of the DNA sequence of *Streptococcus uberis* adhesion molecule gene (*sua*) and detection of *sua* in strains of *Streptococcus uberis* isolated from geographically diverse locations. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 128, n. 3/4, p. 304-312, Apr. 2008.

MAGALHÃES, V. D. et al. Eletroforese em campo pulsante em bacteriologia: uma revisão técnica. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 155-161, jul./dez. 2005.

MALINOWSKI, E. et al. Antimicrobial susceptibility of bacteria isolated from cows with mastitis in 2006-2007. **Bulletin of The Veterinary Institute of Pulawy**, Pulawy, v. 52, n. 4, p. 565-572, July 2008.

MCDOUGALL, S. et al. Duration of infection and strain variation in *Streptococcus uberis* isolated from cows' milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 87, n. 7, p. 2062-2072, July 2004.

NIELSEN, C. **Economic impact of mastitis in dairy cows**. 2009. 81 p. Thesis (Ph.D. in Animal Production) - University of Agricultural Sciences, Uppsala, 2009.

NUNES, S. F. et al. Perfil de susceptibilidade a antibióticos de agentes etiológicos de mastite subclínica bovina em Portugal. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v. 102, n. 563/564, p. 275-280, jul. 2007.

OLIVER, S. P.; MITCHELL, B. A. Prevalence of mastitis pathogens in herds participating in a mastitis control program. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 67, n. 10, p. 2436-2440, Oct. 1984.

OWENS, W. E. et al. Comparison of success of antibiotic therapy during lactation and results of antimicrobial susceptibility tests for bovine mastitis. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 80, n. 2, p. 313-317, Feb. 1997.

_____. Minimum inhibitory concentrations and disk diffusion zone diameter for selected antibiotics against Streptococci isolated from bovine intramammary infections. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 73, n. 5, p. 1225-1231, May 1990.

PATEL, D. et al. Bovine lactoferrin serves as a molecular bridge for internalization of *Streptococcus uberis* into bovine mammary epithelial cells. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 137, n. 3/4, p. 297-301, June 2009.

PHILPOT, W. N.; NICKERSON, S. C. **Vencendo a luta contra a mastite**. Piracicaba: Westfalia Landtechnik do Brasil, 2002. 192 p.

PHUEKTES, P. et al. Molecular epidemiology of *Streptococcus uberis* isolates from dairy cows with mastitis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, n. 4, p. 1460-1466, Apr. 2001.

PITKÄLÄ, A. M.; KOORT, J.; BJÖRKROTH, J. Identification and antimicrobial resistance of *Streptococcus uberis* and *Streptococcus parauberis* isolated from bovine milk samples. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 91, n. 10, p. 4075-4081, Oct. 2008.

POL, M.; RUEGG, P. L. Relationship between antimicrobial drug usage and antimicrobial susceptibility of gram-positive mastitis pathogens. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, n. 1, p. 262-273, Jan. 2007.

PULLINGER, G. D. et al. Application of *Streptococcus uberis* multilocus sequence typing: analysis of the population structure detected among environmental and bovine isolates from New Zealand and the united kingdom. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 2, p. 1429-1436, Feb. 2006.

_____. Multilocus-sequence typing analysis reveals similar populations of *Streptococcus uberis* are responsible for bovine intramammary infections of short and long duration. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 119, n. 2/4, p. 194-204, Jan. 2007.

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**, Netherlands, v. 1, n. 17, p. 1-7, Jan. 2006.

RATO, M. G. et al. Molecular epidemiology and population structure of bovine *Streptococcus uberis*. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 91, n. 12, p. 4542-4551, Dec. 2008.

ROSEY, E. L. et al. *PauA*: a novel plasminogen activator from *Streptococcus uberis*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 178, n. 1, p. 27-33, Sept. 1999.

ROSSITTO, P. V. et al. Antibiotic susceptibility patterns for environmental *Streptococci* isolated from bovine mastitis in central California dairies. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, n. 1, p. 132-138, Jan. 2002.

SALMON, S. A. et al. Minimum inhibitory concentrations for selected antimicrobial agents against organisms isolated from the mammary glands of dairy heifers in New Zealand and Denmark. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 81, n. 2, p. 570-578, Feb. 1998.

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

SMITH, K. L. Mastitis control: a discussion. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 66, n. 8, p. 1790-1794, Aug. 1983.

SMITH, K. L.; TODHUNTER, D. A.; SCHOENBERGER, P. S. Environmental pathogens and intramammary infection during the dry period. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 68, n. 2, p. 402-417, Feb. 1985.

TAMILSELVAM, B. et al. *Streptococcus uberis* internalizes and persists in bovine mammary epithelial cells. **Microbial Pathogenesis**, London, v. 40, n. 6, p. 279-285, June 2006.

TENOVER, F. C. et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, n. 9, p. 2233-2239, Sept. 1995.

TODHUNTER, D. A.; SMITH, K. L.; HOGAN, J. S. Environmental streptococcal intramammary infections of the bovine mammary gland. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 78, n. 11, p. 2366-2374, Nov. 1995.

TOMITA, T. et al. Identification of *Streptococcus uberis* multilocus sequence types highly associated with mastitis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, n. 1, p. 114-124, Jan. 2008.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Dairy**: world markets and trad. Washington, 2009. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/dlp/circular/2009/122909dairyfull.pdf>>. Acesso em: 20 jun. 2010.

VETERINARY LABORATORIES AGENCY. **Veterinary investigation surveillance report**. London, 2008. Disponível em:

<http://www.defra.gov.uk/vla/reports/rep_vida09.htm>. Acesso em: 12 jun. 2010.

WAAGE, S. et al. Case control study for risk factors for clinical mastitis in postpartum dairy heifers. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 84, n. 2, p. 392-399, Feb. 2001.

WANG, S. M. et al. Epidemiological typing of bovine streptococci by pulsed-field gel electrophoresis. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 123, n. 2, p. 317-324, Oct. 1999.

WARD, P. N. et al. Complex interactions between bovine plasminogen and streptococcal plasminogen activator *PauA*. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 342, n. 4, p. 1101-1114, May 2004.

WARD, P. N.; LEIGH, J. A. Characterization of *PauB*, a novel broad-spectrum plasminogen activator from *Streptococcus uberis*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 184, n. 1, p. 119-125, Jan. 2002.

_____. Genetic analysis of *Streptococcus uberis* plasminogen activators. **Indian Journal of Medical Research**, New Delhi, v. 119, n. 1, p. 136-140, May 2004.

WATTS, J. L. Characterization and identification of streptococci isolated from bovine mammary glands. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 71, n. 6, p. 1616-1624, June 1988.

WATTS, J. L.; SALMON, S. A.; YANCEY JUNIOR, R. J. Antimicrobial susceptibility from the mammary glands of microorganisms isolated dairy heifers. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 78, n. 7, p. 1637-1648, July 1995.

WIELICZKO, R. J. et al. Molecular typing of *Streptococcus uberis* strains isolated from cases of bovine mastitis. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, n. 9, p. 2149-2154, Sept. 2002.

WILLIAMSON, J. H.; WOOLFORD, M. W.; DAY, T. M. The prophylactic effect of a dry-cow antibiotic against *Streptococcus uberis*. **New Zealand Veterinary Journal**, Wellington, v. 43, n. 6, p. 228-234, Nov. 1995.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Antibiotic resistance**: synthesis of recommendations by expert policy groups. Boston, 2001. 155 p.

ZADOKS, R. N. et al. Clinical, epidemiological and molecular characteristics of *Streptococcus uberis* infections in dairy herds. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 130, n. 2, p. 335-349, Apr. 2003.

_____. Cow-and quarter-level risk factors for *Streptococcus uberis* and *Staphylococcus aureus* mastitis. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 84, n. 12, p. 2649-2663, Dec. 2001.

ZADOKS, R. N.; TIKOFSKY, L. L.; BOOR, K. J. Ribotyping of *Streptococcus uberis* from a dairy's environment, bovine feces and milk. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 109, n. 3/4, p. 257-265, Aug. 2005.

ZUGE, R. M.; CORTADA, C. N. M. SAPI leite bovino. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PRODUÇÃO INTEGRADA DE FRUTAS, 9.; SEMINÁRIO SOBRE SISTEMA AGROPECUÁRIO DE PRODUÇÃO INTEGRADA, 1., 2001, Bento Gonçalves. **Anais...** Bento Gonçalves: EMBRAPA, 2001. Disponível em: <<http://www22.sede.embrapa.br/snt/piue/>>. Acesso em: 10 jun. 2010.

CAPÍTULO 2

Fatores de virulência e diversidade genética de *Streptococcus uberis* isolados de mastite bovina no sul de Minas Gerais

RESUMO

A mastite bovina é a principal doença da bovinocultura leiteira. Entre os diversos agentes etiológicos da mastite *S. uberis* tem apresentado importância crescente nas últimas décadas, sendo em alguns países o patógeno mais prevalente. No presente estudo 47 *S. uberis* associados à mastite bovina, procedentes de 26 rebanhos leiteiros da região sul do Estado de Minas Gerais, no Brasil, foram investigados com o objetivo de avaliar a diversidade genética e a frequência de importantes genes de virulência por meio de métodos moleculares. Os isolados foram identificados genotipicamente por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR) com utilização de *primers* espécie-específicos. Foram pesquisados por meio da PCR os genes *pauA* e *skc* que codificam fatores ativadores de plasminogênio e o gene *sua*, codificador da molécula de adesão (SUAM), envolvida no processo de aderência e internalização de *S. uberis* nas células epiteliais da glândula mamária. A diversidade genética foi avaliada pelo padrão de fragmentos de DNA gerado por restrição enzimática com enzima *SmaI* visualizados por *pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE). Os genes *skc* e *pauA* foram detectados em 91% das amostras investigadas e o gene *sua* em 100%. Todos os isolados positivos para *pauA* foram também positivos para *skc*. PFGE revelou distinção entre a ampla maioria das amostras. Verificou-se alta frequência dos genes de virulência pesquisados e grande variedade de padrões obtidos por PFGE, indicando grande diversidade genética na população de *S. uberis* estudada.

Palavras-chave: Mastite bovina. *Streptococcus uberis*. Diversidade genética. Genes de virulência.

ABSTRACT

In this study 47 *S. uberis* associated with bovine mastitis, coming from 26 dairy herds in southern Minas Gerais State, Brazil, were investigated to evaluate the genetic diversity and frequency of important virulence genes by molecular methods. The isolates were identified genotypically by polymerase chain reaction (PCR) using species-specific *primers*. Were investigated by PCR *pauA* and *skc*, genes that encode factors plasminogen activator and *sua* gene, which encodes adhesion molecule (SUAM), involved in the adherence and internalization of *S. uberis* in the epithelial cells of the mammary gland. Genetic diversity was assessed by the pattern of DNA fragments generated by restriction enzyme digestion with *SmaI* visualized by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). *pauA* and *skc* genes were detected in 91% of the samples investigated and *sua* gene in 100%. All the isolates positive for *pauA* were also positive for *skc*. PFGE revealed the distinction between the vast majority of the samples. There was a high frequency of virulence genes and a variety of patterns obtained by PFGE, indicating great genetic diversity among *S. uberis* studied.

Keywords: Bovine mastitis. *Streptococcus uberis*. Genetic diversity. Virulence genes

1 INTRODUÇÃO

A mastite bovina é a doença de maior importância econômica para a indústria leiteira, sendo responsável por perdas produtivas, redução na qualidade do leite e aumento de custos de produção por utilização de medicamentos (SANTOS; FONSECA, 2007).

A implementação de programa de controle de mastite baseado em práticas de manejo na ordenha, desinfecção pós ordenha, antibioticoterapia terapêutica e profilática (terapia da vaca seca), segregação ou descarte de animais persistentemente infectados tem possibilitado controlar de forma eficaz as infecções intramamárias (IIM) causadas por patógenos contagiosos. Entretanto, essas medidas têm sido pouco efetivas contra patógenos ambientais, conseqüentemente, a mastite ambiental tornou-se um problema crescente, principalmente em rebanhos bem manejados que obtiveram sucesso no controle dos agentes contagiosos (JAYARAYO et al., 1999; PHUEKTES et al., 2001).

Streptococcus uberis é um importante patógeno ambiental associado à mastite bovina, responsável por grande proporção das infecções clínicas e subclínicas (DOUGLAS et al., 2000; PHUEKTES et al., 2001). Infecções intramamárias causadas por *S. uberis* tem aumentado nos rebanhos leiteiros em todo o mundo. Atribui-se a esse patógeno prevalências de até 23% nos casos de mastite em alguns países (BRADLEY, 2002). Embora seja um agente muito frequente em países como Canadá, Estados Unidos, Holanda, Reino Unido, Nova Zelândia e Austrália sua importância, na epidemiologia da mastite por *S. uberis* ainda é pouco estudada (PHUEKTES et al., 2001).

Os resultados de alguns estudos visando identificar e caracterizar potenciais fatores de virulência associados com a patogênese de *S. uberis* sugerem que a adesão e posterior internalização do patógeno nas células do epitélio mamário é um evento importante no início do estabelecimento de novas

infecções intramamárias (LUTHER; ALMEIDA; OLIVER, 2008). Os ativadores de plasminogênio parecem ter importante função na aderência e internalização de *S. uberis*. Fisiologicamente, ativadores de plasminogênio desempenham atividades regulatórias sobre a plasmina, que tem papel fundamental na degradação da fibrina e outras proteínas da matriz extracelular e no processo de remodelação de tecidos. Para beneficiar-se dessa atividade de proteases e se ligar ao plasminogênio na superfície celular, um seletivo grupo de patógenos, produz ativadores de plasminogênio capazes de converter plasminogênio de mamíferos em plasmina de um modo espécie-específico (WARD et al., 2004). Enzimas com essa função, chamadas estreptoquinases, são produzidas por várias espécies patogênicas de estreptococos e foram descritas também em *S. uberis* (JOHNSON et al., 1999), entretanto, foi caracterizada uma proteína ativadora de plasminogênio de *S. uberis*, chamada PauA, considerada distinta das estreptoquinases de outras espécies do gênero (LEIGH, 1994). Outra proteína bacteriana que tem sido apresentada como importante fator de virulência, envolvida no processo de aderência e internalização de *S. uberis* nas células epiteliais mamárias, é a chamada molécula de adesão de *Streptococcus uberis* (SUAM) (LUTHER; ALMEIDA; OLIVER, 2008; PATEL et al., 2009).

Dado o limitado impacto das medidas clássicas de controle contra as mastites provocadas por *S. uberis*, a vacinação poderia ser uma medida mais efetiva para o controle da doença, mas para isso se faz necessário compreender a atividade bacteriana e identificar moléculas que tenham papel definitivo e essencial no estabelecimento da infecção (LEIGH, 1999). Pesquisas de características moleculares do patógeno podem contribuir muito nesse sentido.

Métodos moleculares baseados na tipificação genética têm sido utilizados com sucesso no objetivo de fornecer informações sobre a epidemiologia de *S. uberis*, visando propor medidas de controle mais eficientes contra o patógeno (ZADOKS et al., 2003). Variações de tipos entre isolados de

S. uberis tem sido estudadas por polimorfismo de tamanho de fragmentos de DNA obtidos por restrição enzimática (HILL; LEIGH, 1989; JAYARAO et al., 1992) por alguns métodos, entre eles Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), que possui elevado poder discriminatório (BASEGGIO et al., 1997; DOUGLAS et al., 2000; PHUEKTES et al., 2001).

Neste estudo, *S. uberis* isolados de mastite bovina na região sul do Estado de Minas Gerais, no Brasil, foram investigados com o objetivo de descrever o perfil genético por PFGE e a frequência de importantes genes de virulência desses patógenos, por PCR com uso de iniciadores específicos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras

Isolados bacterianos foram selecionadas a partir do banco do Laboratório de Bacteriologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA) que abrange 50 rebanhos leiteiros e mais de 3.000 animais da região sul do estado de Minas Gerais, no Brasil.

Foram selecionadas para o estudo as amostras inicialmente identificadas presuntivamente como *Streptococcus* ambientais. Esses isolados foram submetidos a testes de triagem que incluíram pesquisa de catalase, oxidase, hidrólise de esculina e crescimento em presença de sais de bile. Os isolados caracterizados como cocos gram positivos, catalase negativos, esculina positivos e sem crescimento na presença de sais de bile foram selecionadas para estudos moleculares.

2.2 Estudos moleculares

As amostras selecionadas para estudos moleculares foram submetidas a extração de DNA com kit comercial de extração (*Axygen DNA mini-prep®*) e posteriormente realizou-se reação em cadeia da polimerase (PCR) para confirmação genotípica de *S. uberis* e para investigar a presença dos genes de virulência *pauA*, *skc* e *suam* nas amostras confirmadas. A qualidade do teste foi certificada sempre por inclusão de uma amostra sabidamente positiva, como controle positivo, e uma amostra de outra espécie do gênero *Streptococcus*, como controle negativo.

Em cada reação foram misturados, totalizando 30 µL de solução, 1 µL de *primer 1* e 1 µL de *primer 2* (10 pmol/L), 1 µL de desoxirribonucleotídeo

trifosfatado (10 mmol; dNTP - solução mix *Amresco*®), 3 µL de tampão de reação “completo” (160 mM (NH₄)₂SO₄, 670mM tris HCL pH 8,8, 0,1% Tween-20, 25mM MgCl₂), 0,2 µL de Taq DNA polimerase (5U/µL) (*Bioron International*®), 18,9 a 21,9 µL de água destilada, por fim, de 2 a 5 µL de DNA molde (contendo entre 50 e 100 ng de DNA) foram adicionados a solução.

Os produtos de PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1,5% preparados em tampão de eletroforese tris-acetato (TAE 1X) e o peso definido com base em marcadores de peso molecular 100pb e 300pb (*Axygen DNA ladder*®), corados com solução de brometo de etídeo. As amostras também foram submetidas a PFGE para avaliação da diversidade genética dos isolados.

2.2.1 Identificação genotípica de *S. uberis*

A confirmação genotípica por PCR foi feita com uso de iniciadores espécie-específicos para *Streptococcus uberis*, com as seguintes sequências de oligonucleotídeos 5´ TAA GGA ACA CGT TGG TTA AG 3´ (STRU-UbI) e 5´ TCC AGT CCT TAG ACC TTC T 3´ (STRU-UbII) descritos por Hassan et al. (2001). A PCR foi realizada com o seguinte programa: 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos, 72 °C por 30 segundos, antecedidos por incubação aos 94 °C por 5 minutos e seguidos por extensão final de 72 °C também por 5 minutos.

2.2.2 Amplificação de fatores de virulência

Foram investigados três genes de virulência na população de *S. uberis* analisada, gene *pauA*, *skc*, correspondentes a ativadores de plasminogênio, e gene *sua*, que codifica a proteína SUAM. A presença dos genes foi detectada por

meio de amplificação do fragmento de DNA correspondente com uso dos *primers* P38 (sequência de nucleotídeos: 5' - AAT AAC CGG TTA TGA TTC CGA CTT CCG ACT AC - 3' - *forward*) e P39 (5' - AAA ATT TAC TCG AGA CTT CCT TTA AGG - 3' - *reverse*) para o gene *pauA* e *primers* SKC-I (5'GTC ATT TGG TAG GAG TGG CTG 3' - *forward*) e SKC-II (5-TGG TTG ATA TAG CAC TTG GTG AC-3' - *reverse*) para o gene *skc*, conforme descrito por Johnsen et al. (1999), Khan et al. (2003) e Rosey et al. (1999), e *primers* com sequência de oligonucleotídeos 5' - GCT GAA AAT GCT AAA GAA GAA C (Forward) e 5' - GCG ACA TTA CTT GTT TGT GAC (Reverse), que foram desenhados especificamente para pesquisa do gene *sua* a partir da sequência depositada no *GenBank* (registro de acesso: DQ232760.1.) por Luther, Almeida e Oliver (2008).

Foram programados em aparelho termociclador para amplificação do gene *pauA* 30 ciclos de 94 °C por 60 seg., 52 °C por 60 seg. e 72 °C por 90 seg. e para os genes *skc* e *sua* 30 ciclos de 94 °C por 60 seg., 54 °C por 60 seg. e 72 °C por 90 seg. O ciclos foram antecedidos de incubação aos 94 °C por 5 min. e ao final seguidos de extensão aos 72 °C por 5 min.

2.2.3 PFGE – *pulsed-field gel electrophoresis*

PFGE foi realizado como previamente descrito por Pereira et al. (2010). Isolados de *S. uberis* foram incubados por 18-24 h em caldo BHI (Brain Heart Infusion). As células foram centrifugadas e lavadas duas vezes com solução PIV (Tris-HCl 0.01 M, pH 8.0 e NaCl 1 M). A suspensão bacteriana foi misturada com um volume igual de agarose de baixa temperatura de gelificação (*Sigma–Aldrich*®, USA) e pipetada em gotas de 20 mL para a formação dos plugs. As células bacterianas incorporadas ao plug de agarose foram lisadas empregando-se 25U de mutanolisina e 500 µg de lisozima. O DNA foi fragmentado com 12U

de enzima de restrição *Sma*I (Amersham Biosciences®, UK) e submetido a PFGE usando o seguinte programa: tempo inicial de 1 seg., tempo final de 30 seg., tempo de corrida 23 h, ângulo de 120°, temperatura de 11,3 °C e voltagem de 6 V/cm em um aparelho CHEF DR III system (Bio-Rad Laboratories®, USA). Lamda ladder PFG Marker (New England Biolabs®, USA) foi usado como marcador de DNA. O gel foi mantido em solução com brometo de etídio e fotografado sobre iluminação UV. As imagens foram analisadas visualmente e com auxílio do software *GelAnalyser*® para pesquisar cepas geneticamente relacionadas. As bandas foram automaticamente marcadas pelo software e ajustadas manualmente. Foi gerado o tamanho de cada banda com base no marcador molecular, permitindo comparação do tamanho atribuído aos fragmentos, usado como auxílio para a análise visual entre os isolados. Isolados que mostraram 100% de similaridade foram considerados indistinguíveis (rotuladas com mesma letra e mesmo número), isolados com diferenças de até seis bandas foram considerados possivelmente relacionados (mesma letra e número diferente) e isolados diferindo mais de sete bandas foram considerados não relacionados (letras diferentes) (BELKUM et al., 2007; TENOVER et al., 1995).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram submetidos aos testes fenotípicos e moleculares para identificação de *S. uberis*, 97 isolados de *Streptococcus sp.* previamente caracterizados como ambientais, destes, 47 foram identificados genotipicamente como *S. uberis*. A figura 1 ilustra a eletroforese dos produtos de amplificação obtidos com *primers* espécie-específicos de *S. uberis*.

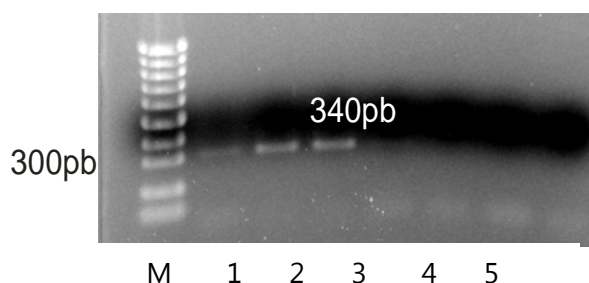


Figura 1 Resultado de PCR para identificação genotípica de *Streptococcus uberis*. Produto de amplificação (1,2,3) obtidos com *primers Stru-ubI* e *Stru-ubII* espécie-específicos de *Streptococcus uberis*. As amostras 4 e 5 são referentes a amostras que apresentaram resultado negativo na PCR. *Streptococcus sp.* (7) foi utilizado como controle negativo

A investigação do gene *sua* na população de *S. uberis* estudada revelou presença do gene em 100% das amostras. Todos os produtos de PCR apresentaram o tamanho esperado de 942 pb (Figura 2).

S. uberis associados à mastite, além de serem resistentes aos efeitos antimicrobianos da lactoferrina (Lf) bovina (CHANETON et al., 2008), produzem uma proteína que se liga a Lf, utilizando-a para realizar aderência e internalização nas células epiteliais da glândula mamária (FANG; OLIVER, 1999; FANG; ALMEIDA; OLIVER, 2000). Almeida et al. (2006) caracterizaram uma proteína que interage com a Lf, a SUAM, e observaram, em

avaliações *in vitro*, que anticorpos contra essa molécula inibiram a adesão e internalização de *S. uberis* em células epiteliais mamárias de bovinos. O que sugere que a proteína SUAM é um importante fator de virulência de *S. uberis*.

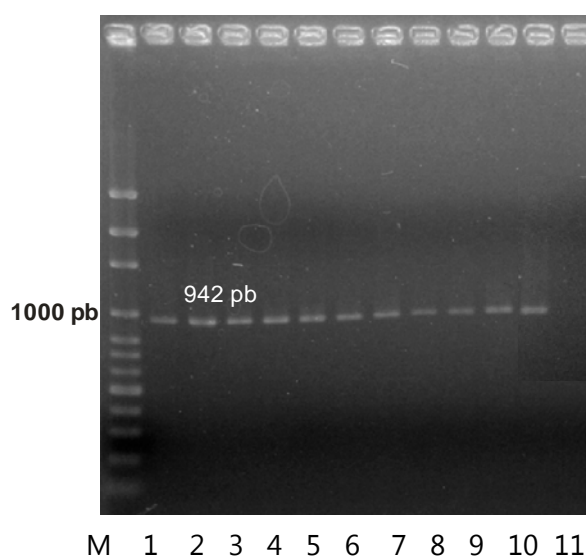


Figura 2 Resultado de PCR para detecção do gene *sua* em *Streptococcus uberis*. Produto de amplificação com tamanho 942pb utilizando *primers* específicos para o gene *sua* de *Streptococcus uberis*. Reação sem adição de DNA molde foi usada como controle negativo (12)

Patel et al. (2009) pesquisaram, *in vitro*, o papel da SUAM na internalização do *S. uberis* e encontraram um aumento significativo da internalização da bactéria em monocamada de células epiteliais mamárias bovinas (MAC-T) na presença de Lf. Confirmaram a importância da ligação do *S. uberis* a Lf por notarem diminuição da internalização após tratamento com anticorpos contra Lf e observaram ainda que com uso de anticorpos anti-SUAM a internalização foi ainda menor do que o tratamento com anticorpos anti-Lf. Diante dos achados, esses pesquisadores concluíram que *S. uberis* liga-se a Lf através da SUAM de forma a criar uma ponte molecular com o receptor de Lf

presente nas células epiteliais mamárias de bovinos, o que facilitaria a internalização do agente nas células do epitélio mamário. Esse fator de virulência permitiria ao patógeno escapar dos mecanismos de defesa do hospedeiro (PATEL et al., 2009).

A internalização do *S. uberis* nas células epiteliais mamárias pode ser bloqueada por anticorpos contra SUAM (PATEL et al., 2009), confirmando o potencial dessa adesina como antígeno para o desenvolvimento de vacinas para controle da mastite por esse agente. Outras propriedades que endossam o uso de SUAM como antígeno seriam a ampla frequência e o alto nível de conservação do gene codificador na população de *S. uberis*, características sustentadas pelo presente trabalho em concordância com outros autores (LUTHER; ALMEIDA; OLIVER, 2008).

Os resultados obtidos sugerem que SUAM é de fato um importante fator de virulência de *S. uberis* isolados de mastite e a presença desse gene em todas as cepas da população estudada sustenta a suspeita de que essa proteína poderia ter papel essencial na patogênese da mastite por *S. uberis*.

No presente estudo os genes *pauA* e *skc* foram detectados em 43 (91%) dos 47 *S. uberis* pesquisados (Gráfico 1). As amostras positivas para os dois pares de *primers* foram as mesmas, ou seja, todas as amostras positivas amplificaram com os *primers* para *pauA* e *skc* e as negativas não apresentaram amplificação de ambos. Observou-se o tamanho esperado dos produtos de 800pb para *pauA* e 1130 pb para *skc* nas amostras investigadas.

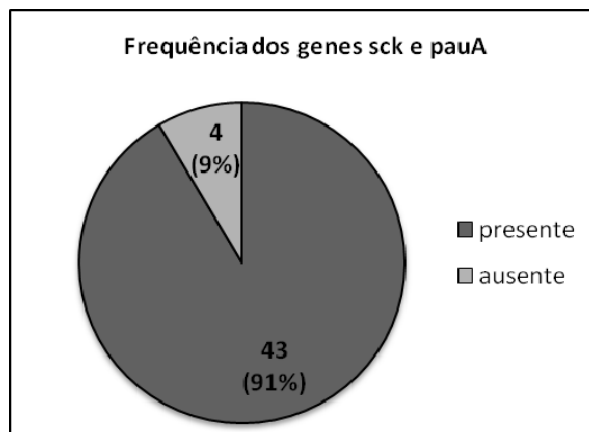


Gráfico 1 Frequência dos genes *pauA* e *skc* em *Streptococcus uberis* associados a mastite bovina

Estreptoquinase é uma enzima ativadora de plasminogênio comum a muitas espécies patogênicas do gênero *Streptococcus* e uma proteína com essa mesma propriedade foi purificada por Leigh (1993) em *S. uberis*. Em função de diferenças na estrutura e especificidade de substratos, o ativador de plasminogênio de *S. uberis* foi considerado diferente daquelas presentes em outras espécies do gênero *Streptococcus*. Foi então proposto o termo “ativador de plasminogênio de *S. uberis*” (PauA) ao invés de estreptoquinase (LEIGH, 1994). Rosey et al. (1999) realizaram o sequenciamento do gene codificador do ativador de plasminogênio de *S. uberis*, o gene *pauA*. Entretanto, Johnsen et al. (1999) sequenciaram o gene de um outro ativador de plasminogênio de *S. uberis* que foi designado gene *sck*, mostrando que esse gene seria relacionado a outras estreptoquinases conhecidas. Contudo, os registros submetidos ao BLAST NCBI (*pauA*: acesso AJ312396, *sck*: acesso AJ006413) mostram alta similaridade entre as sequências de nucleotídeos e inclusive similaridade dos *primers* utilizados para *pauA* com sequência do gene *sck*. Ou seja, mesmo que sejam genes distintos os *primers* utilizados com o objetivo de amplificar o gene *pauA* também poderiam amplificar o gene *sck*. Na sequência do genoma completo de

S. uberis, registrada no GenBank (acesso: AM946015.1), não há gene *skc* e PauA é descrito como proteína da família das estreptoquinases. Um estudo realizado por Khan et al. (2003) com os *primers* previamente descritos para *pauA* e *skc* revelou, assim como o presente trabalho, igual frequências dos dois genes na população bacteriana estudada, sendo as mesmas as amostras positivas para ambos. As informações sobre investigação desses genes, associados às informações contidas no GenBank sugerem que *pauA* e *skc*, descritos para *S. uberis*, na realidade são o mesmo gene, o que poderá ser confirmado pelo seqüenciamento dos produtos de amplificação dos referidos genes.

Estudos sugerem que PauA é diferente das estreptoquinases de outras espécies, por diferenças na sequência de nucleotídeos dos genes (LEIGH, 1993, 1994; ROSEY et al., 1999) e por localização distinta de *pauA* dentro do cromossoma de *S. uberis* em relação a genes de estreptoquinase de outros grupos de estreptococos. Especula-se inclusive que o gene *pauA* tenha surgido como resultado de um evento evolutivo independente, sem relação com o que deu origem as estreptoquinases de outras bactérias (ROSEY et al., 1999).

A investigação do gene de virulência *pauA/skc* entre as amostras de *S. uberis* realizada neste trabalho revelou alta frequência desses genes, em concordância com os resultados obtidos por Khan et al. (2003) que detectaram presença dos genes *pauA* e *sck* em 126 (97%) de 130 amostras de *S. uberis* investigadas.

Outras pesquisas apontam alta prevalência do alelo *pauA* em isolados de campo provenientes de vários países, nas amostras em que o *pauA* é ausente aparece o *pauB*, como um ativador alternativo, o que indica a importância desse fator de virulência para o microrganismo (WARD; LEIGH, 2002).

Observou-se o tamanho esperado de 800pb (Figura 3) para todos os produtos da amplificação de *pauA* e não houve indicativo de polimorfismo do fragmento entre as amostras de *S. uberis*. Khan (2002) relatou ausência de

polimorfismo na amplificação do gene *pauA/skc* e concluiu que os genes parecem ser altamente conservados entre isolados de *S. uberis*. Estudos prévios sobre a homologia do gene *pauA* também relataram evidências que sustentam essa afirmação, como o reportado por Rosey et al. (1999), que investigaram genes *pauA* de *S. uberis* provenientes de do Reino Unido, Dinamarca e Estados Unidos e encontraram 99% de similaridade.

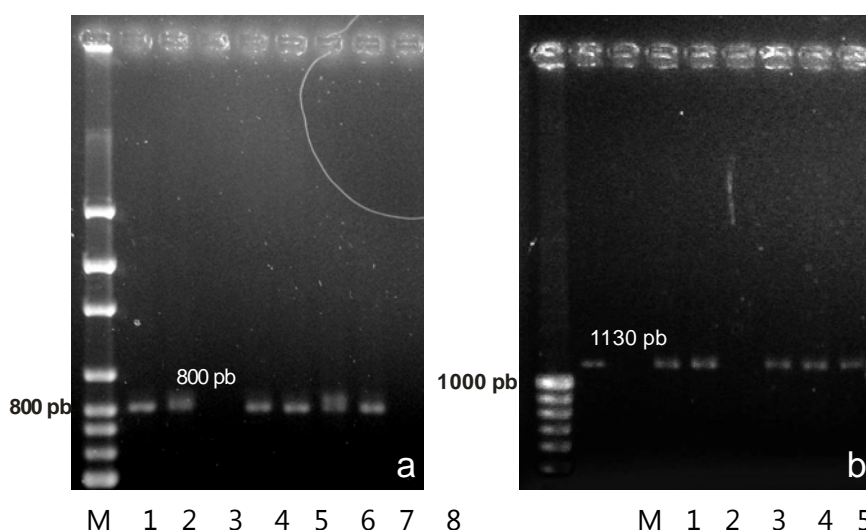


Figura 3 Resultados de PCR para detecção de genes *pauA* e *skc* de *Streptococcus uberis*. a) produtos de amplificação com tamanho de 800pb gerados com uso de *primers* p38 e p39 direcionados para o gene *pauA* (1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7) b) produtos de amplificação com tamanho 1130pb gerados com uso de *primers* *skc*-I e *skc*-II específicos para o gene *skc* de *Streptococcus uberis* (1, 3, 4, 6, 7, 8). Reações sem a adição de DNA molde foram empregadas como controle negativo (8 em a e 2 em b)

A ampla distribuição e alta conservação do gene *pauA* entre os isolados de distintas localizações geográficas são indicativos de que o ativador de plasminogênio possui propriedades muito úteis para o desenvolvimento de vacinas contra mastite por *S. uberis*. Pesquisas neste campo tem confirmado o

potencial de *pauA* como antígeno para vacina. Leigh et al. (1999) avaliaram a imunização de vacas com sobrenadante concentrado contendo PauA e, após infecção experimental, observaram que a contagem bacteriana e a contagem de células somáticas no leite desses animais foi muito inferior em relação aos animais do grupo controle. Esses pesquisadores realizaram ainda imunização com uma preparação similar, porém com PauA removido, que não mostrou nenhum efeito protetivo. Tais achados sugerem que a resposta inibitória para essa proteína foi importante na prevenção da colonização da glândula mamária, conferindo proteção contra mastite por *S. uberis*.

Uma possível explicação para o mecanismo de inibição envolvido no bloqueio dos ativadores de plasminogênio de *S. uberis* é a suspeita de que a ativação de plasminogênio por PauA facilita o crescimento da bactéria por efeito indireto da hidrólise de caseínas em peptídeos que contém aminoácidos essenciais. A resposta protetora inibiria essa rota para a obtenção de nutrientes essenciais para a bactéria.

Quanto aos resultados do estudo de diversidade genética de *S. uberis*, pelo método de PFGE, das 47 amostras submetidas à análise por PFGE uma foi excluída por não apresentar visualização satisfatória das bandas.

Foram identificados 41 diferentes padrões de fragmentos de restrição de DNA obtidos por PFGE entre as 46 amostras de *S. uberis* analisadas. Cinco subtipos verificados no PFGE apresentaram dois isolados com padrões semelhantes. Seguindo os critérios de interpretação delineados por Tenover et al. (1995) e as recomendações de Belkum et al. (2007), esses isolados foram classificados como “indistinguíveis” e identificados como subtipos D1, M2, P2, R2 e S1 (Figura 4).

Os isolados de *S. uberis* indistinguíveis foram procedentes de vacas diferentes, mas do mesmo rebanho (Figura 4). Dos quatro rebanhos que apresentaram dois isolados indistinguíveis, apenas um teve mais de um subtipo

com duas amostras. Trata-se de um rebanho que apresentou um surto de mastite por *S. uberis*. A presença de dois subtipos infectando pelo menos quatro animais diferentes associadas à existência de outros três subtipos distintos, ou seja, cinco subtipos infectando sete animais na mesma época, é indício de que os casos podem ser atribuídos à infecção por fonte ambiental comum e não por transmissão entre os animais, visto que nesse caso o esperado é que houvesse predomínio de cepas indistinguíveis.

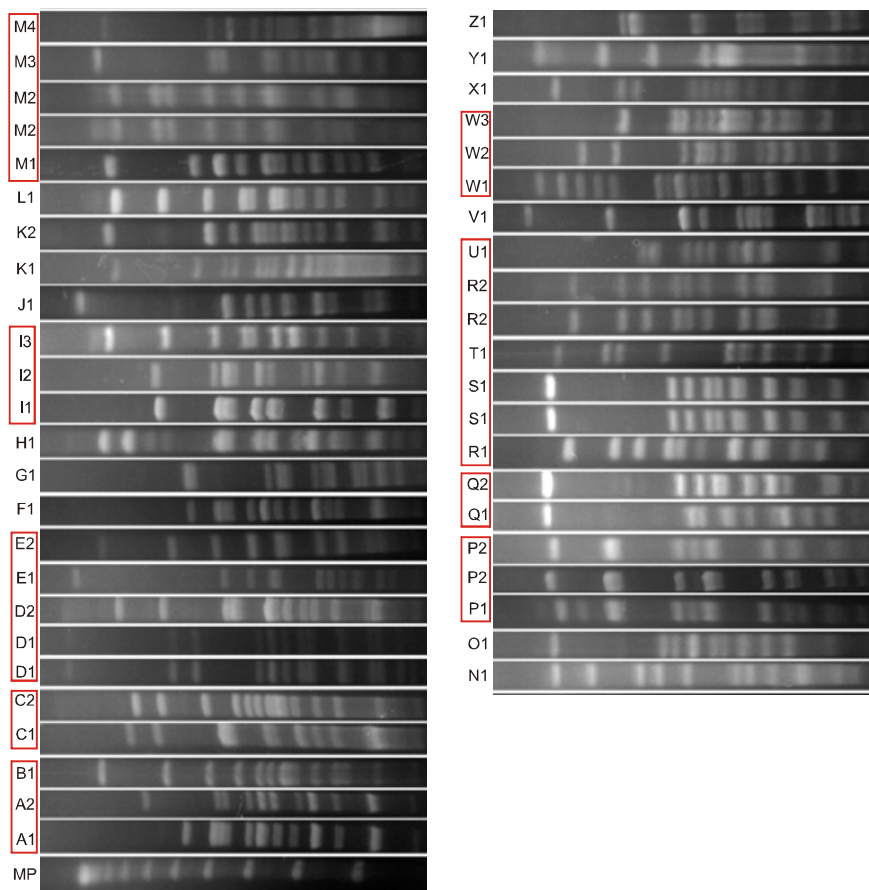


Figura 4 Resultado de PFGE de *Streptococcus uberis*. Letras iguais com números diferentes identificam cepas geneticamente relacionadas, letras iguais com números iguais identificam isolados indistinguíveis. Retângulos delimitam isolados de um mesmo rebanho

O subtipo M2 foi o único que apresentou diferença na forma de apresentação da doença entre os dois isolados indistinguíveis, um foi procedente de mastite subclínica e o outro de um caso de mastite clínica. Os demais subtipos com duas amostras foram provenientes de mastite subclínica. Entretanto o número pequeno de amostras que permitam esse tipo de associação impossibilita inferências estatísticas sobre a virulência de cepas indistinguíveis.

O fato de patógenos clonais gerarem doenças com diferentes graus de severidade pode ser devido a fatores relacionados ao hospedeiro, como condição de saúde do úbere, nutrição, genética, ordem e estágio de lactação (JAYARAO et al., 1999).

Douglas et al. (2000) encontraram, na Nova Zelândia, ampla diversidade de padrões genômicos por PFGE. Verificaram, inclusive, duas amostras com padrões distintos, obtidas de um mesmo quarto. Esses autores relataram ainda a existência de algumas amostras similares isoladas de dois quartos diferentes da mesma vaca e de duas vacas diferentes do mesmo rebanho, o que sugere, segundo os autores, transmissão do patógeno entre os quartos ou entre as vacas. Contudo, não se descarta a possibilidade de haver fontes de contaminação comuns, nesses casos.

Rato et al. (2008) analisaram 30 isolados de *S. uberis* e encontraram duas amostras do mesmo tipo por PFGE (com 100% de similaridade) infectando vacas diferentes de uma mesma fazenda, os autores argumentam que tal achado é forte indício de que pode ocorrer transmissão do *S. uberis* de vaca a vaca no processo de ordenha, embora a grande heterogeneidade da população indique que a maioria das infecções provém do ambiente.

A grande diversidade de padrões genômicos observada confirma a ampla diversidade genética da população de *S. uberis* isolados de mastite bovina descrita por outros autores. Wang et al. (1999) encontraram *S. uberis* isolados de vacas diferentes apresentando, quase invariavelmente, padrões genômicos distintos. Esses autores sugerem que essa alta heterogeneidade encontrada confirma os clássicos estudos epidemiológicos sobre essa espécie, que indicam o ambiente como sendo o principal reservatório, com limitados casos de transmissão de uma vaca a outra durante o processo de ordenha.

Os resultados deste estudo, em concordância com relatos de outras pesquisas (RATO et al., 2008), convergem para a conclusão de que a infecção

por *S. uberis* em rebanhos leiteiros é, na maior parte dos casos, devida a infecções oportunistas por uma ampla variedade de tipos deste agente, que podem estar presentes nas vacas e no ambiente da fazenda.

4 CONCLUSÕES

PFGE apontou uma ampla diversidade genética da população de *S. uberis* estudada, com poucos casos de amostras indistinguíveis provenientes de animais diferentes.

Verificou-se ampla frequência dos genes *pauA*, *skc* (ambos 91%) e *sua* (100%) na população de *S. uberis* estudada, que sugere a importância destes fatores de virulência para o patógeno.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, R. A. et al. Identification, isolation, and partial characterization of a novel *Streptococcus uberis* adhesion molecule (SUAM). **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 115, n. 1/3, p. 183-191, June 2006.
- BASEGGIO, N. et al. Strain differentiation of isolates of streptococci from bovine mastitis by pulsed-field gel electrophoresis. **Molecular and Cellular Probes**, London, v. 11, n. 5, p. 349-354, Oct. 1997.
- BELKUM, A. van et al. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. **Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, Malden, v. 13, n. 3, p. 1-46, Oct. 2007.
- BRADLEY, A. J. Bovine mastitis: an evolving disease. **The Veterinary Journal**, Amsterdam, v. 164, n. 2, p. 116-128, Sept. 2002.
- CHANETON, L. et al. Relationship between milk lactoferrin and etiological agent in the mastitic bovine mammary gland. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 91, n. 5, p. 1865-1873, May 2008.
- DOUGLAS, V. L. et al. Genomic typing of *Streptococcus uberis* isolates from cases of mastitis, in New Zealand dairy cows, using pulsed-field gel electrophoresis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 75, n. 1, p. 27-41, July 2000.
- FANG, W.; ALMEIDA, R. A.; OLIVER, S. P. Effects of lactoferrin and milk on adherence of *Streptococcus uberis* to bovine mammary epithelial cells. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 61, n. 3, p. 275-279, Mar. 2000.
- FANG, W.; OLIVER, S. P. Identification of lactoferrin-binding proteins in bovine mastitis-causing *Streptococcus uberis*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 176, n. 1, p. 91-96, July 1999.
- HASSAN, A. A. et al. Evaluation of PCR methods for the rapid identification and differentiation of *Streptococcus uberis* and *Streptococcus parauberis*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, n. 4, p. 1618-1621, Apr. 2001.

HILL, A. W.; LEIGH, J. A. DNA fingerprinting of *Streptococcus uberis*: a useful tool for epidemiology of bovine mastitis. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 103, n. 1, p. 165-171, Aug. 1989.

JAYARAO, B. M. et al. Epidemiology of *Streptococcus uberis* intramammary infections in a dairy herd. **Journal of Veterinary Medicine**, Berlin, v. 46, n. 7, p. 433-442, Sept. 1999.

_____. Subtyping of *Streptococcus uberis* by DNA amplification fingerprinting. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v. 30, n. 5, p. 1347-1350, May 1992.

JOHNSEN, L. B. et al. Purification and cloning of a streptokinase from *Streptococcus uberis*. **Infection and Immunity**, Berlin, v. 67, n. 3, p. 1072-1078, Mar. 1999.

KHAN, I. U. **Identification and further characterization of *Streptococcus uberis* and *Streptococcus parauberis* isolated from bovine milk samples.** 2002. 147 p. Thesis (Ph.D. in Veterinary Science) - Justus Liebig University, Giessen, 2002.

KHAN, I. U. et al. Identification and epidemiological characterization of *Streptococcus uberis* isolated from bovine mastitis using conventional and molecular methods. **Journal of Veterinary Science**, Suwon, v. 4, n. 3, p. 213-223, Dec. 2003.

LEIGH, J. A. Activation of bovine plasminogen by *Streptococcus uberis*. **FEMS Microbiology Letters**, Malden, v. 114, n. 1, p. 67-72, Nov. 1993.

_____. Purification of a plasminogen activator from *Streptococcus uberis*. **FEMS Microbiology Letters**, Malden, v. 118, n. 1/2, p. 153-158, May 1994.

_____. Review *Streptococcus uberis*: a permanent barrier to the control of bovine mastitis? **The Veterinary Journal**, Amsterdam, v. 157, n. 3, p. 225-238, May 1999.

LEIGH, J. A. et al. Vaccination with the plasminogen activator from *Streptococcus uberis* induces an inhibitory response and protects against experimental infection in the dairy cow. **Vaccine**, Rochester, v. 17, n. 7/8, p. 851-857, Feb. 1999.

LUTHER, D. A.; ALMEIDA, R. A.; OLIVER, S. P. Elucidation of the DNA sequence of *Streptococcus uberis* adhesion molecule gene (*sua*) and detection of *sua* in strains of *Streptococcus uberis* isolated from geographically diverse locations. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 128, n. 3/4, p. 304-312, Apr. 2008.

PATEL, D. et al. Bovine lactoferrin serves as a molecular bridge for internalization of *Streptococcus uberis* into bovine mammary epithelial cells. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 137, n. 3/4, p. 297-301, June 2009.

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.

PHUEKTES, P. et al. Molecular epidemiology of *Streptococcus uberis* isolates from dairy cows with mastitis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, n. 4, p. 1460-1466, Apr. 2001.

RATO, M. G. et al. Molecular epidemiology and population structure of bovine *Streptococcus uberis*. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 91, n. 12, p. 4542-4551, Dec. 2008.

ROSEY, E. L. et al. *PauA*: a novel plasminogen activator from *Streptococcus uberis*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 178, n. 1, p. 27-33, Sept. 1999.

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

TENOVER, F. C. et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, n. 9, p. 2233-2239, Sept. 1995.

WANG, S. M. et al. Epidemiological typing of bovine streptococci by pulsed-field gel electrophoresis. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 123, n. 2, p. 317-324, Oct. 1999.

WARD, P. N. et al. Complex interactions between bovine plasminogen and streptococcal plasminogen activator *PauA*. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 342, n. 4, p. 1101-1114, May 2004.

WARD, P. N.; LEIGH, J. A. Characterization of *PauB*, a novel broad-spectrum plasminogen activator from *Streptococcus uberis*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 184, n. 1, p. 119-125, Jan. 2002.

ZADOKS, R. N. et al. Clinical, epidemiological and molecular characteristics of *Streptococcus uberis* infections in dairy herds. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 130, n. 2, p. 335-349, Apr. 2003.

CAPÍTULO 3

Concentração inibitória mínima de antimicrobianos contra *Streptococcus uberis* associados à mastite bovina

RESUMO

Nas últimas décadas a mastite ambiental tornou-se um problema crescente, principalmente em rebanhos nos quais as medidas adotadas para o controle de infecções por patógenos contagiosos foram bem sucedidas. Entre os agentes da mastite ambiental, *Streptococcus uberis* destaca-se pela grande participação em infecções clínicas e subclínicas. A aferição do perfil de susceptibilidade do agente aos antimicrobianos fornece dados valiosos para a escolha adequada de fármacos para o tratamento de casos clínicos e a terapia no período seco. O objetivo do presente estudo foi determinar, por meio da concentração inibitória mínima (CIM), pelo método de microdiluição, a susceptibilidade aos antimicrobianos para 47 *S. uberis* isolados de mastite bovina em rebanhos leiteiros na região sul de Minas Gerais (Brasil). Foi determinada a CIM para 50% e para 90% dos *S. uberis* para os antimicrobianos ampicilina, cefalotina, ceftiofur, enrofloxacina, estreptomicina, florfenicol, gentamicina, lincomicina, penicilina e tetraciclina. Observou-se elevado nível de resistência a estreptomicina (MIC₉₀=1024,0 µg/mL). Os demais antimicrobianos apresentaram níveis altos de susceptibilidade, entretanto, na maioria dos fármacos avaliados foram encontrados isolados resistentes. As variações observadas nos perfis de resistência, entre os diferentes isolados e em relação aos dados da literatura, apontam a necessidade de execução de testes de susceptibilidade aos antimicrobianos para indicação adequada da terapia ou para monitoramento da resistência aos antimicrobianos.

Palavras-chave: Mastite bovina. *Streptococcus uberis*. Concentração inibitória mínima. Susceptibilidade a antimicrobianos. Perfil de resistência.

ABSTRACT

In recent decades, environmental mastitis has become an increased problem, particularly in well-managed herds that have obtained success in controlling infectious agents. Among these pathogens, *Streptococcus uberis* is responsible for a large proportion of infections. Information about antimicrobial susceptibility can be valuable in the selection of suitable drugs for the treatment of mastitis by *S. uberis*. The aim of this study was to determine the antimicrobial susceptibility of *S. uberis* isolated from bovine mastitis in dairy cattle in southern Minas Gerais, in Brazil, by means of minimum inhibitory concentration (MIC) by microdilution method. Was determined the MIC for 50% and 90% of *S. uberis* for the following antimicrobials: ampicillin, cephalothin, ceftiofur, enrofloxacin, streptomycin, florfenicol, gentamicin, lincomycin, penicillin and tetracycline. High-level resistance to streptomycin was observed. The others presented high levels of antimicrobial susceptibility, however, in most of the drugs evaluated were found resistant isolates. The observed variations in resistance profiles, between the different isolates and compared to literature data, suggest the need to perform antibiotic susceptibility tests to indicate adequate therapy and for monitoring antimicrobial resistance.

Keywords: Bovine mastitis. *Streptococcus uberis*. Minimum inhibited concentration. Antimicrobial resistance.

1 INTRODUÇÃO

A mastite bovina é a doença mais cara do rebanho leiteiro. Os prejuízos gerados pela mastite a produtores e laticínios são atribuídos a vários fatores relacionados à doença, como o gasto com medicamentos para o tratamento dos casos clínicos, perda de animais por morte ou descarte, diminuição da qualidade do leite, redução do tempo de prateleira, redução do rendimento na produção de derivados e, principalmente, redução na produção do leite, que é a perda menos percebida pelo produtor, porém a mais importante (PHILPOT; NICKERSON, 2002).

Nas últimas décadas a disseminação das medidas de controle da mastite tem sido eficiente na diminuição das infecções intramamárias (IIM) causadas por patógenos contagiosos, entretanto têm sido pouco efetivas contra patógenos ambientais, conseqüentemente, a mastite ambiental tornou-se um problema crescente, principalmente em rebanhos bem manejados que obtiveram sucesso no controle dos agentes contagiosos (JAYARAYO et al., 1999). Entre esses agentes está *Streptococcus uberis*, um importante patógeno ambiental associado à mastite bovina, responsável por grande proporção das infecções (DOUGLAS et al., 2000; PHUEKTES et al., 2001).

IIM causadas por *S. uberis* tem aumentado nos rebanhos leiteiros em todo o mundo. Atribui-se a esse patógeno prevalências de até 23% dos casos de mastite em alguns países (BRADLEY, 2002), sendo agente muito frequente em países como Canadá, Estados Unidos, Holanda, Reino Unido, Nova Zelândia e Austrália. Contudo, apesar de sua importância, a epidemiologia da mastite por *S. uberis* ainda é pouco estudada (PHUEKTES et al., 2001).

A antibioticoterapia via intramamária é um método de combate amplamente utilizado em casos de mastite bovina. Prévios estudos têm reportado cepas resistentes a alguns antimicrobianos (OWENS et al., 1990). Assim,

informações de susceptibilidade aos antimicrobianos podem ser valiosas na eleição de fármacos adequados no tratamento da mastite por *S. uberis* (ROSSITO et al., 2002).

O objetivo do presente estudo foi determinar a susceptibilidade aos antimicrobianos de *S. uberis* isolados de mastite bovina em rebanhos leiteiros na região sul de Minas Gerais, no Brasil, por definição da concentração inibitória mínima (CIM) pelo método de microdiluição.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os 47 isolados previamente identificados como *S. uberis*, por PCR com uso de *primers* espécie-específicos, foram avaliados quanto a sua susceptibilidade aos antimicrobianos pelo método de microdiluição em caldo seguindo a metodologia padronizada pela Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI (2006).

Para realização dos testes foi utilizado o caldo Müller Hinton (Difco, USA) suplementado com cátions divalentes, cálcio e magnésio (CAMHB) e 5% de sangue lisado de equino.

Os antimicrobianos testados foram: ampicilina, cefalotina, ceftiofur, enrofloxacina, estreptomicina, florfenicol, gentamicina, lincomicina, penicilina e tetraciclina. Solvidos, diluídos e estocados conforme as recomendações do CLSI (2008). O intervalo de diluições de cada antibiótico, apresentados na tabela 2, foi escolhido com base em prévias publicações de estudos sobre CIM em *S. uberis* e foi, em alguns casos, reformulado para maiores ou menores concentrações visando aumentar a precisão do resultado.

Os isolados selecionados foram incubados em caldo BHI aos 36 °C por 18-24 h e após crescimento foram preparadas as suspensões bacterianas em solução salina 0,85% ajustadas a escala 0,5 de MacFarland, o que corresponde a aproximadamente, 10^8 unidades formadoras de colônias (UFC) por mililitro (mL). Essa suspensão foi diluída na proporção 1:10 em CAMHB suplementado com sangue lisado de equino, obtendo-se uma concentração final de aproximadamente 10^7 UFC/mL.

Tabela 2 Intervalos de diluição dos antimicrobianos usados na determinação da concentração inibitória mínima para *Streptococcus uberis* associados a mastite bovina

Antimicrobiano	Concentração (µg/mL)
Estreptomicina	2-1024
Gentamicina	0,25-128
Lincomicina	0,016- 128
Ceftiofur	0,06-64
Cefalotina	0,06-64
Penicilina	0,016-8
Ampicilina	0,016-8
Enrofloxacina	0,016-8
Florfenicol	0,13-64
Tetraciclina	0,016-64

Microplacas estéreis de 96 poços foram utilizadas. Em cada poço foram adicionados 100 µL de CAMBH com 5% de sangue lisado de equino, nos poços da primeira coluna das placas foi adicionado 100 µL de solução do antibiótico testada, diluída no mesmo caldo (solução de uso) obtendo-se assim a concentração inicial de cada droga. A partir da primeira coluna de poços diluições seriadas de base 2 foram realizadas nas demais colunas de poços com o auxílio de pipeta automática multicanal, obtendo-se concentrações decrescentes, com intervalos de diluição variáveis entre os antimicrobianos testados. Os testes foram feitos em duplicata. As duas últimas colunas da microplaca não receberam antibiótico, a penúltima coluna usada como controle positivo de crescimento e a última, contendo apenas o meio de cultura, como controle de esterilidade do material, dos meios e das soluções utilizadas.

Após a diluição do antibiótico, foi feita adição de 5 µL do inóculo em cada poço. As microplacas foram depois agitadas suavemente por cinco minutos e então incubadas aos 37 °C por 20 horas. Após o tempo de incubação foram

feitas as leituras dos resultados considerando-se CIM a menor diluição do antibiótico capaz de inibir visivelmente o crescimento bacteriano.

O controle de qualidade dos testes de microdiluição foi feito como recomendado pelo CLSI (2008) com as amostras: *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 49619), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212).

Em função da carência de critérios interpretativos bem estabelecidos para *S. uberis*, o perfil de susceptibilidade foi avaliado com base em diferentes critérios de interpretação citados em outros trabalhos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 3 encontram-se relacionados os valores de CIM para 90% das amostras (CIM90) e para 50% das amostras testadas (CIM 50), bem como a distribuição dos isolados entre as CIM dos antimicrobianos avaliados, com exceção de estreptomicina.

Tabela 3 Distribuição da concentração inibitória mínima (CIM) de nove antibióticos para 47 *Streptococcus uberis* associados à mastite bovina em rebanhos leiteiros no sul de Minas Gerais, Brasil

Antibiótico	Número de isolados para CIM indicada ($\mu\text{g/mL}$)													
	0,016	0,03	0,06	0,13	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128
Gentamicina					1	0	8	11	<u>16</u>	9	2	0	0	0
Lincomicina	20	<u>3</u>	4	0	2	0	0	2	5	4	2	2	1	2
Ceftiofur			10	5	<u>15</u>	9	4	1	1	2	0	0	0	0
Cefalotina			1	5	5	<u>19</u>	4	4	5	1	3	0		
Penicilina	7	6	7	<u>11</u>	5	6	4	0	0	0	1			
Ampicilina	0	7	10	5	<u>10</u>	11	3	0	0	0	1			
Enrofloxacina	0	0	0	1	0	5	16	<u>23</u>	2					
Florfenicol				0	0	1	6	<u>26</u>	14	0	0	0	0	0
Tetraciclina	1	0	7	7	<u>10</u>	5	3	0	4	3	3	3	1	0

Números sublinhados indicam a CIM para 50% das amostras (CIM50), números em negrito indicam a CIM para 90% das amostras (CIM90) e números em negrito sublinhados indicam mesmo valor para CIM50 e CIM90

Em recentes pesquisas sobre CIM, isolados tem sido classificados como susceptíveis ou resistentes baseado em valores de corte epidemiológico espécie-específicos publicados pelo *European Committee on Antimicrobial Susceptibility testing* (EUCAST) ([HTTP://www.eucast.org](http://www.eucast.org)). No entanto, não há valores definidos para *Streptococcus uberis*, em função da carência de dados, o que impossibilita o uso desse método de avaliação (BENGTSSON et al., 2009). Pela

falta de padrões para interpretação, optou-se nesse trabalho por discutir os resultados baseado nos critérios adotados por outros pesquisadores.

Detectou-se alto nível de resistência a estreptomicina no presente estudo. 40,4 % da população de *S. uberis* pesquisada apresentaram CIM maior ou igual a 1024 µg/mL. Guérin-Faubleé et al. (2002) reportaram resistência de *S. uberis* a estreptomicina em 18% dos isolados *S. uberis*, níveis também bastante elevados. Owens et al. (1990) classificaram como resistentes 80% de *Streptococcus sp.*, incluindo *S. uberis*, e 12% como intermediário pelo método de disco de difusão e relataram 73% das amostras de *S. uberis* analisadas apresentando CIM maior do que 128 µg/mL. Neste estudo encontrou-se CIM50 e CIM90 de 32 e 1024 µg/mL. Pitkälä et al. (2004) e Pitkälä, Koort e Björkroth (2008), em estudo realizado na Finlândia, encontraram valores de CIM50 e CIM90 consideravelmente mais baixos, 64 e 128 µg/mL, respectivamente, ainda assim, como nos demais trabalhos citados e no presente estudo, os autores consideraram alto o nível de resistência a estreptomicina na população de *S. uberis* estudada.

O CIM50 e CIM90 encontrados para Gentamicina (4 e 8 µg/mL, respectivamente) foram consideravelmente mais baixos do que os relatados por outros autores. Pitkälä et al. (2004), que relataram CIM50 E CIM90 de 16 e 32 µg/mL, respectivamente. Pitkälä, Koort e Björkroth (2008), relataram CIM50 e CIM90 ambos de 32 µg/mL e não observaram níveis baixos de resistência a aminoglicosídeos, conforme o critério interpretativo recomendado pelo CLSI de triagem de altos níveis de resistência a gentamicina (500µg/mL) e a estreptomicina (1000µg/mL). Guérin-Faubleé et al. (2002) também relataram ausência de cepas altamente resistentes a gentamicina entre os isolados investigados.

O teste de CIM para lincomicina foi feito com intervalo de diluições mais amplo, de 128 a 0,016 µg/mL. Não há valores definidos de critérios interpretativos específicos para *S. uberis* isolados de mastite bovina disponibilizados pelo CLSI ou pelo EUCAST. Considerando-se o padrão interpretativo adotado por Guérin-Faubleé et al. (2002) ($S < 2,0$ µg/mL e $R > 16,0$ µg/mL) 10,6% dos isolados pesquisados foram classificados como resistentes. Os autores citados relataram que entre 50 amostras testadas, 14 apresentaram-se altamente resistentes a lincomicina com $CIM > 128$ µg/mL, e cinco amostras apresentaram susceptibilidade intermediária. Embora os níveis de resistência relatados por esses autores sejam maiores em relação aos observados no presente estudo, o nível de susceptibilidade de 64% foi semelhante.

Rossitto et al. (2002) classificaram apenas 27,1% das amostras de *S. uberis* estudadas como sensíveis a tetraciclina, utilizando critério definido por National Committee for Clinical Laboratory Standards - NCCLS (2000) baseado em dados humanos (sensíveis menor ou igual a 2 µg/mL). Utilizando-se o mesmo critério para os resultados do presente estudo, 70,2% dos isolados foram classificados como susceptíveis a tetraciclina, assim, o nível de resistência é muito inferior em relação ao encontrado pelos autores citados. Nível aproximado foi encontrado por Guérin-Faubleé et al. (2002), que relataram 78% de susceptibilidade de *S. uberis* a Tetraciclina. Entretanto, critérios interpretativos de susceptibilidade baseados em dados de isolados humanos podem não prever a eficácia clínica do antimicrobiano no tratamento da mastite bovina (ROSSITTO et al., 2002). Isso ocorre em função do limitado histórico de dados de CIM disponíveis para patógenos de mastite bovina, particularmente, estreptococos ambientais (SALMON et al., 1998; WATTS; SALMON; YANCEY JUNIOR, 1995). Rossitto et al. (2002) reportaram CIM50 e CIM90 ambos de 16 µg/mL em 133 *S. uberis* analisados, o resultado de CIM50 foi superior em relação ao resultado do presente trabalho, no qual se observou

CIM50=0,25 µg/mL. O CIM90 é próximo ao valor de 32,0 µg/mL encontrado neste estudo. Embora resultados de algumas pesquisas, como os deste trabalho, revelam existência de isolados resistentes a tetraciclina, Giannechini, Concha e Franklin (2002) não encontraram resistência a tetraciclina em *S. uberis* associados à mastite, Roesch et al. (2006) relataram resultado semelhante. Contudo, distribuição de CIM que se assemelha à deste estudo foi relatada por Bengtsson et al. (2009), que, embora não tenham aplicado critérios pela ausência de valores de corte epidemiológico específicos definidos pelo EUCAST, consideraram a distribuição bimodal de CIM como indicativo da aquisição de resistência em alguns isolados.

Pitkälä, Koort e Björkroth (2008) relataram nove isolados resistentes a tetraciclina, oito desses foram classificados como sendo do mesmo tipo por RFLP (polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição) (ribotipagem). Os isolados resistentes à tetraciclina apresentaram participação nos casos clínicos significativamente maior que o no número de isolados de casos subclínicos. Considerando-se o critério de interpretação definido pelo CLSI (2008) definido para outros microrganismos isolados de doença respiratória de bovinos (resistentes CIM maior ou igual a 128µg/mL), apenas três das oito amostras associadas a casos clínicos apresentaram resistência, todas com CIM=1024 µg/mL. Entre as 21 amostras consideradas resistentes a tetraciclina, apenas três foram isoladas de casos clínicos. Ou seja, a associação relatada por Pitkälä, Koort e Björkroth (2008) não foi encontrada no presente estudo.

Considerando o critério adotado por Rossitto et al. (2002), baseado em patógenos isolados de doença respiratória de bovinos (sensível menor ou igual a 2 µg/mL), 93,6% dos isolados testados neste estudo seriam classificados como sensíveis ao ceftiofur, nível muito semelhante ao encontrado por esses autores (93,2%). A CIM50 e CIM90 de ceftiofur encontradas no presente estudo (0,25 e 2,0 µg/mL) foram próximas aos valores encontrados por Rossitto et al. (2002) de

0,5 e 2 µg/mL, respectivamente, entretanto 0,5 µg/mL foi a menor concentração avaliada por esses autores. Pol e Ruegg (2007) reportaram CIM50 e CIM90 de ceftiofur para espécies de *Streptococcus* sp. isolados de mastite, excetuando-se *S. agalactiae*, ambos de 0,5 µg/mL e não encontraram nenhum isolado com crescimento em concentrações maiores do que 1 µg/mL. Utilizando-se de critérios delineados pelo CLSI para patógenos de doença respiratória de bovinos, o mesmo limiar utilizado por Rossitto et al. (2002), classificaram todas as amostras testadas como sensíveis ao ceftiofur.

Para cefalotina, o valor de CIM50 encontrado no presente trabalho (0,5 µg/mL) foi mais baixo que o CIM50 de 1,0 µg/mL relatado por Rossitto et al. (2002), mas essa diferença pode ser explicada pelo fato de que essa foi a menor concentração testada por esses autores. O referido autor relatou o mesmo valor de 1 µg/mL para CIM90, concentração mais baixa do que a encontrada neste estudo (8,0 µg/mL). Salmon et al. (1998) encontraram valores de semelhantes ao deste trabalho de 0,25 e 8,0 µg/mL respectivamente para CIM50 e CIM90. Considerando o critério adotado por Rossitto et al. (2002) (sensíveis menor ou igual a 8,0 µg/mL), 93,6% *S. uberis* pesquisados neste trabalho podem ser classificados como susceptíveis. Nível de susceptibilidade próximo dos 97,2% relatados por esses autores. Tomando como base os critérios definidos pelo CLSI (2008) (resistentes maior ou igual a 32,0 µg/mL) todos os isolados analisados no presente trabalho são considerados sensíveis a cefalotina, resultado semelhante ao relatado por Pitkälä et al. (2004) e Pitkälä, Koort e Björkroth (2008), no entanto esses autores relataram CIM90 de 0,25 µg/mL, consideravelmente menor em relação a encontrada neste trabalho.

A distribuição das CIM dos dois fármacos do grupo das cefalosporinas, possibilita a observação de que o representante da terceira geração, o ceftiofur, teve maior eficácia *in vitro* que o representante da primeira geração, a cefalotina,

em inibir o crescimento de *S. uberis* isolados de mastite bovina. A mesma observação foi relatada por Watts, Salmon e Yancey Junior (1995).

Adotando-se o ponto de corte recomendado pelo CLSI (2008) (resistentes maior ou igual a 4 µg/mL) apenas uma amostra foi considerada resistente a penicilina, apresentando CIM maior do que 8 µg/mL. Essa mesma amostra mostrou-se também resistente a ampicilina (CIM maior do que 8 µg/mL) e foi o isolado que apresentou maior CIM também para ceftiofur (4 µg/mL). A existência de CIMs elevados para β-lactâmicos (penicilina, ampicilina e ceftiofur) é um indicativo de que o mecanismo primário de resistência a penicilinas de *S. uberis* é, aparentemente, a produção de β-lactamases (ROSSITTO et al., 2002).

Em geral os estreptococos ambientais são sensíveis as penicilinas. Salmon et al. (1998) reportaram alta susceptibilidade de *S. uberis* a penicilina, com CIM50 e CIM90 ambos de 0,06 µg/mL, entre isolados da Nova Zelândia e iguais valores, de CIM50=0,06 e CIM90=2 µg/mL, para penicilina e ampicilina entre isolados provenientes da Dinamarca. Pitkälä, Koort e Björkroth (2008) encontraram sensibilidade a penicilina em 100% das amostras analisadas de *S. uberis* e o MIC50 e MIC90 relatados por estes autores foram ambos 0,064 µg/mL, valores diferentes, porém próximos aos do presente estudo, no qual se encontrou CIM50=0,125 e CIM90=1 µg/mL tanto para penicilina quanto para ampicilina. Outros pesquisadores relataram valores mais elevados, como Rossitto et al. (2002) que reportaram MIC50 e MIC90 de penicilina ambos de 0,25 µg/mL. Guérin-Faubleé et al. (2002) relataram distribuição semelhante a deste trabalho, porém com sensibilidade ainda maior da população de *S. uberis* avaliada. No entanto o autor classificou 14% das amostras como moderadamente susceptíveis, usando como critério interpretativo um ponto de corte bem mais baixo (sensível menor do que 0,12). Esses autores relataram ainda distribuição bimodal da população entre as CIM de penicilina e outros β-lactâmicos, o que

pode ser interpretado como indicativo de existência de mecanismos de resistência na população bacteriana (TURNIDGE; KAHLMETER; KRONVALL, 2006). Diante disso especula-se que um gradual aumento no surgimento de isolados resistentes a penicilina poderia ocorrer em *Streptococcus uberis* como foi observado para *Streptococcus pneumoniae* em humanos (GUÉRIN-FAUBLÉE et al., 2002).

Ampicilina pertence ao grupo de amplo espectro de penicilinas chamadas aminopenicilinas. Esses componentes são similares as penicilinas naturais em seu espectro de atividade, mas são mais ativas contra alguns gêneros de bactérias (SALMON et al., 1998). No entanto, assim como encontrado neste estudo, a maioria dos estudos aponta valores muito próximos de CIM50 e CIM90 para ampicilina e penicilina, embora os dados disponíveis de ampicilina para *S. uberis* seja escassos (KIRK et al., 2005; ROSSITO et al., 2002).

Os valores encontrados de CIM50 e CIM90 (2,0 µg/mL) para enrofloxacina foram um pouco mais elevados em relação aos poucos relatos encontrados na literatura: CIM50=0,5 µg/mL e CIM90=1,0 µg/mL (SALMON et al., 1998; WATTS; SALMON; YANCEY JUNIOR, 1995), CIM50=0,5 µg/mL e CIM90=2 µg/mL (OWENS et al., 1997). A CIM 50 mais elevada pode ser um indicativo de maior ocorrência de resistência em função de uso mais disseminado de enrofloxacina nos rebanhos pesquisados, em relação aos trabalhos citados, que mencionam não ser aprovado ou não ser comum o uso de enrofloxacina para mastite bovina na ocasião da pesquisa (SALMON et al., 1998; WATTS; SALMON; YANCEY, 1995). Entretanto, a falta de critérios padronizados torna difícil tirar conclusões pela comparação dos relatos.

No presente estudo os valores de CIM50 e CIM90 de florfenicol foram 2 µg/mL e 4 µg/mL, respectivamente. Não foram encontrados na literatura dados sobre CIM de florfenicol para *S. uberis*, o que impossibilita a comparação dos resultados. No entanto, a distribuição dos isolados por CIM (Tabela 2), sugere

não haver resistência ao florfenicol na população estudada. Tomando como referência os critérios do CLSI (2008) para bactérias associadas a doenças respiratórias de bovinos (resistentes CIM maior ou igual a 8 µg/mL) não há isolados que possam ser considerados resistentes.

O uso indiscriminado de antibióticos na bovinocultura pode promover mudanças no perfil de susceptibilidade dos patógenos de mastite. O monitoramento regular da resistência é necessário para identificar possíveis mudanças nos padrões de resistência aos antimicrobianos (PITKÄLÄ; KOORT; BJÖRKROTH, 2008). O aumento da resistência aos antimicrobianos por patógenos de mastite pode ocorrer em consequência do uso de determinada base no tratamento de outras doenças e até mesmo em animais de outras categorias além das vacas em lactação. Bengtsson et al. (2009) em um levantamento do perfil de susceptibilidade antimicrobiana em isolados de mastite aguda na Suécia, encontraram isolados resistentes a antimicrobianos não comumente usados no tratamento de mastite naquele país.

As variações observadas nos perfis de resistência, entre os diferentes isolados e em relação aos dados da literatura, apontam a necessidade de execução de testes de susceptibilidade aos antimicrobianos para indicação adequada da terapia ou para monitoramento da resistência aos antimicrobianos.

4 CONCLUSÕES

Embora não existam parâmetros específicos para interpretação de CIM dos antimicrobianos testados para *Streptococcus uberis*, dentro dos limites do experimento, pode-se concluir que: A população de *S. uberis* estudada apresentou níveis elevados de resistência para estreptomicina. Para a maioria dos demais antimicrobianos testados, houve isolados resistentes, no entanto os níveis de resistência foram baixos na população avaliada.

REFERÊNCIAS

- 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.
- BRADLEY, A. J. Bovine mastitis: an evolving disease. **The Veterinary Journal**, Amsterdam, v. 164, n. 2, p. 116-128, Sept. 2002.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for broth dilution susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals**: approved guideline M49-A. Wayne, 2006. Disponível em: <<http://www.clsi.org/>>. Acesso em: 10 fev. 2011.
- _____. **Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals**: approved standard M31-A3. Wayne, 2008. Disponível em: <<http://www.clsi.org/>>. Acesso em: 10 fev. 2011.
- DOUGLAS, V. L. et al. Genomic typing of *Streptococcus uberis* isolates from cases of mastitis, in New Zealand dairy cows, using pulsed-field gel electrophoresis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 75, n. 1, p. 27-41, July 2000.
- GIANNECHINI, R. E.; CONCHA, C.; FRANKLIN, A. Antimicrobial susceptibility of udder pathogens isolated from dairy herds in the west littoral region of Uruguay. **Acta Veterinaria Scandinavica**, Montevideo, v. 43, n. 1, p. 31-41, 2002.
- GUÉRIN-FAUBLÉE, V. et al. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus* species isolated from clinical mastitis in dairy cows. **International Journal of Antimicrobiology Agents**, New York, v. 19, n. 3, p. 219-226, Mar. 2002.
- JAYARAO, B. M. et al. Epidemiology of *Streptococcus uberis* intramammary infections in a dairy herd. **Journal of Veterinary Medicine**, Berlin, v. 46, n. 7, p. 433-442, Sept. 1999.
- KIRK, J. H. et al. Association of minimum inhibitory concentration cluster patterns with dairy management practices for environmental bacteria isolated from bulk tank milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 88, n. 10, p. 3710-3720, Oct. 2005.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals: approved standard: document M31-A.** Wayne, 2000. Disponível em: <<http://www.ncls.org/>>. Acesso em: 10 fev. 2011.

OWENS, W. E. et al. Comparison of success of antibiotic therapy during lactation and results of antimicrobial susceptibility tests for bovine mastitis. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 80, n. 2, p. 313-317, Feb. 1997.

_____. Minimum inhibitory concentrations and disk diffusion zone diameter for selected antibiotics against *Streptococci* isolated from bovine intramammary infections. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 73, n. 5, p. 1225-1231, May 1990.

PHILPOT, W. N.; NICKERSON, S. C. **Vencendo a luta contra a mastite.** Piracicaba: Westfalia Landtechnik do Brasil, 2002. 192 p.

PHUEKTES, P. et al. Molecular epidemiology of *Streptococcus uberis* isolates from dairy cows with mastitis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, n. 4, p. 1460-1466, Apr. 2001.

PITKÄLÄ, A. M. et al. Bovine mastitis in Finland 2001: prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 87, n. 8, p. 2433-2441, Aug. 2004.

PITKÄLÄ, A. M.; KOORT, J.; BJÖRKROTH, J. Identification and antimicrobial resistance of *Streptococcus uberis* and *Streptococcus parauberis* isolated from bovine milk samples. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 91, n. 10, p. 4075-4081, Oct. 2008.

POL, M.; RUEGG, P. L. Relationship between antimicrobial drug usage and antimicrobial susceptibility of gram-positive mastitis pathogens. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, n. 1, p. 262-273, Jan. 2007.

ROESCH, M. V. et al. Comparison of antibiotic resistance of udder pathogens in dairy cows kept on organic and on conventional farms. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 89, n. 3, p. 989-997, Mar. 2006.

ROSSITTO, P. V. et al. Antibiotic susceptibility patterns for environmental *Streptococci* isolated from bovine mastitis in central California dairies. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, n. 1, p. 132-138, Jan. 2002.

SALMON, S. A. et al. Minimum inhibitory concentrations for selected antimicrobial agents against organisms isolated from the mammary glands of dairy heifers in New Zealand and Denmark. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 81, n. 2, p. 570-578, Feb. 1998.

TURNIDGE, J.; KAHLMETER, G.; KRONVALL, G. Statistical characterization of bacterial wild-type MIC value distributions and the determination of epidemiological cut-off values. **Clinical Microbiology and Infection**, Marseille, v. 12, n. 5, p. 418-425, May 2006.

WATTS, J. L.; SALMON, S. A.; YANCEY JUNIOR, R. J. Antimicrobial susceptibility from the mammary glands of microorganisms isolated dairy heifers. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 78, n. 7, p. 1637-1648, July 1995.