



GLEI DOS ANJOS DE CARVALHO CASTRO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
Streptococcus agalactiae ISOLADOS DE MASTITE
EM BOVINOS NO BRASIL**

LAVRAS – MG

2013

GLEI DOS ANJOS DE CARVALHO CASTRO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Streptococcus agalactiae*
ISOLADOS DE MASTITE EM BOVINOS NO BRASIL**

Tese 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 Doutor.

Orientador

Dr. Geraldo Márcio da Costa

LAVRAS - MG

2013

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Carvalho - Castro, Gleí dos Anjos de.

Caracterização molecular de *Streptococcus agalactiae* isolados
de mastite em bovinos no Brasil / Gleí dos Anjos de Carvalho
Castro. – Lavras : UFLA, 2013.

61 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Geraldo Márcio da Costa.

Bibliografia.

1. PCR específica. 2. MLST. 3. Tipagem molecular da cápsula.
4. Multiplex PCR. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 636.089692075

GLEI DOS ANJOS DE CARVALHO CASTRO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Streptococcus agalactiae*
ISOLADOS DE MASTITE EM BOVINOS NO BRASIL**

Tese 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 Doutor.

APROVADA em 31 de julho de 2013.

Dra. Patrícia Gomes Cardoso	UFLA
Dra. Gláucia Frasnelli Mian	UFLA
Dra. Stela Márcia Pereira	UFLA
Dr. Alessandro de Sá Guimarães	EMBRAPA

Dr. Geraldo Márcio da Costa
Orientador

**LAVRAS - MG
2013**

Aos grandes amores de minha vida, Cleber e Gabriel,

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

“Ninguém escapa ao sonho de voar, de ultrapassar os limites do espaço onde nasceu, de ver novos lugares e nova gente. Mas saber ver em cada coisa, em cada pessoa, aquele algo que a define como especial, um objeto singular, um amigo, é fundamental. Navegar é preciso, reconhecer o valor das coisas e das pessoas é mais preciso ainda.” Antoine de Saint-Exupéry

A tese é um trabalho de cunho científico, entretanto para que o trabalho científico seja executado de forma eficiente a vida do pesquisador deve estar em equilíbrio espiritual, emocional e profissional. Portanto, agradeço:

Em primeiro lugar a Deus e a Nossa Senhora; a Ele por ter me concedido a vida e as oportunidades para chegar até aqui; E a Ela por não ter me deixado desistir frente aos obstáculos, mantendo firme minha fé e perseverança.

A Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) à bolsa de estudos concedida.

Ao prof. Geraldo Márcio da Costa, pela confiança em mim depositada e pela dedicada orientação. Por ter aceitado me orientar, mesmo sabendo do risco de ter que elaborar e executar um projeto de tese em nove meses. Sempre levarei comigo os ensinamentos que me passou durante esse período, assim como seu exemplo de profissionalismo e respeito ao próximo.

À profa. Glaucia Frasnelli Mian, pela amizade e pela co-orientação, a agradeço por tudo que fez por mim durante o período de convivência que tivemos.

À profa. Patrícia Gomes Cardoso, pela amizade, e pela sua colaboração como membro da banca avaliadora de tese.

À professora Stela Márcia Pereira e ao pesquisador Alessandro Sá de Guimarães pela colaboração como membros da banca avaliadora de tese.

Ao prof. Henrique César Pereira Figueiredo, por ter-me “ensinado pescar” e ter me passado muito sobre o senso crítico científico durante o período que estive sob sua orientação; pelas oportunidades que me proporcionou durante o tempo que fiz parte da equipe do AQUAVET, meus sinceros agradecimentos.

Aos professores Amauri e Alice Alfieri, por terem sido meus pais científicos durante a graduação e por terem me estimulado seguir a carreira acadêmica.

Ao prof. Rômulo Cerqueira Leite por ter sido muito mais que um co-orientador durante o período que estive na UFMG. Ter sido como um pai que estava sempre disposto a ajudar-nos a resolver os problemas rapidamente. “Um exemplo vale mais que mil palavras”, seguirei sempre seu exemplo de dedicação e humanismo.

Aos técnicos e funcionários da Medicina Veterinária Preventiva da UFMG, em especial a Mirli, Graziela e Cláudio por sempre estarem dispostos a ajudar.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV) da Universidade Federal de Lavras pelos conhecimentos passados durante o período que fiz disciplinas. Ao Secretário do PPGCV/UFLA José Reinaldo Berin por ser sempre tão atencioso.

Ao Coordenador do PPGCV/UFLA, prof. Márcio Zangeronimo, por ter sido sempre solícito, atencioso, e estar sempre disposto a auxiliar na solução dos problemas que enfrentei como aluna do programa.

Aos prof. Antônio Chalfun Júnior e Luciano Paiva por terem aberto as portas de seus Laboratórios para que eu pudesse executar parte desse projeto. Ao técnico do LCBM, Fabrício Lelis, por ter sido tão solícito sempre que precisei. A equipe do laboratório de Bacteriologia da Universidade Federal de Lavras, Michele, Sílvia, Núbia, Lucas, Éric, Matheus, Dircéia e Ingrid pela convivência e momentos de descontração. Quero agradecer de modo especial às amigas

Dircéia e Ingrid, pela amizade, companheirismo e pela colaboração no trabalho, que foi de extrema importância para que ele fosse concluído a tempo.

A equipe do AQUAVET, Glaucia, Carina, Daniela, Matheus, Glauber e Maira pela convivência, momentos de descontração e troca de conhecimentos. Ao Carlos pelos conhecimentos passados na área prática de Sanidade na Piscicultura; ao Frederico, que foi um amigo verdadeiro nos momentos que precisei; e ao Lamartine (*in memorian*), que embora não esteja mais entre nós, em nossa última conversa frisou bastante sobre a importância de dar valor ao que realmente nos importa nessa vida.

Aos amigos do Laboratório de Virologia Animal da Universidade Estadual de Londrina, onde iniciei minha carreira acadêmica. Muitas pessoas especiais passaram pela minha vida durante esse período, contribuíram muito para minha formação e são lembrados sempre com muita saudade e carinho: Alexandre (o Creuso), Marlise, Betinha, Eleine, Ju Dias, Bruna, Kerley, Dalíria (*in memorian*), Maria e Flora. E como o mundo dá muitas voltas, Flora foi um anjinho sem asas que Deus colocou em meu caminho durante os dois anos que passei em Belo Horizonte. Floks, minha eterna gratidão por ter sido tão companheira e por todas as orientações valiosas que me passou.

Ao aluno de graduação Rafael Moreira por sua valiosa colaboração nos sequenciamentos dos genes estudados.

Aos meus familiares: meu pai Salomar, minha mãe Benedita, meus exemplos de dedicação, dignidade e perseverança; meus irmãos e minhas irmãs Salomar, Cirlei, Valter, Natalino, Angelena, Patrícia e Aparecida. As minhas cunhadas pelos divertidos encontros de família. Em especial a Fernanda pela atenção e conselhos sempre sensatos nos momentos mais conturbados da execução dessa tese.

Aos meus cunhados Maria Célia e Juca, pela estada acolhedora em sua casa na mudança para Belo Horizonte.

As minhas queridas amigas que mesmo distante sempre estiveram presentes: Carina, Raquel, Cynthia, Maria Carolina, Aleyra, Betinha e Flora. E as minhas amigas que estão próximas: Patrícia, que em nossos passeios com as crianças foi uma ótima ouvinte e conselheira; Luciana, Taty e Flávia.

A minha família, Meus grandes amores: Cleber, Gabriel e nossas gatinhas Mel e Branquinha, por terem sido sempre tão compreensivos nos momentos de ausência. Por todos os sacrifícios e renúncias que tiveram que fazer para que esse trabalho chegasse ao fim. Por sempre me estimularem e incentivarem nos momentos de desânimo, que não foram poucos. Com certeza o amor, a cumplicidade e compreensão de vocês foram essenciais para essa conquista, que não é só minha, mas sim nossa.

RESUMO

O *S. agalactiae* é um dos principais causadores de mastite em bovinos e de consequentes perdas econômicas aos produtores. O presente estudo teve por objetivo caracterizar isolados de mastite bovina pela tipagem capsular e tipo de sequência utilizando as técnicas de PCR, multiplex PCR e MLST. Sessenta e sete isolados de mastite bovina de 44 fazendas de gado leiteiro localizadas em seis, dos principais produtores, estados brasileiros (MG, SP, SC, PR, PE e AL) foram selecionadas. Cinco tipos capsulares foram encontrados (Ia, Ib, II, III e IV) e alguns isolados foram classificados como não sorotipificáveis (NST). Nove *sequence types* foram encontrados (ST-61, ST-67, ST-103, ST-146, ST-226, ST-314, ST-354 e ST-570) e agrupados dentro de seis complexos clonais (CC61, CC67, CC103, CC17, CC314, CC64). Com os resultados obtidos pode-se concluir que os *S. agalactiae* isolados de bovino de rebanhos brasileiros constituem uma população diversa. Adicionalmente, cinco populações distintas podem causar mastite, entretanto os resultados são sugestivos que somente CC61 e CC67 são capazes de evoluir para a doença clínica. Foi possível o estabelecimento da epidemiologia molecular dos isolados de *S. agalactiae* de bovinos no Brasil, o que é essencial para implementação de programas de controle e prevenção para erradicação dos patógenos.

Palavras-chave: *S. agalactiae*. Multi locus Sequence Typing. Multiplex PCR tipagem molecular de capsula.

ABSTRACT

S. agalactiae is a major cause of mastitis in dairy herds, and consequently economic losses to farmers. The aim of the present study was molecular characterization of isolates from bovine mastitis by capsular typing and sequence type by PCR, multiplex PCR and MLST. Sixty-eight isolates from bovine mastitis in 37 dairy farms located in six Brazilian states (MG, SP, SC, PR, PE and AL) were selected. Five capsular type were found (Ia, Ib, II, III and IV) and some isolates were classified as nontypable (NT). Nine sequence types were found (ST-61, ST-67, ST-103, ST-146, ST-226, ST-314, ST-354 and ST-570) and clustered in five clonal complexes (CC61, CC67, CC103, CC17, CC314). This work showed a relationship of the capsular type and geographical region. With the results obtained it can be concluded that *S. agalactiae* isolated from bovine herds Brazilian consists of a diverse population. Additionally, five distinct populations can cause mastitis, however is suggestive that only two (CC61 and CC67) are able to evolve for clinical disease. Finally, our results enabled the establishment of the molecular epidemiology to *S. agalactiae* isolated from cows of Brazilian herds which is essential to implementation of prevention and control programs for eradication of the pathogen.

Keywords: multiplex PCR; Multi Locus Sequence Typing; tipagem capsular molecular

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	12
1	INTRODUÇÃO	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	Produção leiteira nacional e mastite bovina	15
2.2	<i>Streptococcus agalactiae</i>	18
2.2.1	Diagnóstico de <i>Streptococcus agalactiae</i>	20
2.2.1.1	Reação da polimerase em cadeia (PCR)	22
2.2.1.2	Eletroforese em campo pulsado (PFGE) e digestão enzimática por enzimas de restrição (RFLP)	22
2.2.1.3	Multi locus sequence typing (MLST)	23
2.2.1.4	Tipagem capsular	24
2.2.2	Diversidade genética de <i>Streptococcus agalactiae</i>	25
3	CONCLUSÃO	27
	REFERÊNCIAS	28
	SEGUNDA PARTE – ARTIGO	37
	ARTIGO 1	37
	Molecular characterization of <i>Streptococcus agalactiae</i> isolated from Bovine Mastitis in Brazil	37

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

De acordo com dados da Organização das nações unidas para a alimentação e agricultura (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, FAO, 2013), a produção global de leite bovino atingiu 606.660.339 toneladas no ano de 2010. O Brasil está entre os dez maiores produtores mundiais ocupando a 4ª posição, com um montante de 32.091.000 toneladas.

Existem vários fatores que afetam a produção leiteira mundial, sendo que um dos principais é a mastite por ocasionar queda na quantidade e qualidade do leite produzido (KEEFE et al., 2012). Adicionalmente às perdas econômicas aos produtores, a mastite bovina está associada com questões de bem estar animal e de saúde pública. Isso devido à presença de agentes dotados de potencial zoonótico, resíduos de antibióticos no leite (geralmente associado ao uso indiscriminado) mais a emergência de bactérias resistentes (VLIEGHER et al., 2012) que podem ser propagadas na comunidade. Entre os principais patógenos causadores de mastite bovina, estão as bactérias *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis* e *Staphylococcus aureus* (RATO et al., 2013; KEEFE, 2012; JAIN et al., 2012; ZADOCKS et al., 2011).

Streptococcus agalactiae, também denominado *Streptococcus* do Grupo B (GBS), é uma das principais espécies do gênero caracterizada como causadora de doença em animais e seres humanos. Em medicina veterinária esse microrganismo tem se destacado como causador de mastite clínica e subclínica em bovinos (RATO et al., 2013; KEEFE, 2012). Trata-se de um patógeno emergente na aquicultura, sendo responsável por altas taxas de morbidade e mortalidade em casos de septicemia e meningoencefalite em peixes de água

doce, marinhos e estuarinos (EVANS et al., 2002). Em seres humanos, essa bactéria coloniza os tratos gastrointestinais e geniturinários, estando presente em mais de 50% da população de adultos saudáveis. Ademais, pode causar pneumonia, septicemia e meningite em neonatos, sendo responsável por alta taxa de morbidade em gestantes e mortalidade em adultos imunocomprometidos (JOHRI et al., 2006; MAIONE, et al., 2005).

Devido à importância de *S. agalactiae* na saúde pública e animal, têm sido desenvolvidas diversas ferramentas epidemiológicas para tipagem molecular dessa bactéria, tais como tipagem capsular, eletroforese enzimática multilocus (MLEE), ribotipagem, padrão de restrição por digestão, tipo de sequência por multilocus entre outras (NAKIB et al., 2011).

A tipagem capsular é um método clássico utilizado em estudos epidemiológicos de *S. agalactiae*, pois a cápsula é um dos principais fatores de virulência da bactéria na evasão do sistema imune do hospedeiro. São conhecidos atualmente 10 tipos capsulares diferentes, Ia e Ib a IX, e a distribuição desses em *S. agalactiae* isolados de seres humanos está diretamente relacionado a etnias e regiões geográficas. A identificação desses tipos capsulares pode ser realizada pela genotipagem ou pela sorotipagem (KONG et al., 2008).

Uma das metodologias mais recentes, utilizadas para estudos epidemiológicos, é a tipagem por sequenciamento de multilocus (MLST). Esta técnica é baseada no sequenciamento de genes constitutivos e tem sido utilizada para investigar populações de patógenos bacterianos isolados de seres humanos e animais como *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *S. agalactiae* e *Staphylococcus aureus* (MAIDEN et al., 2006; PÉREZ-LOSADA et al., 2006; SMITH et al., 2005; JONES et al., 2003; ENRIGHT et al., 2002).

Apesar do MLST e a tipagem molecular de cápsula serem técnicas de grande importância para monitoramento epidemiológico, estas ainda não foram

empregadas para estudos com GBS isolados de mastite de rebanhos bovinos brasileiros. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar genotipicamente, pelas técnicas de multiplex PCR e MLST, *S. agalactiae* isolados de mastite em bovinos de diferentes propriedades e regiões brasileiras.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Produção leiteira nacional e mastite bovina

Nas últimas décadas, a indústria leiteira brasileira foi influenciada positivamente por mudanças macroeconômicas que ocorreram no país (SPERS; WRIGHT; AMEDOMAR, 2013). A produção de leite bovino no Brasil teve um aumento de aproximadamente 5% no período de 2009 a 2011, passando de 30.007.800 para 32.091.000 toneladas (FAO, 2013). Isso foi observado em quase todas as regiões brasileiras, exceto na Norte que manteve uma constância no montante produzido (ZOCCAL; ALVES; GASQUES, 2011). A região Sudeste é a maior produtora no país (10,9 bilhões de litros), seguida pelas regiões Sul (9,6 bilhões de litros), Centro Oeste (4,4 bilhões de litros) e Nordeste (4 bilhões de litros) (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, IBGE, 2010).

A produção nacional leiteira se caracteriza pela presença em todo o território e pela heterogeneidade em relação ao tamanho das propriedades, raças de bovino e tipos e sistema de produção. Algumas propriedades se caracterizam por ausência de tecnificação e outras são possuidoras das tecnologias mais avançadas existentes no mercado mundial (ZOCCAL; ALVES; GASQUES, 2011). As propriedades tecnificadas estão concentradas principalmente nos estados de Minas Gerais, Paraná e São Paulo e, de acordo com produtores, o investimento em tecnologia visa o incremento da produção e da qualidade do leite (SPERS; WRIGHT; AMEDOMAR, 2013).

Apesar do crescimento apresentado no setor da produção leiteira, há ainda diversos entraves enfrentados pelos produtores, dentre eles a mastite bovina. Ela é considerada um dos principais fatores de risco para o sistema de produção leiteiro, sendo responsável por perdas econômicas expressivas em

países desenvolvidos apesar das diversas pesquisas e medidas preventivas estabelecidas (KEEFE et al., 2012; LE MARÉCHAL et al., 2011; NOTEBAERT & MEYER, 2006). As perdas econômicas estão relacionadas diretamente a queda temporária ou permanente na produção e qualidade do leite adicionado ao descarte deste pelo uso do antibiótico; e indiretamente associadas a redução no preço devido a alta contagem de células somáticas (CSS), redução na vida produtiva do animal, custos com tratamento e mão de obra (HILLERTON; BERRY, 2005; VIGUIER et al., 2009).

A doença é uma reação inflamatória da glândula mamária, cuja nomenclatura originou-se do grego *masto*- glândula mamária e *itis* – inflamação (PIETERSE; TODOROV, 2010). O termo, também, é frequentemente utilizado para descrever uma injúria no úbere, que conseqüentemente acarretará a inflamação (NOTEBAERT & MEYER, 2006).

Segundo Viguier et al. (2009), em condições normais, o canal do teto é hermeticamente fechado pelos músculos do esfíncter e coberto por uma camada de queratina, produzida pelo epitélio escamoso estratificado; que previne a entrada e a migração das bactérias, respectivamente. Entretanto, a eficiência da queratina é restrita. No período periparto, verifica-se um aumento da pressão intramamária devido ao acúmulo de líquido dentro das glândulas mamárias. Estas se tornarão vulneráveis devido à dilatação do canal do teto e o vazamento de secreções mamária. Adicionalmente, a camada de queratina é removida durante a lactação e ocorrerá a distensão do canal do teto. Para que o esfíncter se contraia novamente são necessárias aproximadamente duas horas.

A mastite é resultado principalmente da invasão microbiana da glândula mamária. Após a entrada no teto (considerando-se uma infecção bacteriana) a bactéria estimula o sistema imune inato e adaptativo do bovino. Caso o hospedeiro não consiga eliminar os patógenos invasores, estes se multiplicarão na glândula mamária, podendo haver a liberação de toxinas. Dessa maneira,

ocorrerá novamente o estímulo às células imunes efectoras. Estas células serão atraídas ao sitio de infecção, engolfarão e destruirão a bactéria e algumas células epiteliais da glândula, o que causará uma queda na produção do leite associada à liberação de algumas enzimas. A maioria das células efectoras sofrerão apoptose e serão secretadas no leite juntamente com as células epiteliais mamárias resultando em alta contagem de células somáticas (RAINARD; RIOLLET, 2006; VIGUIER et al., 2009).

A mastite é classificada de acordo com a severidade como subclínica, clínica e crônica. A evolução do quadro clínico dependerá da natureza do agente etiológico e fatores associados ao hospedeiro como idade, raça, estado imunológico e fase de lactação. As bactérias são os principais patógenos causadores de mastite, mas alguns vírus, algas e fungos também podem ocasionar a inflamação (COSTA et al., 2012; PYORALA, 2003; NOTEBAERT & MEYER, 2006). No caso das bactérias, o estabelecimento e a severidade da doença podem ser influenciados pela expressão dos genes de virulência (AITKEN; CORL; SORDILLO, 2011). A mastite clínica apresenta como principais sinais clínicos alterações macroscópicas no leite e no úbere como a dor a palpação, rubor, aumento da temperatura local e vermelhidão, sendo geralmente de fácil diagnóstico (MENDONÇA et al., 2010).

Ao contrário da mastite clínica, a subclínica é de difícil detecção e por ser a forma mais frequente e acarretar perdas de produção, conseqüentemente implica em prejuízos econômicos mais altos. A forma crônica é mais comum em rebanhos onde há programas para controle da mastite contagiosa associada aos principais patógenos, tais como *S. agalactiae* e *Staphylococcus aureus*, resultando em inflamação persistente da glândula mamária (VIGUIER et al., 2009). Esta forma de apresentação é muito comum em rebanhos do Brasil, principalmente em Minas Gerais, que é um dos principais estados produtores

nacionais, no qual se observa uma alta frequência de casos de animais com mastite crônica (COSTA, 2013).¹

Como supracitado, a mastite pode ser causada por fatores físicos ou por microrganismos, os quais são classificados como patógenos contagiosos ou ambientais. Os principais patógenos contagiosos causadores de mastite em bovinos são *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*. Os patógenos ambientais são aqueles presentes em fezes, solo e estalagem dos bovinos, os mais comuns são *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Escherichia coli* e *Enterococcus* spp. (TALBOT; LACASSE, 2005). As bactérias *S. aureus*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* e *S. uberis* normalmente causam maiores danos ao úbere que outros patógenos causadores de mastite (REYER et al., 2012) e por isto são denominados patógenos principais ou maiores.

No Brasil, *S. agalactiae* tem sido considerado um dos principais agente etiológico da mastite bovina com uma prevalência de 60% nos rebanhos (KEEFE, 2012). As taxas de isolamento variam entre 4,6% e 28,05% (BRANT; FIGUEIREDO, 1994; BARBALHO; MOTA, 2001; MOTA et al., 2004) apud Costa (2008). Desde 1999, um dos principais estados produtor de leite do país, Minas Gerais, é atingido pela disseminação deste agente com frequência em 60% das propriedades das regiões da Zona da Mata e Campos das Vertentes (BRITO et al., 1999).

2.2 *Streptococcus agalactiae*

¹ Costa, G.M. Coordenador do Laboratório de Bacteriologia Veterinária, Lavras, Universidade Federal de Lavras.

Streptococcus agalactiae é uma bactéria Gram positiva, catalase e oxidase negativa que apresenta morfologia de cocos agrupados em cadeias. É classificada como não móvel, não formadora de esporo, anaeróbia facultativa e homofermentativa. Esta bactéria produz hemolisinas classificadas como beta ou gama hemolítica, que causam lise completa ou ausente nos eritrócitos, respectivamente (HOLT et al., 1994). Desde a década de 1930, *S. agalactiae*, também denominada *Streptococcus* do Grupo B (GBS), é uma das principais espécies do gênero caracterizada por colonizar múltiplos hospedeiros e se adaptar em diferentes sítios do corpo, incluindo aqueles que são tipicamente estéreis. A capacidade de multiplicação e colonização de diferentes ambientes depende da expressão de genes relacionados à virulência (RAJAGOPAL et al., 2009).

Dentre as enfermidades causadas por esse patógeno estão a pneumonia, a septicemia e a meningite em neonatos com altas taxas de mortalidade. A bactéria é também considerada uma das principais causas de sepsis em gestantes e nos últimos anos tem sido associada a doenças em idosos (NAKIB et al., 2011; MAIONE et al., 2005; JOHRI et al., 2006). Na medicina veterinária, é responsável por altas taxas de morbidade e mortalidade, em casos de septicemia e meningoencefalite, em peixes de diferentes espécies e ambientes (BOWATER et al., 2012; MIAN et al., 2009; OLIVARES FUSTER et al., 2008; EVANS et al., 2002). Adicionalmente, esse microrganismo tem se destacado como um importante causador de mastite em bovinos (KEEFE, 2012). Trata-se de uma bactéria altamente contagiosa e adaptada a glândula mamária de bovino. Geralmente, ela não sobrevive por longos períodos fora da glândula e a principal via de contaminação se dá por contato direto ou fômites contaminados (KEEFE, 2012).

S. agalactiae foi considerado o principal patógeno para glândula mamária no período em que havia pouca preocupação com higiene (antes,

durante e pós ordenha) e anterior ao advento dos antimicrobianos (PEREZ NETO; ZAPA, 2011). Em países onde a indústria leiteira é emergente ele ainda é um dos principais problemas para os produtores de gado de leite. Na América do Sul, a prevalência é de 60% no Brasil, 42% na Colômbia e de 11% no Uruguai (KEEFE, 2012). A presença deste agente em países onde os programas de controle estratégico contra a mastite foram bem estabelecidos é indicativa de falhas no manejo e em programas de biossegurança (HILLERTON; BERRY, 2005). Nos últimos anos, entretanto, essa bactéria está sendo considerada um patógeno reemergente nos rebanhos leiteiros da Europa (ALMEIDA et al., 2013; RADTKE et al., 2012; MWEU et al., 2012).

Em bovinos, *S. agalactiae* causa uma infecção geralmente não auto limitante, tipicamente subclínica, com reflexos na CCS no leite que pode superar 1.000.000/mL (KEEFE, 2012). Dependendo do tempo de detecção da doença, essa pode se tornar crônica e evoluir para clínica. Quando isso ocorre, os principais sinais clínicos observados são divididos em grau de severidade: Grau 1: apenas alterações nas características do leite. Este se torna mais amarelado, com presença de pus, sangue e grumos; Grau 2: Além das alterações no leite, o úbere já apresenta sinais de doença como inchaço, dor ao toque e vermelhidão; Grau 3: o animal apresentará alterações sistêmicas como febre, inapetência, desidratação e redução drástica na produção de leite (MENDONÇA, 2010; FONSECA; SANTOS, 2000).

2.2.1 Diagnóstico de *Streptococcus agalactiae*

O diagnóstico de infecção intramamária por *S. agalactiae* é feito pelo cultivo do leite coletado em placas de ágar suplementado com 5% de sangue ovino. Após isolamento do agente etiológico, é realizada a identificação fenotípica pelos testes bioquímicos e sorotipagem. Posteriormente ao

isolamento, é realizado o teste de antibiograma para seleção do antimicrobiano mais adequado ao tratamento dos animais infectados. A grande vantagem do método de identificação fenotípico é o isolamento do patógeno e a realização de antibiograma para seleção da terapêutica. Entretanto, estes são muito demorados, laboriosos e muitas vezes subjetivos (GILLESPIE; OLEVIER, 2005).

Para a identificação fenotípica, são realizados os testes de triagem bacteriana para cocos Gram positivos segundo o Manual Bergeys: Gram, catalase e oxidase. Para a identificação de *S. agalactiae*, são realizados também os testes de CAMP, bile-esculina e o teste de aglutinação em látex para identificação dos grupos antigênicos A, B, C, D, F e G de Lancifield. A identificação final pode ser realizada por meio de testes de caracterização bioquímica empregando kits comerciais.

Outro teste fenotípico amplamente realizado para a caracterização de *S. agalactiae* é a sorotipagem capsular, que se baseia na expressão dos polissacarídeos da capsula bacteriana que reagem com anticorpos específicos para os sorotipos. Entretanto, os kits comerciais possuem espectro para apenas nove sorotipos capsulares, sabe-se que até o presente momento já foram descritos dez sorotipos diferentes (SLOVEDT et al., 2007). Portanto, a presença de cepas não sorotipificáveis deixa o resultado inconclusivo.

Em função das limitações dos métodos convencionais de diagnóstico bacteriológico, diversas técnicas moleculares têm sido utilizadas para identificação de microrganismos, dentre elas PCR e suas variações. Os testes baseados em análise de DNA são menos propensos a erros que os métodos tradicionais de identificação bacteriana (ALMEIDA et al., 2013; BRAGA et al., 2013). Além disso, são mais rápidos e menos laboriosos.

Por *S. agalactiae* se tratar de uma bactéria que apresenta características diversas variando de acordo com a região geográfica e hospedeiro, ferramentas moleculares epidemiológicas têm sido desenvolvidas com o objetivo de estudar

a associação entre genótipo e doença e avaliação da variação genética dentro dos genogrupos (NAKIB et al., 2011). Os estudos epidemiológicos têm sido de grande importância para o entendimento de origem, vias de transmissão e prognóstico para muitos patógenos causadores de mastite bovina (ZADOKS et al., 2011). Para evitar resultados controversos e minimizar problemas de reprodutibilidade de testes descritos em regiões geográficas diferentes, as técnicas de tipagem baseadas no genótipo bacteriano ou sequência de DNA tem sido utilizadas para identificação de *S. agalactiae* (ALMEIDA et al., 2013; GEY et al., 2013; KONG et al.; 2008; MATA et al.; 2004; JONES et al.; 2003). Dentre as técnicas mais utilizadas estão a reação da polimerase em cadeia (PCR), Digestão enzimática por enzimas de restrição (RFLP), Eletroforese em campo pulsado (PFGE), tipagem capsular molecular e Multi locus sequence typing (MLST).

2.2.1.1 Reação da polimerase em cadeia (PCR)

Diversas reações de PCR já foram desenvolvidas para estudo de *S. agalactiae*, baseadas em sequências genéticas conservadas da bactéria para diagnóstico (AHMADI; RAZAVI; AYREMLOU, 2009; MATA et al., 2004; MARTINEZ et al., 2001); baseadas em genes de virulência e em genes de resistência antimicrobiana (KONG et al., 2008; SANTI et al., 2007). As vantagens dessa técnica são a reprodutibilidade, o custo e facilidade para adquirir reagentes e a rapidez de execução (CARVALHO-CASTRO et al., 2010).

2.2.1.2 Eletroforese em campo pulsado (PFGE) e digestão enzimática por enzimas de restrição (RFLP)

As duas técnicas já foram utilizadas para estudo de epidemiologia molecular de *S. agalactiae* (SHOME et al., 2013; CORRÊA et al., 2011; CORRÊA et al., 2009; SELLIN et al., 2002). A RFLP consiste na digestão de sítios específicos do DNA utilizando uma ou mais endonucleases. O padrão de restrição resultante é obtido pela separação dos fragmentos em eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

O PFGE é uma técnica baseada na clivagem do DNA cromossomal por endonucleases gerando macrofragmentos que após revelação são comparados. Os plugs contendo os fragmentos de DNA digeridos são inseridos dentro de poços no gel de agarose e a revelação ocorre após a eletroforese em campo pulsado (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

2.2.1.3 Multi locus sequence typing (MLST)

Outra técnica muito utilizada contemporaneamente para estudos moleculares epidemiológicos de bactérias é o MLST (YANG et al., 2013; SORENSEN; POULSEN; GHEZZO, 2010; JONES et al., 2003). Trata-se de um inequívoco método de tipagem molecular acurado e altamente específico, baseado no sequenciamento de sete genes constitutivos, no caso de GBS, com fragmentos de aproximadamente 500pb (TIEN et al., 2011; JONES et al., 2003). Ainda possui a vantagem de poder ser utilizado como ferramenta de diagnóstico pela amplificação de um dos sete genes, com rapidez e acurácia quando comparado aos métodos clássicos (MUNARI et al., 2012; MAIDEN, 2006).

Os sete genes selecionados para o sistema de MLST de *S. agalactiae* são codificadores de enzimas relacionadas ao metabolismo bacteriano. São eles: álcool desidrogenase (*adhP*), fenilalanil tRNA sintetase (*pheS*), aminoácido transportador (*atr*), glutamina sintetase (*glnA*), serina desidratase (*sdhA*), glicose kinase (*glcK*) e transketolase(*tkt*) (JONES et al., 2003). A técnica consiste na

associação dos perfis de alelos encontrados para os sete genes gerando um perfil e uma sequência tipo (ST).

O fato de existir um banco de dados de MLST e as análises serem realizadas dentro do site - <http://pubmlst.org/general.shtml> - permite uma comparação entre isolados bacterianos sem a necessidade de solicitar troca de material biológico. Isso possibilita o estudo de evolução e população de um grande número de bactérias baseado no algoritmo eBURST (Based Upon Related Sequence). O eBURST divide os dados do MLST em isolados relacionados dentro de um mesmo grupo, os Complexos Clonais (CCs), ou de singletons (ST que não se agrupam em CCs) implementando um modelo simples de expansão clonal e diversidade genética (MAIDEN et al., 2006; FEIL et al., 2004).

2.2.1.4 Tipagem capsular

O estudo do tipo capsular polissacarídico de *S. agalactiae* é uma das principais abordagens epidemiológicas para caracterização da espécie. GBS possui uma capsula polissacarídica rica em ácido siálico (CPS), a qual é classificada em dez sorotipos capsulares: Ia, Ib ou II-IX (RAJAGOPAL, 2009; Poyart et al., 2007). CPS é um importante fator de evasão do sistema imune dos hospedeiros, pois o ácido siálico também está presente nas células dos vertebrados, e estes falham em reconhecer GBS como não próprio (CIESLEWICZ et al., 2009).

A evolução de diferentes CPS pelo patógeno provavelmente ocorre pela pressão de seleção imposta pelo hospedeiro (CIESLEWICZ et al., 2005). Os tipos capsulares podem variar de acordo com a região geográfica. Estudos demonstraram que para isolados de fazendas leiteiras na Alemanha, há um predomínio de sorotipo Ia, seguido dos padrões III e Ib; Enquanto que para os

isolados nos Estados Unidos há maior frequência para o padrão III (DOGAN et al., 2005; MERL et al., 2003). Em estudos de sorotipagem capsular realizados com isolados de bovino no Brasil, foram prevalentes os tipos capsulares III e V (PINTO et al., 2013; DUARTE et al., 2004). Para isolados de seres humanos, os sorotipos Ia, II, III e IV são os mais frequentes nos Estados Unidos, Europa e Austrália; enquanto que no Japão há predomínio dos sorotipos VI e VIII (KONG et al., 2008). Evans et al. (2008) mostrou em seu estudo um predomínio do sorotipo Ia para peixes de diversas regiões do mundo.

2.2.2 Diversidade genética de *Streptococcus agalactiae*

A primeira publicação de sequenciamento genômico completo de amostra de *S. agalactiae* ocorreu em 2002 (GLASER et al., 2002). No mesmo ano, Tettelini e colaboradores mostraram a similaridade de isolados de *S. agalactiae* com outros *Streptococcus* spp. isolados de seres humanos. Entretanto, foi observado que essa espécie era distinta de outras do gênero, principalmente nas regiões gênicas codificadores de proteínas relacionados a elementos móveis (GLASER et al., 2002). Devido o grande número de genes associados aos elementos genéticos móveis, incluindo bacteriófagos, transposons e elementos de inserção, estima-se que esses tenham sido adquiridos por transmissão horizontal de outras espécies bacterianas. Acredita-se que esses genes estão associados, principalmente, a adaptação e capacidade de colonizar e causar doença, do *S. agalactiae* aos diferentes nichos e hospedeiros (ZUBAIR et al., 2013; TETTELINI et al., 2005).

Até o presente momento, já foram sequenciados genomas de *S. agalactiae* isoladas de peixe, camelo, bovino, seres humanos e estes mostram genes não descritos anteriormente (ZUBAIR et al., 2013; RICHARDS et al., 2011; GLASER et al., 2002). Estes estudos recentes reforçam o conceito do pan-

genoma, para o GBS, que é formado por um genoma central representado por aproximadamente 80% do total, e é relativo aos genes constitutivos e de funções reguladoras. Associado ao genoma central está um genoma dispensável que está relacionado aos elementos móveis e extras cromossomais, suportando a hipótese que a aquisição das características espécies específica depende de uma transferência lateral de genes (TETTELINI et al., 2005).

3 CONCLUSÃO

Pode se concluir com a revisão de literatura realizada, que estudos sobre *Streptococcus agalactiae* são de extrema importância para a saúde pública e sanidade animal. Devido à diversidade populacional e capacidade desse patógeno se adaptar a diferentes hospedeiros e ambientes, é necessária a caracterização molecular para implementação de planos de controle e prevenção eficientes.

REFERÊNCIAS

- AHMADI, M.; RAZAVI, R. S. M.; AYREMLOU, N. Evaluation of *Streptococcus agalactiae* detection by PCR in milk and its comparison to other microbiological methods. **Iranian Journal of Microbiology**, Tehran, v. 1, n. 4, p. 28-31, Dec. 2009.
- AITKEN, S. L.; CORL, C. M.; SORDILLO, L. M. Immunopathology of mastitis: insights into disease recognition and resolution. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, London, v. 16, p. 291–304, 2011.
- ALMEIDA, A. et al. Detection and discrimination of common bovine mastitis causing streptococci. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 164, p. 370–377, 2013.
- BOWATER, R. O. et al. Natural outbreak of *Streptococcus agalactiae* (GBS) infection in wild giant Queensland grouper, *Epinephelus lanceolatus* (Bloch), and other wild fish in northern Queensland, Australia. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 35, p. 173–186, 2012.
- BRAGA, P. A. C. et al. Bacterial identification: from the agar plate to the mass spectrometer. **RSC Advance: an international journal to further the chemical sciences**, Cambridge, v. 3, p. 994–1008, 2013.
- BRITO, M. et al. Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários de vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 51, p. 129-135, 1999.
- CARVALHO-CASTRO, G.A. et al. Detection of the type III Secretion System and their relationship with virulence in Nile tilapia. **Vet Microbiol.**, Amsterdam, v. 144, p. 371-376, 2010.

CIESLEWICZ, M. J. et al. Structural and genetic diversity of group B *Streptococcus* Capsular Polysaccharides. **Infection and Immunity**, Washington, v.73, n. 5, p. 3096-3103, 2005.

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

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

COSTA, G.M. et al. Population diversity of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Brazilian dairy herds. **Res. Vet. Science**, London, v.93, p.733-735,2012.

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

DOGAN, B. et al. Distribution of serotypes and antimicrobial resistance genes among *Streptococcus agalactiae* isolates from bovine and human hosts. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, n. 2, p. 5899–5906, 2005.

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

ENRIGHT, M.C. et al. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **PNAS**, Washington, v. 99, n. 11, p. 7687–7692, 2002.

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

EVANS, J. J. et al. Phylogenetic relationship among *Streptococcus agalactiae* from piscine, dolphin, bovine and human sources: a dolphin and piscine lineage associated with a fish epidemic in Kuwait is also associated with human neonatal infection in Japan. **Journal of Medical Microbiology**, Reading, v. 57, p. 1369-1376, 2008.

FEIL, E. J. et al. eBurst: inferring patterns of evolutionary descent among cluster of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 186, p. 1518-1530, 2004.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M.V. **Qualidade do leite e controle da mastite**. 1. ed. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. p. 27-28.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **The agricultural production domain**. 2013. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 26 jul. 2013.

GEY, A. et al. Identification of pathogens in mastitis milk samples with fluorescent in situ hybridization. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 25, n. 3, p. 386–394, 2013.

GILLESPIE, B. E.; OLIVER, S. P. Simultaneous detection of mastitis pathogens, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, and *Streptococcus agalactiae* by multiplex real-time polymerase chain reaction. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 88, p. 3510–3518, 2005.

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

HOLT, J. G. et al. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9th ed. Williams & Wilkins, 1994. 532 p.

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

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa da Pecuária Nacional**. Disponível em: <www.cnpqgl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/tabela0230.php> Acesso em: 26 jun. 2013.

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

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

JONES, N. et al. Multilocus sequence typing system for group B *Streptococcus*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, n. 6, p. 2530–2536, 2003.

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

KONG, F. et al. Use of phenotypic and molecular serotype identification methods to characterize previously nonserotypeable group B streptococci. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 46, p. 2745-2750, 2008.

LE MARÉCHAL, C. et al. Mastitis impact on technological properties of milk and quality of milk products: a review. **Dairy Science & Technology**, Les Ulis, v. 91, p. 247–282, 2011.

MAIDEN, M. C. J. Multilocus sequence typing of bacteria. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 60, p. 561-588, 2006.

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

MARTINEZ, G.; HAREL, J.; GOTTSCHALK, M. Specific detection by PCR of *Streptococcus agalactiae* in milk. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v. 65, p. 68-72, 2001.

MATA, A. I. et al. Multiplex PCR assays for detection of bacterial pathogens associated with warm-water streptococcosis in fish. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 3183-3187, 2004.

MENDONÇA, L.C. Conhecendo melhor a mastite clínica. **Panorama do leite online**, Brasil, v.42, maio 2010.
<<http://www.cileite.com.br/panorama/especial42x01.html>>. Acesso em: 10 jan. 2013.

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

MIAN, G. F. et al. Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 136, p. 180-183, 2009.

MUNARI, F. M. et al. A combined enrichent/polymerase chain reaction based method for the routine screening of *Streptococcus agalactiae* in pregnant women. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, p. 253-260, 2012.

MWEU, M.M. et al. Evaluation of two herd-level diagnostic tests for *Streptococcus agalactiae* using a latent class approach. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 159, p. 181-186, 2012.

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

NOTEBAERT.S.; MEYER, E. Mouse models to study the pathogenesis and control of bovine mastitis:a review. **Veterinary Quarterly**, The Hague, v. 28, n. 1, p. 2-13, 2006.

OLIVARES-FUSTER, O.et al. Molecular typing of *Streptococcus agalactiae* isolates from fish. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 31, p. 277-283, 2008.

PALMEIRO, J. K. et al. Phenotypic and Genotypic Characterization of Group B *Streptococcal* Isolates in Southern Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 48, n. 12, p. 4397–4403, 2010.

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

PÉREZ-LOSADA, M. et al. Population genetics of microbial pathogens estimated from multilocus sequence typing (MLST) data. **Infection, Genetics and Evolution**, Philadelphia, v. 6, n. 2, p. 97–112, 2006.

PEREZ NETO, F.; ZAPPA, V. Mastite em vacas leiteira: revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça, n. 16, p. 1-28, 2011.

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

PINTO, T. C. A. et al. Distribution of serotypes and evaluation of antimicrobial susceptibility among human and bovine *Streptococcus agalactiae* strains

isolated in Brazil between 1980 and 2006. **Brazilian Journal Infectious Diseases**, São Paulo, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2012.09.006>, 2013.

PYORALA, S. Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. **Veterinary Research**, Les Ulis, v. 34, p. 565–578, 2003.

POYART, C. et al. Multiplex PCR assays from rapid and accurate capsular typing of group B *streptococci*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 45, p. 1985-1988, 2007.

RADTKE, A. et al. Multiple-locus variant-repeat assay (MLVA) is a useful tool for molecular epidemiologic analysis of *Streptococcus agalactiae* strains causing bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 157, p. 398–404, 2012.

RAINARD, P.; RIOLLET, C. Innate immunity of the bovine mammary gland. **Veterinary Research**, Les Ulis, v. 37, p. 369–400, 2006.

RAJAGOPAL, L. Understanding the regulation of Group B Streptococcal virulence factors. **Future Microbiology**, London, v. 4. p. 201-21, 2009.

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

REYER, K. K. et al. Examining the effect of intramammary infections with minor mastitis pathogens on the acquisition of new intramammary infections with major mastitis pathogens: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 95, p. 1–20, 2012.

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

SAMBROOK; RUSSELL. **Molecular cloning**: a laboratory manual 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.

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

SELLIN, M. et al. Genotyping of the capsule gene cluster (cps) in nontypeable Group B Streptococci reveals two major cps allelic variants of serotypes III and VII. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38. p. 3420–3428, 2002.

SHOME, B.R. et al., 2013 Molecular characterization of *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus uberis* isolates from bovine milk. **Tropical Animal Health Production**, Roslin, v. 44, n. 8, p. 44-48, Dec. 2012.

SLOTVED, H. C. et al. Serotype IX, a proposed new *Streptococcus agalactiae* serotype. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 45, p. 2929-2936, 2007.

SMITH, E.M. et al., Multilocus sequence typing of intercontinental bovine *Staphylococcus aureus* Isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, n. 9, p. 4737–4743, 2005.

SØRENSEN, U. F.; POULSEN, K.; GHEZZO, C. Emergence and global dissemination of host-Specific *Streptococcus agalactiae* Clones. **mBio**, Washington, v. 1, n. 3, p.00178-10, 2010.

SPERS, R. Z.; WRIGHT, J. T. C.; AMEDOMAR, A. A. Scenarios for the milk production chain in Brazil in 2020. **Revista de Administração**, São Paulo, v. 48, n. 2, p. 254-267, 2013.

TALBOT, B. G.; LACASSE, P. Progress in the development of mastitis vaccines. **Livestock Production Science**, Philadelphia, v. 98, p. 101-113, 2005.

TETTELIN, H. et al. Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial “pan-genome”. **P. Acad. Nat Sci.** Washington, v. 102, p. 13950-13955, 2005.

TIEN, N. et al. Multilocus sequence typing of invasive group B *Streptococcus* in central area of Taiwan. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, Philadelphia, v. 44, p. 430-434, 2011.

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

VLIEGHER, S. D. et al. Invited review: mastitis in dairy heifers: nature of the disease, potential impact, prevention, and control. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 95, p.1025–1040, 2012.

YANG, Y. C. et al. Molecular characterization of *Streptococcus agalactiae* isolated from bovine mastitis in Eastern China. **PLOS ONE**, California, v. 8, n. 7, p. 1-8, e67755, 2013

ZADOKS, R.N. et al. Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and comparative relevance to humans. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**, London, v. 16, p. 357–372, 2011.

ZOCCAL, R.; ALVES, E. R.; GASQUES, J. G. **Diagnóstico da pecuária leiteira nacional**. Embrapa, 2011. Disponível em: <http://www.cnp.gl.embrapa.br/nova/Plano_Pecuario_2012.pdf>. Acesso em: 10 maio 2013.

ZUBAIR, S. et al. Genome sequences of two pathogenic *Streptococcus agalactiae* isolates from the one-humped camel *Camelus dromedaries*. **Genome Announc**, Washington, v. 1, n. 4, p. e00515-13. doi:10.1128/genomeA.00515-13, 2013.

SEGUNDA PARTE – ARTIGO

ARTIGO 1

Molecular characterization of *Streptococcus agalactiae* isolated from Bovine Mastitis in Brazil

(Preparado para publicação no periódico “Research in Veterinary Science”)

Carvalho-Castro, G. A.¹; Paiva, L.; Costa, D.A.C.¹; Moreira, R. G.²; Mian, G.F.;; Prado, I. A.¹; Chalfun-Junior A.²; Costa, G. M.^{1*}

1 - Laboratory Bacteriology, Department of Veterinary Medicine, Federal University of Lavras, Lavras, MG 37200-000, Brazil.

2 – Central Laboratory of Molecular Biology , Department of Biology, Federal University of Lavras, Lavras, MG 37200-000, Brazil.

*Corresponding author: Fax: +55-35-38291715,

E-mail: gmcosta@dmv.ufla.br (G.M. Costa)

ABSTRACT

S. agalactiae is a major cause of mastitis in dairy herds, and consequently economic losses to farmers. The aim of the present study was the molecular characterization of isolates from bovine mastitis by capsular typing and sequence type by PCR, multiplex PCR and MLST. Sixty-six isolates from bovine mastitis in 37 dairy farms located in six Brazilian states (Minas Gerais, São Paulo, Santa Catarina, Paraná, Pernambuco and Alagoas) were selected. Five capsular type were found (Ia, Ib, II, III and IV) and some isolates were classified as nonsorotipable (NST). Nine sequence types were observed (ST-61, ST-67, ST-103, ST-146, ST-226, ST-314, ST-354 and ST-570) and clustered in six clonal complexes (CC61, CC67, CC103, CC17, CC314, CC64). With the results obtained, it can be concluded that *S. agalactiae* isolated from Brazilian bovine herds consists of a diverse population.

Keywords: *Streptococcus agalactiae*, multi locus sequence typing, capsular typing

INTRODUCTION

According to data of the World Food Organization (FAO, 2013), the global production of milk reached 606.660.839 tons in 2011. Brazil is among the top producers occupying the 4th position, with an amount of 32.091 million tons.

There are several factors that affect milk production worldwide, and mastitis is among the most serious (Keefe et al., 2012). Additionally, mastitis causes economic losses to producers due to the presence of antibiotic residues in the milk due to indiscriminate use, beyond the emergence of resistant bacteria (Vlieghe et al., 2012) which can be propagated on the farms.

Among the major bovine mastitis pathogens are the bacteria *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis* and *Staphylococcus aureus* (Zadocks et al. 2011; Jain et al., 2012; Keefe, 2012; Rato et al., 2013). Bovine mastitis caused by *Streptococcus agalactiae* was detected in 60% of Brazilian dairy herds (Keefe, 2012).

Streptococcus agalactiae, also known as Group B Streptococcus (GBS), is characterized as causative agent of disease in animals and humans with capacity to colonize different niches. In veterinary medicine, this organism has emerged as a cause of clinical and subclinical mastitis in cattle (Keefe, 2012; Rato et al., 2013; Yang et al., 2013); Intramammary infections caused by *S. agalactiae* are usually associated with high somatic cell counts (SCC), total bacterial count in bulk milk, and decrease in the quantity and quality of milk produced in infected herds (Merl et al., 2003; Keefe, 2012). Additionally it is an important pathogen for aquaculture, accounting for high morbidity and mortality in cases of septicemia and meningoencephalitis in freshwater, marine and estuarine fish (Evans et al., 2002; Mian et al., 2009). In humans, it can cause pneumonia, septicemia and meningitis in neonates, accounting for high

morbidity and mortality in pregnant women and immunocompromised adults (Maione et al., 2005; Johri et al., 2006).

Because of the significance of *S. agalactiae* in animal and public health, several tools have been developed for epidemiological typing of this agent (Jones et al., 2003; Poyart et al., 2007; Imperi et., 2010; Nakib et al., 2011). Capsular serotyping is a classic method used in epidemiological studies of *S. agalactiae*, since the capsule is one the first bacterial virulence factor enabling it to evade the host immune system. Nowadays, ten different capsular serotypes, Ia and I b to IX are known, and the distribution of those in *S. agalactiae* isolates from humans is directly related to ethnic groups and geographic regions (Kong et al., 2008). Capsular genotyping is considered more suitable for epidemiological investigation because the serotypes can be identified with or without the CPS expression (Yang et al., 2013). Multilocus sequence typing (MLST) is based on the amplification and sequencing of housekeeping genes. It has been used to investigate, and to characterize, and distinguish specific clones among GBS isolated from humans and animals from diverse geographical regions (Jones et al. 2003; Maiden et al. , 2006; Pérez-Losada et al., 2006;).

Although MLST and molecular capsular typing are of great importance for epidemiologic inferences of GBS, there are no studies about these isolates from mastitis in Brazilian dairy herds. Therefore, the aim of this study was to characterize genotypically by MLST and capsular typing, *S. agalactiae* isolated from bovines with mastitis from different farms of Brazilian States.

MATERIALS AND METHODS

BACTERIAL STRAINS - A total of 66 *S. agalactiae* strains belonging to culture collection of the Bacteriology Laboratory /DMVP UFLA was used in the present study. The strains were selected from dairy farms located in largest cow milk producer states of the mesoregions of the country. The strains evaluated in this study were obtained from 39 dairy farms, located in the following Brazilian states: Minas Gerais, São Paulo, Santa Catarina, Paraná, and Pernambuco (Table 1). From those, 14 were isolated from bovines with clinical mastitis and 52 from subclinical mastitis. The reference strains NEM 316 and ST 2603 were used as positive control, and the *Streptococcus dysgalactiae* ATCC 27957 was used as negative control in the multiplex-PCR and PCR. The geographic location of the states in Brazil is shown in Figure 1.

DNA EXTRACTION AND SEQUENCING - Total DNA was extracted using the commercial DNeasy kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. PCR products were purified using a Wizard PCR preps kit (Promega, Madison, USA). Sequencing reactions were performed using the Applied Biosystem BigDye terminator cycle sequence kit and run on ABI 3730XL genetic analyzer (Applied Biosystems, Carlsbad, USA).

SPECIFIC PCR AND MOLECULAR CAPSULAR TYPING - The isolates were previously phenotypically characterized. The genotypic identification was performed by *S. agalactiae*-specific PCR according to Mata et al (2004). All isolates were submitted to capsular polysaccharide typing by multiplex PCR assay, as described by Poyart et al (2007). Strains without amplification in multiplex PCR were submitted to serotype IX specific PCR (Slotved et al., 2007). The *S. agalactiae* strains, NEM316 (type III) and ATCC BAA-611, also designated 2603V/R, (type V) were included as positive controls for Mix I and Mix II of multiplex PCR, respectively. The amplification products were analyzed on 1.5% (w/v) agarose gel electrophoresis with 1X Tris-

acetate buffer (0,04 M Tris–acetate, PH 8.4, 1 mM EDTA) and were visualized with a UV transilluminator after staining with Gelred™ (Biotium, USA) 0.5X. A 100 bp ladder DNA molecular marker (New England Biolabs, USA) was used in each electrophoresis.

MULTILOCUS SEQUENCE TYPING (MLST) AND ASSIGNMENT TO CLONAL GROUPS

MLST was performed by sequencing the internal fragments from seven housekeeping genes (*adhP*, *pheS*, *atr*, *glnA*, *sdhA*, *glcK* and *tkt*) according to Jones et al. (2003). Sequence types (ST) were defined by analyzing the seven concatenated sequences in the *S. agalactiae* MLST database (<http://pubmlst.org/sagalactiae>). The eBURST V3 program (<http://eburst.mlst.net>) (Feil et al., 2004) was used to identify clonal complexes among *S. agalactiae* strains isolated from bovines.

RESULTS

Positive amplification of the fragment of 192 pb for species specific PCR reactions were observed for all 66 isolates (Figure 2). In the present study five CPS types in the Brazilian strains were identified: III (34.84%), II (21.12%), Ib (16.66%), Ia (7.57%), IV (7.57%), and Nontypeable (NT) for CPS (12.12%). Serotype III was more frequent independent of the strain having been isolated from clinical mastitis or the subclinical. Isolates from clinical mastitis were classified as follows CPS III (50%), CPS II (25%), CPS IV (16.66%) and NT (8.33%). Relative to the frequency found in the different states, in Minas Gerais all CPS types found in this study were detected, with exception of CPS type Ib. We found higher frequency of CPS III (70.58%) followed by CPS IV (20.58%), CPS Ia (5.88%) and CPS II (2.94%). In São Paulo state CPS II (58.33%) prevailed, followed by III (16.66%), and 25% of NT isolates. Interestingly, homogeneity was observed in isolates from Paraná state with predominantly CPS Ib (69.23%) (Figure 3) and the remainder, NT (30.77%). Likewise, 100% of isolates from Santa Catarina state were classified as CPS Ib, whilst the strains isolated to the state of Pernambuco showed a higher frequency for CPS II (63.63%) followed by CPS Ia (27.27%), and CPS III (9.09%). Also, we observed that in the five Brazilian dairy herds (11 MG, 12 MG, 23 MG, 37 SP, 38 PE) there were strains with different serotypes (Table 2).

In MLST, nine STs were identified among the 66 strains analysed: ST-61, ST-67, ST-91, ST-103, ST-146, ST-226, ST-314, ST-354, and ST-570. The majority of strains belonged to ST-67 (n = 25) whereas for the other ST the frequency observed was similar, except for ST-103, ST-146, ST-314 and ST-354, which presented frequency $\leq 3.5\%$. The eBurst analysis (Figure 4) clustered ST-61, ST-91 clonal complex (CC) 61; ST-67, ST-354 and ST-570 into CC67; ST-146 of our results into CC17; ST-103 into CC103, and ST-226 and ST-314 into CC314 (Table 2).

DISCUSSION

The specific PCR was performed in this work to confirm the phenotypic tests, and some strains were excluded for this because it is less mistake prone than the phenotypic identification techniques (Braga et al., 2013). Additionally, it is a fast, less laborious, and cheap technique showing the advantage over phenotypic tests.

The findings for capsular type, are consistent with the results related by Duarte et al. (2004) who also found the same capsular types with a higher frequency to CPS III, isolated from bovine mastitis in the southeast region of Brazil. However, they differ from those found by Pinto et al. (2013), who observed a higher frequency of isolates with 20% CPS V and strains NT, although CPS Ia, CPS II, and III were also detected. This is probably due to the origin of the strains, since most isolates studied by Pinto et al. (2012) were isolated from cows from Rio de Janeiro State, not included in our study. In contrast, in this study and that of Duarte et al. (2004) there are more isolates from cows of Minas Gerais State, confirming that there is a relationship between the CPS and geographic region. Merl et al. (2003) found a higher frequency of GBS CPS Ia and NT in strains isolated from Germany. For isolates originating from dairy herds in France a higher frequency of NT, followed by CPS III and IV (Brochet et al. (2006) was verified. This association between capsular serotype and geographic region is well defined for isolates of human origin, where data show a higher frequency of CPS Ia, II, III and IV in the United States, Europe and Australia, while in Japan there is a predominance of CPS VI and VIII. Additionally, for isolates from humans in Brazil, a higher frequency of CPS Ia, III and IV has been observed (Palmiero et al., 2010; Correa et al., 2011; Pinto et al. 2013).

The presence of isolates within the same herd belonging to a different CPS type may be related to a selection pressure exerted by the host or even a

possible exchange of capsular type, a phenomenon common in the bacteria of the genus *Streptococcus* (Cieslewicz et al., 2005; Martins et al. 2010). Another possible justification may be the tracking of animals among different farms, a practice very common in Brazilian dairy herds.

The frequency of isolates classified as NT in this study was lower than in previous studies with isolates from Brazil (Pinto et al., 2013; Palmiero et al., 2010). This difference probably occurred due to use of the molecular typing techniques in our study, that are more specific and sensitive than those used in previous studies for capsular typing that have been published (Pinto et al., 2013; Palmiero et al., 2010). The presence of NT strains were described in previous study with isolates from humans, bovines and fish (Kong et al., 2005; Palmiero et al., 2010; Godoy et al., 2013). This phenomenon may be related to mutation events in the alignment region of the primer in the gene, or others already described in literature, such as switching capsules or absence of capsule (Martins et al., 2010;)

The results for MLST screening in *S. agalactiae* of Brazilian cows showed a heterogeneity among the isolates which were divided into five CC (Table 2). Despite having no published date of *S. agalactie* isolated from Brazilian cows, in the present work no new ST was found in relation to MLST data of others countries. The findings of the various ST in Brazilian isolates can be associated to the national and international trade of cows that could be asymptomatic carriers of the different types. The most frequent STs observed in the present study (ST-67, ST-61, ST-91, ST-570, and ST-226) has been described as related to bovines (Brochet et al, 2006; Springman et 2009 al.; Yang et., 2013). The STs appear to have no relationship with geographic origin of the isolates or with capsular type, regardless of ST-103, ST-146, ST-314 and ST-354 seeming to be related to the single CPS. The isolates classified as ST-103 have been previously described as associated to CPS Ia, and this ST seems

to be able to adapt to different host. Previously, it has been suggested that strains classified as ST-7 CPS Ia have a zoonotic potential (Evans et al., 2008). Likewise, the ST-103 strains were always associated to CPS Ia, and are able to colonize different hosts, these strains seem be a potential anthroozoonotic and zoonotic when the animals and handlers have close contact. However future studies are necessary to confirm this.

ST-61, ST-91 and ST-67 are considered genetically related and adapted to the bovine mammary gland ~~and~~. This fact could be explained by the bovine strains sharing a common recombinant event in virulence genes, which has a crucial role in interaction between host-parasite (Springman et al., 2009). Our results reinforce this hypothesis, since all clinical mastitis isolates were classified within one of these STs (Table 2), suggesting the capacity of these strains to invade and colonize the mammary gland of the cow.

The presence of ST-103 among the Brazilian isolates was not surprising because it seems to be an ST able to infect different hosts and it was recently described as a cause of fish disease in the country (Brochet et al., 2006; Godoy et al., 2013). Recently, this *S. agalactiae* ST has been reported as prevalent in bovine mastitis in Denmark and eastern China (Zadock et al., 2011; Yang et al., 2013).

ST-314 and ST-146 were identified in our study, and this is the first description of the identification of these STs in association with bovine mastitis. ST-146 is clustered in CC17 which is related mainly to isolates from humans. As with ST103, it emerged as a highly prevalent clone in bovine milk and it may be that the same happen to ST-146, probably by acquisition of genetic material that confers a survival advantage in the bovine udder. This is one of the explanations under investigation (Zadock et al., 2011).

In conclusion, *Streptococcus agalactiae* bovine strains constitute a diverse population with five different capsular types and five distinct

populations according to ST. The results showed that five distinct populations can cause mastitis, however it suggests that only two (CC61 and CC67) are able to evolve to clinical disease. Finally, our results enabled the establishment of the molecular epidemiology for *S. agalactiae* isolated from cows of Brazilian herds which is essential for the implementation of prevention and control programs for pathogen eradication.

REFERENCES

Barbalho, T.C.F.; Mota, R.A. Isolamento de agentes bacterianos envolvidos na mastite subclínica bovina no Estado do Pernambuco. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v. 2, n.2, p.31-36, 2001.

Braga, P.A.C.; Tata, A.; Santos, V.G.; Barreiro, J.R.; Schwab, N.V.; Santos, M.V.; Eberlina, M.G.; Ferreira, C.R.. Bacterial identification: from the agar plate to the mass spectrometer. *RSC Advances* v. 3, p.994–1008, 2013.

Brochet, M.; Couvé, E.; Zouine, M.; Vallaëys, T.; Rusniok, C.; Lamy, M. C.; Buchrieser, C.; Trieu-Cuot, P.; Kunst, F.; Poyart, C.; Glaser, P.. Genomic diversity and evolution within the species *Streptococcus agalactiae*. *Microbes Infection* v.8, p.1227-1243, 2006.

Cieslewicz, M.J.; Chaffin, D.; Glusman, G.; Kasper, D.; Madan, A.; Rodrigues, S.; Fahey, J.; Wessels, M.R.; Rubens, C.E.. Structural and Genetic Diversity of Group B *Streptococcus* Capsular Polysaccharides. *Infection and Immunity* v.73 (5), p. 3096–3103, 2005.

Corrêa, A. B. A.; Lígia Guedes da Silva, Pinto, T. C. A.; Oliveira, I. C. M.; Fernandes, F.G.; Costa, N.S.; Mattos, M.C.; Fracalanza, S.E.L.; Benchetrit, L.C.. The genetic diversity and phenotypic characterisation of *Streptococcus agalactiae* isolates from Rio de Janeiro, Brazil. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz* v.106(8), p. 1002-1006, 2011.

Corrêa, A. B. A.; Oliveira, I. C. M.; Pinto, T. C. A.; Mattos, M. C.; Benchetrit, L.C.. Pulsed-field gel electrophoresis, virulence determinants and antimicrobial susceptibility profiles of type Ia group B *streptococci* isolated from humans in Brazil. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz* v.104, p.599-603, 2009.

Costa, E.O.; Garino Jr, F.; Watanabe, 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*, v. 4, n. 3, p. 10-13, 2001.

Costa, E.O.; Melville, P.A.; Ribeiro, A.R.; et al. Índices de mastite bovina clínica e subclínica nos estados de São Paulo e Minas Gerais. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 17, n. 5, p. 215-217, 1995.

Costa, E.O.; Ribeiro, A.R.; Watanabe, E.T.; et al. Mastite subclínica: prejuízos causados e os custos de prevenção em propriedades leiteiras. *Revista do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira*, v. 2, n. 2, p. 16-20, 1999.

Costa, E.O. Importância da mastite na produção leiteira do país. *Revista de Educação Continuada-CRMV-SP*, v. 1, n. 1, p 3-9, 1998.

Duarte, R. S.; Miranda, O. P.; Bellei, B. C.; Brito, M. A. V. P.; Teixeira, L.M. Phenotypic and molecular characteristics of *Streptococcus agalactiae* isolates recovered from milk of dairy cows in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology* v. 42, p. 4214-4222, 2004

Enright, M.C.; Robinson, D.A.; Randle, G.; Feil, E.J.; Grundmann, H.; Spratt, B.G. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *PNAS*, v.99, n.11, p.7687–7692, 2002.

Evans, J. J.; Klesius, P. H.; Gilbert, P. M.; Shoemaker, C. A.; Sarawi, M. A. A. L.; Landsberg, J.; Duremdez, R.; Markouk, A. A. L.; Kenzi, S. A. L. Characterization of β -haemolytic group B *Streptococcus agalactiae* in cultured seabream, *Sparus auratus* L., and wild mullet, *Liza klunzingeri* (Day), in Kuwait. *Journal of Fish Diseases*, v. 25. p. 505-13, 2002.

Evans, J. J.; Bohnsack, J. F.; Klesius, P. H.; Whiting, A. A.; Garcia, J. C.; Shoemaker, C. A.; Takahashi, S.. Phylogenetic relationship among *Streptococcus agalactiae* from piscine, dolphin, bovine and human sources: a dolphin and piscine lineage associated with a fish epidemic in Kuwait is also associated with human neonatal infection in Japan. *Journal of Medical Microbiology* v.57, p.1369-1376, 2008.

Feil, E. J.; Li, B. C.; Aanensen, D. M.; Hanage, W. P.; Spratt, B.G.. eBurst: inferring patterns of evolutionary descent among cluster of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *Journal of Bacteriology* v.186, p. 1518-1530, 2004.

Gillespie, B.E. & Oliver, S.P.. Simultaneous Detection of Mastitis Pathogens, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, and *Streptococcus agalactiae* by Multiplex Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Journal of Dairy Science* v.88, p. 3510–3518, 2005.

Hillerton, J.E. and Berry, E.A. Treating mastitis in the cow – a tradition or an archaism. *Journal of Applied Microbiology* v.98, p. 1250–1255, 2005.

- Jain, B.; Tewari, A.; Bhandari, B.B.; Jhala, M.K.. Antibiotic resistance and virulence genes in *Streptococcus agalactiae* isolated from cases of bovine subclinical mastitis. *Veterinarski Arhiv* v. 82 (5), p. 423-432, 2012.
- Johri, A.K.; Paoletti, L.C.; Glaser, P.; Dua, M.; Sharma, P.K.; Grandi, G.; Rappuoli, R.. Group B *Streptococcus*: global incidence and vaccine development. *Nature reviews Microbiology*, v.4, p. 932-942, 2006.
- Jones, N.; Bohnsack, J.B.; Takahashi, S.; Oliver, K.A.; Chan, M.; Kunst, F.; Glaser, P.; Rusniok, C.; Crook, D.W.M.; Harding, R.M.; Bisharat, N.; Spratt, B.G.. Multilocus Sequence Typing System for Group B *Streptococcus*. *Journal of Clinical Microbiology*, v.41 (6), p. 2530–2536, 2003.
- Keefe, G.. Update on Control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for Management of Mastitis. *Vet Clin Food Anim* v.28, p. 203–216, 2012.
- Kong, F.; Lambertsen, L. M.; Slotved, H-C.; Ko, D., Wang, H.; Gilbert, G. L.. Use of phenotypic and molecular serotype identification methods to characterize previously nonserotypeable group B streptococci. *Journal of Clinical Microbiology* v.46, p.2745-2750, 2008.
- Laffranchi, A.; Muller, E.E.; Freitas, J.C. et al.. Etiologia das infecções intramamárias em vacas primíparas ao longo dos primeiros quatro meses de lactação. *Ciência Rural*, v. 31, n. 6, p. 1027-1032, 2001.
- Maiden, M.C.J.. Multilocus Sequence Typing of Bacteria. *Annual Review of Microbiology* v.60, p. 561-588 2006.
- Mata, A. I.; Gibello, A.; Casamayor, A.; Blanco, M. M.; Domínguez, L.; Fernández-Garayzábal, J.F.. Multiplex PCR assays for detection of bacterial pathogens associated with warm-water streptococcosis in fish. *Applied Environmental Microbiology* v.70, p. 3183-3187, 2004.
- Martins, E.R.; Melo-Cristino, J.M., Ramirez, M.. Evidence for Rare Capsular Switching in *Streptococcus agalactiae*. *Journal of Bacteriology*, v.192 (5), p. 1361–1369, 2010.
- Merl, K.; Abdulmawjood, A.; Lammler, C.; Zschock, M.. Determination of epidemiological relationships of *Streptococcus agalactiae* isolated from bovine mastitis. *FEMS Microbiology Letters* v.226, p. 87-92, 2003.

Mian, G. F.; Godoy, D. T.; Leal, C. A. G.; Yuhara, T. Y.; Costa, G.M.; Figueiredo, H.C.P.. Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia. *Veterinary Microbiology* v. 136, p. 180-183, 2009.

Mota, R.A.; Pinheiro Junior, J.W.; Silva, D.R.; et al. Etiologia da mastite subclínica em bovinos da bacia leiteira do Estado do Pernambuco. *Revista do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira*, v. 7, n. 1, p. 10-13, 2004.

Nakib, M.A.; Longo, M.; Tazi, A.; Billoet, A.; Raymond, J.; Trieu-Cuot, P.; Poyart, C.. Comparison of the Diversilab® system with multi-locus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis for the characterization of *Streptococcus agalactiae* invasive strains. *Journal of Microbiological Methods* v.85, p. 137–142, 2011.

Palmeiro, J.K.; Dalla-Costa, L.M.; Fracalanza, S.E.L.; Botelho, A.C.N.; Nogueira, K.S.; Scheffer, M.C.; Torres, R.S.L.A.; Carvalho, N.S.; Cogo, L.L.; Madeira, H.M.F.. Phenotypic and Genotypic Characterization of Group B *Streptococcal* Isolates in Southern Brazil. *Journal of Clinical Microbiology* v.48 (12), p. 4397–4403, 2010.

Pereira, U. P., Mian, G. F., Oliveira, I. C. M., Benchetrit, L. C., Costa, G. M., and H. C. P. Figueiredo. 2010. Genotyping of *Streptococcus agalactiae* strains isolates from fish, human and cattle and their virulence potential in Nile tilapia. *Vet. Microbiol.* 140:186-192.

Pérez-Losada, M.; Browne, E.B.; Madsen, A.A.; Wirth, T.; Viscidi, R.P.; Crandall, K.A.. Population genetics of microbial pathogens estimated from multilocus sequence typing (MLST) data. *Infection, Genetics and Evolution* v. 6(2), p. 97–112, 2006.

Peres Neto, F.& Zappa, V.. Mastite em vacas leiteira – revisão de literatura. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária* n.16, p.1-28, 2011.

Pieterse, R.; Todorov, S.D.. Bacteriocins –exploring alternatives to antibiotics in mastitis treatment. *Brazilian Journal of Microbiology* v. 41, p. 542-562, 2010.

Pinto, T.C.A.; Costa, N.S.; Souza, A.R.V.; Silva, L.G.; Corrêa, A.B.A.; Fernandes, F.G.; Oliveira, I.C.M.; Mattos, M.C.; Rosado, A.S.; Benchetrit, L.C.. Distribution of serotypes and evaluation of antimicrobial susceptibility among human and bovine *Streptococcus agalactiae* strains isolated in Brazil

between 1980 and 2006. *Brazilian Journal Infectious Diseases*, 2013, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2012.09.006>.

Poyart, C.; Tazi, A.; Réglie-Poupet, H.; Billoët, A.; Tavares, N.; Raymond, J.; Trieu-Cuot, P.. Multiplex PCR assays from rapid and accurate capsular typing of group B *streptococci*. *Journal of Clinical Microbiology* v.45, p. 1985-1988, 2007.

Rainard, P.; Riollot, C.. Innate immunity of the bovine mammary gland. *Veterinary Research* v. 37, p. 369–400, 2006.

Rajagopal, L.. Understanding the regulation of Group B Streptococcal virulence factors. *Future Microbiology* v. 4. p. 201-21, 2009.

Rato, M.G.; Bexiga, R.; Florindo, C.; Cavaco, L.M.; Vilela, C.L.; Santos-Sanches, I.. Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of streptococci from bovine mastitis. *Veterinary Microbiology* v.161, p. 286–294, 2013.

Smith, E. M.; Green, L. E.; Medley, G. F.; Bird, FOX, L. K.; Suhkken, Y. H.; Kruze, J. V.; Bradley, A. J.; Zadoks, R. N.; Dowson, C. G. Multilocus sequence typing of intercontinental bovine *Staphylococcus aureus* Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 43, n. 9, p. 4737–4743, 2005.

Springman, A. C., Lacher, D. W., Wu, G., Milton, N., Whittam, T. S., Dele Davies, H., and S. D. Manning. Selection, recombination and virulence genes among group B streptococcal genotype. *J. Bacteriol.* V.191:, p.419-5427, 2009

Slotved, H. C., Kong, F., Lambertsen, L., Sauer, S., and G. L. Gilbert. 2007. Serotype IX, a proposed new *Streptococcus agalactiae* serotype. *Journal of Clinical Microbiology* v.45, p. 2929-2936, 2007.

Reyer ,K.K.; Haine , D.; Dohoo , I.R.; Revie, C.W.. Examining the effect of intramammary infections with minor mastitis pathogens on the acquisition of new intramammary infections with major mastitis pathogens—A systematic review and meta-analysis. *Journal of Dairy Science* v.95, p.1–20, 2012.

The Food and Agriculture Organization of the United Nations . Available at: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Accessed on: 26/07/2013.

Tien, N.; Ho, C.; Lin, H.J.; Shih, M.; Ho, M.; Lin, H.; Lin, H.; Chang, C.; Lu, J.. Multilocus sequence typing of invasive group B Streptococcus in central area

of Taiwan. Journal of Microbiology, Immunology and Infection v.44, p. 430-434,2011.

Vliegheer, S.D.; Fox , L.K.; Piepers , S.; McDougall , S.; Barkema, H.W..
Invited review: Mastitis in dairy heifers: Nature of the disease, potential impact, prevention, and control. Journal of Dairy Science v.95, p.1025–1040, 2012.

Yang, Y.C.; Liu, Y.L; Ding, Y.; Yi, L.; Ma, Z.; Fan, H.; Lu, C..Molecular Characterization of *Streptococcus agalactiae* Isolated from Bovine Mastitis in Eastern China. PLOS ONE . V.. 8 , n. 7 , p.1-8, e67755, 2013.

Yao, K.; Poulsen, K.; Maione, D.; Rinaudo, D.; Baldassarri, L.; Telford, J.L.; Sorensen, U.B.; Kilians, M.. Capsular Gene Typing of *Streptococcus agalactiae* Compared to Serotyping by Latex Agglutination. Journal of Clinical Microbiology v. 51 (1) p. 1-5, 2013.

Zadoks, R.N.; Middleton, J.R.; McDougall, S.; Katholm. J.; Schukken, Y.H..
Molecular Epidemiology of Mastitis Pathogens of Dairy Cattle and Comparative Relevance to Humans. J Mammary Gland Biol Neoplasia v.16, p. 357–372, 2011.

Zafalon, L.F.; Amaral, L.A.; Nader Filho, A.; et al. Influência de bactérias do gênero *Corynebacterium* e estafilococos coagulase positivos e negativos sobre a contagem de células somáticas e a produção láctea de quartos mamários com mastite subclínica. Revista do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira, v. 2, n. 6, p. 4-6, 1999.

Table 1 Genotypic characteristics and origin of the GBS used in the present study

Strain *	Mastitis Origin	Farm	Isolamento year	Milking Type	Specific PCR	Capsular Type	Sequence Type
12 MG	Subclinical	1	2004	Mechanic	+	III	61
40 MG	Subclinical	1	2004	Mechanic	+	III	61
164 MG	Subclinical	4	2004	Mechanic	+	III	91
199 MG	Clinical	4	2004	Mechanic	+	III	61
458 MG	Subclinical	11	2004	Mechanic	+	III	67
461 MG	Clinical	11	2004	Mechanic	+	IV	91
477 MG	Clinical	12	2004	Mechanic	+	III	91
522 MG	Subclinical	12	2004	Mechanic	+	IV	570
568 MG	Clinical	13	2004	Mechanic	+	IV	67
580 MG	Subclinical	13	2004	Mechanic	+	IV	67
617 MG	Subclinical	14	2004	Mechanic	+	III	61
730 MG	Subclinical	16	2004	Mechanic	+	Ia	103
794 MG	Subclinical	17	2004	Mechanic	+	III	91
926 MG	Subclinical	21	2004	Mechanic	+	Ia	67
999 MG	Clinical	23	2004	Mechanic	+	III	67
1027 MG	Subclinical	23	2004	Mechanic	+	IV	67
1051 MG	Subclinical	24	2004	Mechanic	+	III	61
1093 MG	Clinical	24	2004	Mechanic	+	III	61
1102 MG	Subclinical	25	2004	Mechanic	+	III	91
1205 MG	Subclinical	27	2004	Mechanic	+	III	91
1230 MG	Subclinical	27	2004	Mechanic	+	III	91
1427 MG	Subclinical	30	2004	Mechanic	+	III	146
1438 MG	Subclinical	31	2004	Mechanic	+	III	61
1496 MG	Subclinical	32	2005	Mechanic	+	III	67
1514 MG	Clinical	32	2005	Mechanic	+	III	91

Table 1, continue

Strain *	Mastitis Origin	Farm	Isolamento year	Milking Type	Specific PCR	Capsular Type	Sequence Type
1540 MG	Subclinical	33	2005	Mechanic	+	III	146
1565 MG	Subclinical	33	2005	Mechanic	+	III	146
6 SP	Subclinical	34	2010	Mechanic	+	II	67
195 SP	Subclinical	35	2011	Manual	+	II	67
163 SP	Subclinical	36	2011	Manual	+	III	61
183 SP	Subclinical	36	2011	Manual	+	III	61
117 SP	Clinical	37	2011	Manual	+	NST	61
102 SP	Subclinical	37	2011	Manual	+	II	67
105 SP	Subclinical	37	2011	Manual	+	II	67
111 SP	Clinical	37	2011	Manual	+	II	67
110 SP	Subclinical	37	2011	Manual	+	NST	67
108 SP	Subclinical	37	2011	Manual	+	II	67
118 SP	Clinical	37	2011	Manual	+	II	67
107 SP	Subclinical	37	2011	Manual	+	NST	67
82 PE	Clinical	38	2011	Manual	+	III	91
10 PE	Subclinical	38	2011	Manual	+	II	67
212 PE	Clinical	42	2011	Manual	+	II	67
38 PE	Subclinical	42	2011	Manual	+	II	354
86 PE	Subclinical	40	2011	Manual	+	II	67
110 PE	Subclinical	43	2010	Manual	+	II	67
159 PE	Subclinical	44	2010	Manual	+	II	67

Table 1, conclusion

Strain *	Mastitis Origin	Farm	Isolamento year	Milking Type	Specific PCR	Capsular Type	Sequence Type
166 PE	Subclinical	39	2011	Manual	+	II	67
177 PE	Subclinical	45	2010	Manual	+	Ia	61
185 PE	Subclinical	41	2011	Manual	+	Ia	314
241 PE	Subclinical	42	2011	Manual	+	Ia	103
259 PR	Subclinical	48	2010	Mechanic	+	Ib	226
262 PR	Subclinical	49	2010	Mechanic	+	Ib	226
349 PR	Subclinical	47	2010	Mechanic	+	Ib	570
354 PR	Subclinical	47	2010	Mechanic	+	Ib	570
359 PR	Subclinical	46	2010	Mechanic	+	NST	570
416 PR	Subclinical	51	2010	Mechanic	+	Ib	570
461 PR	Subclinical	50	2010	Mechanic	+	Ib	570
470 PR	Subclinical	49	2010	Mechanic	+	Ib	226
520 PR	Subclinical	48	2010	Mechanic	+	Ib	570
542 PR	Subclinical	46	2010	Mechanic	+	NST	570
584 PR	Subclinical	49	2011	Manual	+	NST	226
693 PR	Subclinical	52	2011	Manual	+	NST	226
599 PR	Subclinical	52	2011	Manual	+	Ib	226
3 SC	Subclinical	53	No date	Manual	+	Ib	67
4 SC	Subclinical	54	No date	Manual	+	Ib	67
8 SC	Subclinical	55	No date	Manual	+	NST	67

* Brazilian states from isolament of the strains: MG - Minas Gerais; SP - São Paulo; PE – Pernambuco; PR – Paraná; SC – Santa Catarina

Table 2 Characteristics of GBS isolates according ST

ST ¹	Allelic Profile	N° of isolates in ST (%)	Serotype (n° of isolates)	State of origin (n° of isolates)	CC ²
61	13,1,1,13,1,1,1	11 (16.66%)	III(9), Ia(1), NST(1)	MG(7), SP(3), PE(1)	61
67	13,1,1,13,1,1,5	25 (37.78%)	Ia(1),Ib (2),II(13),III(13), IV(3),NST(3)	MG(7),PE(6),SC(3)	67
91	25,1,1,13,15,1	9 (13.63%)	III(8), IV(1)	MG(8),PE(1)	61
103	16,1,6,2,9,9,2	2 (3%)	Ia(2)	MG(1),AL(1)	103
146	2,1,1,1,1,1,1	3 (4.5%)	III(3)	MG(3)	17
226	16,1,2,2,9,1,2	6 (9.0%)	Ib(4), NST(2)	PR(6)	314
314	16,1,2,2,9,2,2	1 (1.5%)	Ia(1)	PE(1)	314
354	13,1,1,13,1,1,25	1 (1.5%)	II(1)	PE(1)	67
570	16,1,1,2,1,1,5	8 (12.12%)	Ib(5), IV(1), NST(2)	MG(1);PR(7)	67

Abbreviation: ¹ Sequence Type; ² Clonal Complex

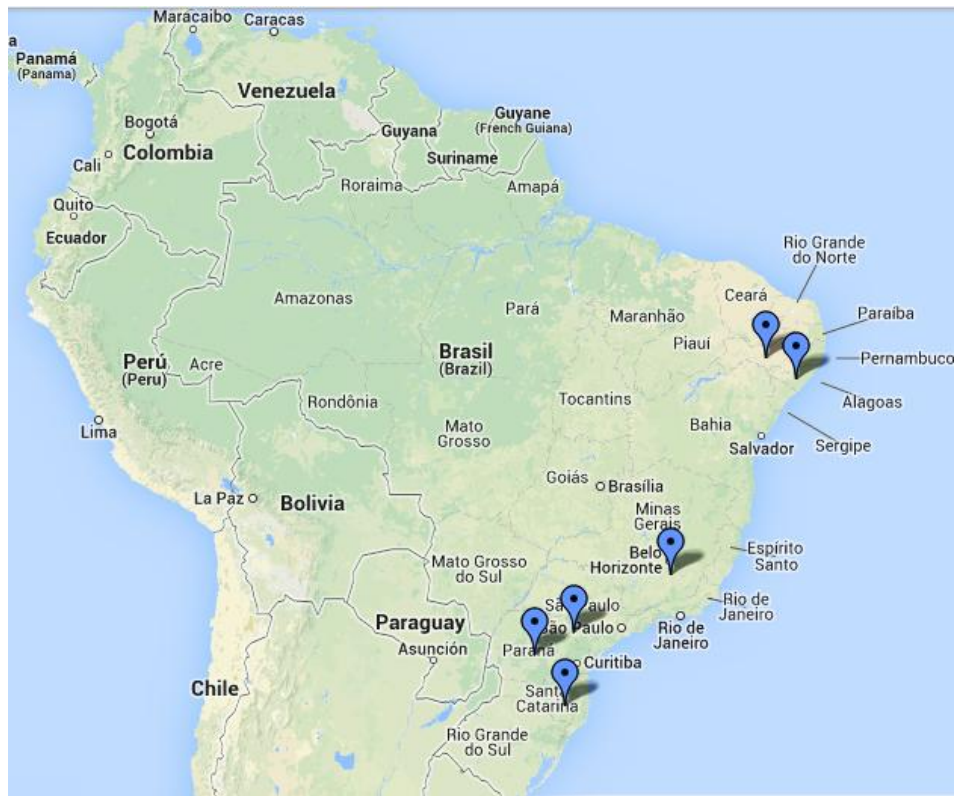


Figure 1 Geographic localization of the Brazilian States where the dairy farm are placed

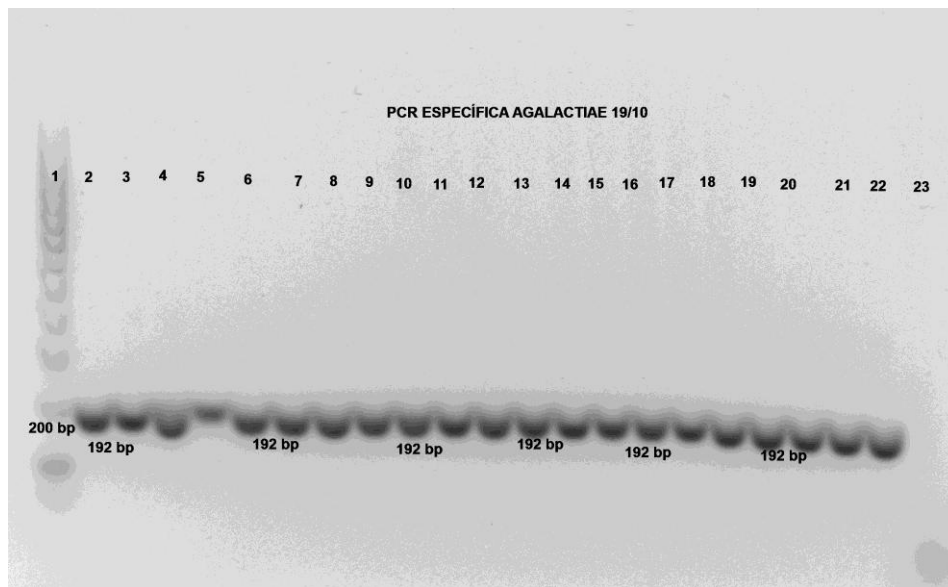


Figure 2 Agarose gel electrophoresis of specific PCR *Streptococcus agalactiae*, from Brazilian strains isolated from mastitis, showing the products of 192bp in lanes 2-22. Lane 1: 100 bp ladder; Lane 23: Negative control

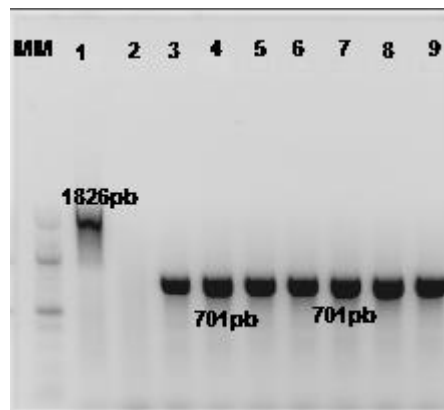


Figure 3 Agarose gel electrophoresis of Mix I of multiplex PCR for molecular typing of capsule. Lane 1: 100 bp ladder; lane 2: Positive control (NEM 316 capsule type III); lane 3-9: Strains isolated of bovine mastitis from Parana State (Capsule type Ib)

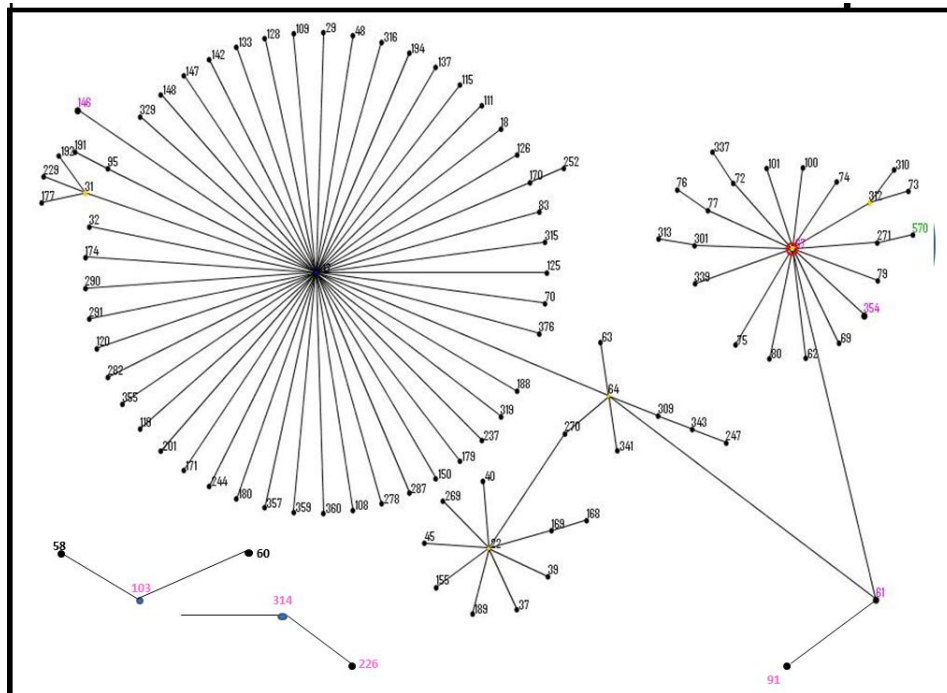


Figure 4 BURST diagram of the *Streptococcus agalactiae* population used in this study. Each sequence type (ST) is represented by number. The dots positioned centrally in the cluster are primary founders (blue) or subgroup founders (yellow). Pink and green numbers indicate STs detected from the strains in this study

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho permitiu concluir que dentro dos rebanhos leiteiros brasileiros analisados existem cinco tipos distintos de *S. agalactiae* circulantes em relação ao tipo capsular Ia, Ib, II, III, IV e, provavelmente, esses estão relacionados com a região geográfica. Em relação aos *sequence typing*(ST) identificados pelo MLST, existem nove circulantes: ST-61, ST-67, ST-91, ST-103, ST-146, ST-226, ST-314, ST340, ST-570. Estes ST são inseridos em cinco populações (complexos clonais-CC) de *S. agalactiae* (CC17, CC61, CC67, CC103, CC314). Com a epidemiologia molecular de *S. agalactiae* de isolados de bovinos brasileiros aqui estabelecida, poderão ser realizados novos estudos relacionados a virulência e resistência antimicrobiana. Ademais, os resultados encontrados permitem a implementação de métodos de controle e prevenção específicos contra *S. agalactiae* em rebanhos bovinos.