

Rayane Amaral da Silva Moraes

**DETECÇÃO GENÔMICA DE *Streptococcus uberis* EM AMOSTRAS DE LEITE
DE REBANHOS BOVINOS DE MINAS GERAIS E IDENTIFICAÇÃO DE SEUS
FATORES DE VIRULÊNCIA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária.

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Nivaldo da Silva

Belo Horizonte
Escola de Veterinária da UFMG
2010

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha mãe Nelsa, pelo amor incondicional, e por ser a maior incentivadora de todas as minhas decisões.

Aos meus avós Dorinha e Nelson, pelo carinho recebido durante tantos anos.

À minha irmã Luara, pelos anos de perturbações, agradeço demais!

Ao meu orientador, professor Nivaldo da Silva, pela orientação e confiança depositada em meu trabalho.

Às companheiras de laboratório Bárbara e Júnia, pelo apoio, incentivo, amizade e companhia nos diversos cafés, capuccinos e pães de queijo...

Ao Pentágono. Dany, Poca, TT, Amanda e Rubí, obrigada pela cumplicidade. Vocês são parte da minha existência.

A Ana Cândida e Vanessa, pela amizade que foi progredindo ao longo da convivência, pelos inúmeros momentos de risos e gargalhadas, pelos miojos e amanteigados compartilhados. Obrigada também por estarem presentes em momentos difíceis!

Aos amigos Dani Duarte, Júlia, Fael, Victor, Zamba, Grazi, Marisa, Aninha e Regina, obrigada por existirem!

Aos colegas de curso, funcionários e professores da EV-UFGM, por ajudas valiosas.

Ao Pink Floyd, por suas músicas que me acompanham em tantos momentos de estudo.

“Pare de buscar. O que é, é: pare e veja.”
Osho

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	8
RESUMO	9
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2.1. Mastite	10
2.1.1. Importância	10
2.1.2. Caracterização da doença	11
2.1.3. Epidemiologia	12
2.1.4. Prevenção e controle	13
2.1.5. Uso de antimicrobianos	14
2.2. <i>Streptococcus uberis</i>	15
2.2.1. Fatores de virulência	17
2.2.1.1. PauA	18
2.2.1.2. SUAM	19
2.3. Cenário atual	20
3. EXPERIMENTO I (Identificação e distribuição de <i>S. uberis</i> em amostras de leite procedentes de diferentes regiões leiteiras do estado de Minas Gerais)	21
3.1. INTRODUÇÃO	21
3.2. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.2.1. Local de realização dos experimentos	21
3.2.2. Amostras	22
3.2.2.1. Amostra de referência	22
3.2.2.2. Amostras de leite	22
3.2.3. PCR	23
3.2.3.1. Extração do DNA genômico da amostra de referência	23
3.2.3.2. Extração do DNA genômico de <i>S. uberis</i> diretamente do leite	23
3.2.3.3. Detecção de <i>S. uberis</i> pela técnica de PCR	23
3.2.3.4. Visualização dos segmentos amplificados	24
3.2.4. Sequenciamento	24
3.3. RESULTADOS	24
3.3.1. PCR das amostras de leite	24
3.3.2. Sequenciamento	25
3.4. DISCUSSÃO	27
3.5. CONCLUSÃO	28
4. EXPERIMENTO II (Determinação dos fatores de virulência de <i>S. uberis</i> isolados na região da bacia leiteira do Sul de Minas Gerais)	28
4.1. INTRODUÇÃO	28
4.2. MATERIAL E MÉTODOS	28
4.2.1. Amostras	28
4.2.1.1. Amostra de referência	28
4.2.1.2. Amostras de campo	28
4.2.2. Identificação das amostras de <i>S. uberis</i> pela técnica de PCR	29
4.2.2.1. Extração do DNA genômico	29
4.2.2.2. Identificação de <i>S. uberis</i> pela técnica de PCR	29
4.2.2.3. Detecção dos fatores de virulência de <i>S. uberis</i> pela técnica de PCR	29
4.2.2.4. Visualização dos produtos de PCR	30

4.2.3.	Testes de susceptibilidade a antimicrobianos	30
4.3.	RESULTADOS	30
4.3.1.	PCR realizadas em amostras de campo	30
4.3.2.	Testes de susceptibilidade a antimicrobianos	32
4.4.	DISCUSSÃO.....	33
4.5.	CONCLUSÃO	35
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	35
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

LISTA DE TABELA

Tabela 01	Distribuição das amostras de leite positivas para a presença de <i>S. uberis</i> , segundo a região de procedência, Contagens de Células Somáticas (CCS) e Contagem Bacteriana Total (CBT), Minas Gerais, 2009	25
-----------	--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Regiões do estado de Minas Gerais de origem das amostras analisadas	22
Figura 02	Produtos de PCR do espaço intergênico 16S-23S, com 330 pb, visualizados em gel de agarose 1%, identificando amostras de <i>S. uberis</i> a partir de amostras de leite procedentes de propriedades rurais (1 a 58) de diferentes regiões leiteiras de Minas Gerais, 2009. P: Padrão de peso molecular (DNA ladder 1Kb); +: controle positivo; 1 – 18: Amostras de leite; -: controle negativo.....	24
Figura 03	BLAST da sequência <i>Forward</i> do segmento de DNA amplificado no experimento, mostrando 100% de identidade com a sequência do espaço intergênico 16S-23S rRNA de <i>S. uberis</i> ATCC 19436.....	26
Figura 04	BLAST da sequência <i>Reverse</i> complementar do segmento de DNA amplificado no experimento, mostrando 100% de identidade com a sequência do espaço intergênico 16S-23S rRNA de <i>S. uberis</i> ATCC 19436	26
Figura 05	Produtos de PCR do gene <i>pauA</i> , com 800 pb, visualizados em gel de agarose 1% das amostras de <i>S. uberis</i> isoladas de casos de mastites na região da bacia leiteira do Sul de Minas Gerais. P: Padrão de peso molecular (DNA ladder 1Kb); 1: controle positivo; 2 – 29: amostras de campo de <i>S. uberis</i> ; 30: controle negativo	31
Figura 06	Produtos de PCR do gene <i>sua</i> , com 2700 pb, visualizados em gel de agarose a 1% das amostras de <i>S. uberis</i> isoladas de casos de mastites na região da bacia leiteira do Sul de Minas Gerais. P: Padrão de peso molecular (DNA ladder 1Kb); 1: controle positivo; 2 – 29: Amostras de campo de <i>S. uberis</i> ; 30: controle negativo	31
Figura 07	Teste de susceptibilidade a antimicrobianos por disco-difusão, em ágar Müller-Hinton-sangue, da amostra de referência. Antimicrobianos utilizados: Penicilina G, Cefalotina, Tetraciclina, Sulfametoxazol + Trimetoprim, Florfenicol, Gentamicina, Enrofloxacin e Lincomicina	32

LISTA DE GRÁFICO

Gráfico 01	Distribuição dos resultados dos testes de susceptibilidade frente aos antimicrobianos de amostras de <i>S. uberis</i> isoladas de casos de mastites em rebanhos bovinos da bacia leiteira do Sul de Minas Gerais	32
------------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

CCS	Contagem de Células Somáticas
CBT	Contagem Bacteriana Total
UFC	Unidade Formadora de Colônia
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PauA	<i>Plasminogen activator uberis A</i>
SUAM	<i>Streptococcus uberis Adhesion Molecule</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
pb	Pares de Base
dNTP	Desoxirribonucleotídeo Fosfatado

RESUMO

A mastite bovina é responsável pelas maiores perdas econômicas na pecuária leiteira brasileira, sendo o *Streptococcus uberis* um importante causador dessa enfermidade. Atualmente, o papel dos fatores de virulência desse agente na interação com o hospedeiro vem sendo alvo de pesquisas, no intuito do desenvolvimento de novas estratégias de prevenção e controle da mastite bovina. Tendo em vista a crescente importância do *S. uberis* na cadeia produtiva do leite no Brasil, neste trabalho foi feita a identificação de *S. uberis* em amostras de leite oriundas de rebanhos de várias regiões do estado de Minas Gerais, utilizando-se a técnica de PCR, com extração de DNA genômico diretamente do leite. Em 23 (9,2%) das 250 amostras de leite analisadas foi detectada a presença de *S. uberis*. Buscou-se ainda detectar a presença dos genes *pauA* e *sua*, que codificam respectivamente os fatores de virulência PauA e SUAM, em 28 amostras de *S. uberis* provenientes de diversos rebanhos bovinos da região sul de Minas Gerais. Estas foram submetidas também a testes de susceptibilidade frente a antimicrobianos. O gene *pauA* foi detectado em 22 (78,57%) das 28 amostras, já para o gene *sua*, 19 (67,86%) foram positivas. Quanto à susceptibilidade a antimicrobianos, todas as amostras mostraram-se sensíveis à Cefalotina e ao Florfenicol, porém encontrou-se um alto grau de resistência à Tetraciclina.

Palavras-Chave: mastite bovina, *Streptococcus uberis*, fatores de virulência.

ABSTRACT

Bovine mastitis causes the major economic losses in Brazilian dairy herds, and *Streptococcus uberis* is an important cause of this disease. Currently, the role of virulence factors of this pathogen in the interaction with the host has been the subject of research, in order to develop new strategies for prevention and control of bovine mastitis. Given the increasing importance of *S. uberis* in milk production chain in Brazil, in this work the identification of *S. uberis* was made in milk samples from Minas Gerais herds, using the PCR technique with the extraction of genomic DNA directly from milk. In 23 (9.2%) of 250 milk samples analyzed the presence of *S. uberis* was detected. The presence of genes *pauA* and *sua*, which respectively encode the virulence factors PauA and SUAM, was verified in 28 samples of *S. uberis* from different Minas Gerais southern region herds. These samples were also tested for antimicrobial susceptibility. *pauA* gene was detected in 22 (78.57%) of 28 samples, and the gene *sua* was found in 19 (67.86%) samples. All samples were sensitive to Cephalothin and Florfenicol, but a high degree of resistance to Tetracycline was found.

Keywords: bovine mastitis, *Streptococcus uberis*, virulence factors.

1. INTRODUÇÃO

A mastite (do grego *mastos*) ou mamite (do latim *mammae*) bovina é uma afecção da glândula mamária de grande importância na pecuária leiteira, responsável por grandes perdas econômicas relacionadas à queda de produção, perda de qualidade do leite e

derivados, descarte prematuro de animais acometidos e aumento dos custos com tratamento.

É uma doença complexa e multifatorial. Pode ter etiologia infecciosa ou não, mas o que se observa é que a maioria das afecções tem origem bacteriana, mais precisamente

devido à ação de apenas cinco diferentes microrganismos.

De acordo com a origem, os agentes etiológicos são classicamente divididos entre contagiosos e ambientais. Os contagiosos estão adaptados para sobreviver no organismo hospedeiro, particularmente no interior da glândula mamária, promovendo infecções subclínicas, o que provoca um aumento significativo nas Contagens de Células Somáticas (CCS) no leite. Sua disseminação entre os animais se dá, principalmente, após a ordenha. Já os agentes ambientais podem ser descritos como microrganismos oportunistas, pois não são adaptados para sobreviver no interior do hospedeiro. Tipicamente, eles invadem a glândula, se multiplicam e promovem uma resposta imune local, sendo rapidamente eliminados. Entretanto, há evidências de que esta divisão não é tão clara quanto se propunha, pois microrganismos ambientais têm desenvolvido mecanismos de persistência no interior da glândula mamária.

Historicamente, as mastites contagiosas representam a maior porcentagem dos casos e são responsáveis pela maioria das perdas econômicas causadas pela doença. Observa-se, no entanto, uma mudança nesse cenário em rebanhos altamente tecnificados que conseguiram alcançar baixas CCS no leite. Nestes, com a implantação de rigorosos programas de controle de mastites, conseguiu-se reduzir a incidência de agentes contagiosos, porém, as mastites ambientais passaram a se constituir em grave problema.

Entre os microrganismos ambientais, destaca-se o *Streptococcus uberis*, responsável por grande parte das mastites clínicas mundialmente. Pesquisas vêm sendo realizadas no intuito de compreender melhor os mecanismos de interação entre este microrganismo e o hospedeiro, assim como a realização de estudos

epidemiológicos, com ênfase na distribuição destes microrganismos e de seus fatores de virulência entre os rebanhos bovinos e, desta forma, contribuir para o desenvolvimento de medidas adicionais de controle, particularmente o desenvolvimento de vacinas para prevenir infecções intramamárias devidas a esta bactéria.

Para os estudos epidemiológicos, especialmente aqueles voltados para a epidemiologia molecular, diferentes ferramentas são recomendadas, entre elas a utilização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), para um diagnóstico mais preciso e rápido e que possibilite a identificação do *S. uberis*, assim como a detecção de genes responsáveis pelos fatores de virulência desta bactéria.

Neste contexto, este trabalho visou avaliar a frequência de *S. uberis* em amostras de leite procedentes de diferentes regiões leiteiras do estado de Minas Gerais, a presença de fatores de virulência descritos na literatura como promissores candidatos como imunógenos em cepas deste patógeno isoladas a partir de casos de mastites, e determinar sua sensibilidade a antimicrobianos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. MASTITE

2.1.1. Importância

A mastite é uma doença de grande relevância no cenário da produção leiteira, sendo ainda a maior responsável por perdas econômicas no setor (Phuektes et al., 2001a; Talbot e Lacasse, 2005). Os prejuízos acometem tanto produtores quanto a indústria leiteira, girando em torno da redução da produção, perda de qualidade do leite e derivados, descarte prematuro de animais com infecção crônica e custos com

tratamento (Dias, 2007), o que pode corresponder a mais de 25% de todas as perdas econômicas relacionadas às doenças do gado leiteiro (Santos, 2004). Philpott (1984) demonstrou uma correlação inversa entre CCS acima de 200 000 células/mL e produção de leite: a cada 100 000 células/mL acima desse valor, ocorreria uma queda na produção de 2,5%.

Segundo Schrick et al. (2001) e Ahmadzadeh et al. (2009), mastites subclínicas e clínicas interferem também na eficiência reprodutiva dos rebanhos afetados, na medida em que uma grande proporção dos animais com infecção intramamária permanece não prenhe ao longo do tempo.

A mastite compromete também a qualidade do leite. Mesmo sem haver alterações visíveis, o leite proveniente de uma glândula com processo inflamatório devido à mastite apresenta-se com sua composição e pH alterados. Observa-se uma diminuição do teor de lactose, caseína, gordura, cálcio e fósforo e um aumento da CCS, imunoglobulinas, cloretos e enzimas, tornando o produto inadequado para o consumo e com risco de rejeição na plataforma da usina de beneficiamento (Costa, 1998).

No Brasil, embora não haja dados concretos a respeito do valor perdido com a doença, acredita-se que, devido à sua alta prevalência, os prejuízos acarretados à pecuária sejam grandes. Estima-se que 20% dos quartos de todos os animais apresentem infecção subclínica, e que cada quarto infectado produz, em média, 35% a menos que um quarto normal, gerando uma perda total de 2,8 bilhões de litros de leite por ano (Ristow et al., 2006). Costa et al. (1999) estimaram que os prejuízos por mastite subclínica em propriedades de Minas Gerais e São Paulo corresponderam em média a 332,20 dólares por vaca/ano.

A importância das infecções intramamárias vai além dos prejuízos econômicos. O uso de antimicrobianos no tratamento ou controle de mastites pode oferecer riscos à saúde pública, na medida em que há a possibilidade de surgirem cepas bacterianas resistentes, que podem adentrar na cadeia alimentar (White e McDermott, 2001). O perigo de transmissão de zoonoses pelo leite existe quando ocorrem falhas no processo de pasteurização ou mesmo no mercado de produtos lácteos artesanais, não pasteurizados.

2.1.2. Caracterização da doença

Mastite é definida como sendo uma inflamação da glândula mamária, podendo ter origem infecciosa ou não. Traumas, injúrias químicas ou infecções por microrganismos podem originar inflamações da glândula mamária, mas o que se observa é a predominância de mastites originadas por bactérias. Watts (1988) identificou 137 diferentes microrganismos responsáveis pela origem de infecções intramamárias, no entanto, cinco bactérias são atualmente responsáveis pela maior parte dos casos observados: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* e *Escherichia coli*.

Staphylococcus aureus e *Streptococcus agalactiae*, os principais agentes das mastites contagiosas, são transmitidos entre animais após a ordenha. Estes microrganismos são adaptados para permanecer no interior da glândula mamária, provocando mastites subclínicas. Estas infecções são caracterizadas pela ausência de anormalidades visíveis no leite e na glândula mamária, porém, observa-se um aumento na CCS e alterações na composição do leite. (Bradley, 2002). Em contrapartida, *S. uberis*, *S. dysgalactiae* e *E. coli* são os microrganismos mais frequentemente encontrados nas mastites ambientais. São transmitidos

principalmente no intervalo entre ordenhas, assim como durante a ordenha. A fonte de infecção principal é o ambiente; estes microrganismos estão presentes principalmente nas fezes, cama e solo (Leigh, 1999; Riffon et al., 2001; Silva, 2003; Santos, 2004). Ocasionalmente ocasionam infecções clínicas, caracterizadas por sinais evidentes de inflamação, como edema, aumento na temperatura e dor na glândula mamária, além de alterações visíveis no leite. Em casos mais severos, pode haver sinais sistêmicos, como elevação da temperatura, perda de apetite, ou mesmo septicemia e morte do animal.

O diagnóstico da mastite clínica é bastante simples, visto que o teto acometido apresenta sinais evidentes de inflamação, além de poderem ser vistas alterações no leite. Nas infecções subclínicas, embora não haja sinais clínicos evidentes, o aumento da CCS, que ocorre devido ao grande aporte de células de defesa, pode ser detectado através de um teste simples e de uso bastante disseminado, o CMT (California Mastitis Test) (Dias, 2007).

A caracterização do *S. uberis* classicamente é feita através da morfologia de colônias e testes bioquímicos, porém muitas amostras não são corretamente identificadas. Assim, técnicas moleculares são vantajosas em relação às tradicionais, visto que há uma maior acurácia dos resultados, e ainda não há o risco da influência da subjetividade na leitura dos resultados de alguns testes bioquímicos (Leigh, 1999). A análise da literatura revela que o diagnóstico etiológico da mastite bovina é feito somente até o gênero *Streptococcus*, não sendo feita a diferenciação das espécies de estreptococos (Santos et al., 2007).

Na literatura, encontram-se vários trabalhos nos quais se utilizaram a PCR e suas variantes para detecção, identificação e estudos epidemiológicos de diferentes

microrganismos, dentre elas a PCR multiplex (Phuektes et al., 2001b; Pérez-Roth et al., 2001; Tamarapu et al., 2001; Ramesh et al., 2002; Cremonesi et al., 2005).

Segundo Silva (2008), a PCR multiplex é um teste rápido, sensível e específico, e relativamente pouco oneroso, capaz de detectar simultaneamente os principais agentes etiológicos desta afecção e diferenciar as espécies de estreptococos envolvidas.

2.1.3. Epidemiologia

Na mastite ambiental, a fonte de infecção do agente etiológico é o ambiente; ele invade a glândula mamária quando seu esfíncter se encontra aberto, isto é, durante ou nos intervalos entre as ordenhas, ou depois de algum dano ao teto. Ocorre uma rápida multiplicação bacteriana e o organismo do animal reage através de uma resposta inflamatória local. A intensidade da enfermidade é influenciada pela velocidade de aporte ao úbere de células do sistema imune, particularmente neutrófilos polimorfonucleares. O controle se baseia na tentativa de diminuir o desafio bacteriano durante a lactação e período periparto, além da manutenção de práticas de higiene durante e após a ordenha (Hillerton e Berry, 2003).

A questão é que alterações no manejo têm sido eficazes na redução de mastites contagiosas, porém pouco impacto tem sido observado sobre infecções ambientais.

Países em cujos rebanhos se adotou o plano de cinco princípios básicos de controle da mastite vêm obtendo, ao longo do tempo, sucesso na redução da incidência e da duração das infecções intramamárias de origem contagiosa. Entretanto, neste mesmo período, tem sido observado um aumento da incidência de mastites ambientais (Bradley, 2002).

Hogan et al. (1989) estudaram o perfil de mastites em rebanhos com infecções contagiosas controladas, selecionados através de baixa CCS, e seus resultados apontaram os microrganismos ambientais (*Streptococcus* que não *agalactiae* e coliformes) como sendo responsáveis por mais de 80% dos casos de mastites clínicas.

Dados recentes do *Veterinary Investigation Surveillance Report 2008 (Yearly Trends 2001 - 2008, 2008)*, compilados pelo *Veterinary Laboratories Agency*, permitem estimar um perfil dos patógenos responsáveis por mastites no Reino Unido. *S. uberis* e *E. coli* foram confirmados como os responsáveis pela maioria dos casos de mastites clínicas. Em 2008, *S. uberis* foi o responsável pelo maior número de casos deste tipo de infecção intramamária. Embora estes dados não reflitam o real panorama da situação da enfermidade no campo, as amostras analisadas pelo laboratório citado tendem a ser oriundas de animais e rebanhos problemáticos, confirmando a importância do *S. uberis* como causador de problemas no rebanho.

No entanto, uma CCS muito baixa aparenta ser um fator de risco para o desenvolvimento de mastites clínicas. Suriyasathaporn et al. (2000) acompanharam um rebanho cuja CCS se encontrava abaixo de 200 000 células/mL, e concluíram que vacas com CCS mais baixas eram as mais predispostas a sucumbirem a infecções clínicas.

Uma contagem de células somáticas individual extremamente baixa se torna indesejável, na medida em que neste caso parece ocorrer uma resposta imune inadequada. Assim sendo, não se sabe ainda se é economicamente interessante manter um rebanho com CCS em níveis muito baixos. No entanto, a afirmação de que a CCS extremamente baixa deixa o animal mais susceptível a mastites clínicas deve ser feita cautelosamente. É provável que não

apenas o número de células presentes no leite, mas também o seu tipo e a velocidade de seu recrutamento para o úbere, e outros fatores, tenham papel neste aspecto (Schukken et al., 2001).

2.1.4. Prevenção e controle

O controle da mastite nos rebanhos leiteiros é importante para a produção de um leite de boa qualidade, diminuição de prejuízos ao produtor e de riscos à saúde do consumidor.

De acordo com Dias (2007), dentro de um programa de controle, cinco pontos devem ser priorizados: 1. Realização de pré e pós *dipping*, ou seja, imersão dos tetos de todos os animais antes e após a ordenha; 2. Manutenção e correta utilização dos equipamentos de ordenha; 3. Descarte de animais que apresentem mastite crônica ou mais de três casos clínicos na mesma lactação; 4. Rápida identificação e tratamento de animais com doença clínic; 5. Adoção da terapia de vacas secas em todo o rebanho. O objetivo deste tipo de programa é diminuir a prevalência de mastites através da redução da incidência, da duração e da probabilidade de transmissão de agentes patogênicos entre os animais (Leigh, 1999). A conscientização dos produtores em relação às perdas relacionadas às infecções intramamárias e dos benefícios trazidos pela adoção de medidas de controle no rebanho, assim como a educação sanitária de tratadores e ordenhadores é essencial para o sucesso dessas medidas (Rupp et al., 2000).

Observa-se, na prática, ser mais fácil prevenir e controlar as mastites contagiosas do que as ambientais, e a ocorrência das infecções ambientais é frequentemente relacionada a rebanhos bem manejados e com baixa CCS.

O tratamento indiscriminado de mastites sem o conhecimento prévio da susceptibilidade dos patógenos frente aos

antimicrobianos traz complicações nos programas de controle. A ocorrência de resistência antimicrobiana tem sido relatada (Hendriksen et al., 2008).

Atualmente, têm-se buscado privilegiar a prevenção em detrimento do tratamento para o controle da mastite (Pyörälä, 2002). Medidas preventivas, como a vacinação, serão essenciais para reduzir as perdas econômicas e minimizar o uso de agentes antimicrobianos no tratamento de infecções intramamárias (Luther et al., 2008).

2.1.5. Uso de antimicrobianos

O uso de antimicrobianos em vacas leiteiras se dá principalmente devido a mastites. Este procedimento é recomendado somente em casos de mastite clínica ou quando *S. agalactiae* é o responsável pelo problema no rebanho, visto que o tratamento contra os outros agentes etiológicos da mastite durante a lactação possui baixas taxas de cura. O tratamento de infecções intramamárias é também a causa mais comum de resíduos de antimicrobianos no leite (Erskine et al., 2004).

O período seco é uma necessidade fisiológica da vaca leiteira e apresenta relação direta entre a produção de leite e a saúde da glândula mamária, visto que é nesta fase que se encontram as maiores taxas de novas infecções intramamárias. Alguns fatores inerentes a esta fase, como o acúmulo de secreção que não é removida, a descontinuidade de desinfecção dos tetos e diminuição da atividade fagocítica dos leucócitos, favorecem a instalação de novas infecções.

O uso estratégico de antimicrobianos no período seco e no final da lactação é um importante componente dos programas de controle de mastite (Philpot & Nickerson, 2002). O objetivo da terapia de vacas secas é eliminar infecções subclínicas preexistentes e proteger os quartos nas

semanas após a secagem; este procedimento reduz a taxa de novas infecções intramamárias causadas por estreptococos ambientais no início do período seco, o que é importante visto que 55% dessas infecções permanecem durante a lactação (Todhunter et al., 1995). Desta forma, o nível de mastites no parto é reduzido, assim como a CCS, e há um aumento na produção de leite nos quartos curados. É ainda no período seco que ocorrem as maiores taxas de cura e podem ser utilizadas maiores concentrações de medicamentos, evitando assim resíduos de antibióticos no leite.

Nos rebanhos com mastites contagiosas controladas, a adoção da terapia de vacas secas é importante para a manutenção de baixas taxas de novas infecções no período seco, principalmente as causadas por microrganismos ambientais (Fonseca e Santos, 2000).

Berry e Hillerton (2002) analisaram o efeito da terapia de vacas secas sobre novas infecções intramamárias, em quatro rebanhos leiteiros. Nenhum caso de mastite clínica foi observado nas vacas tratadas durante o período seco, enquanto 14 casos foram observados nos animais não tratados, sendo esta uma diferença significativa na incidência de mastite clínica. Todos os casos relatados durante esse período foram causados por *S. uberis*. Pode-se concluir que a adoção da terapia de vacas secas contribuiu para a diminuição da taxa de novas infecções intramamárias durante o período seco.

A seleção do antimicrobiano mais específico para cada propriedade pode ser baseada no histórico de ação de cada medicamento na fazenda (Santos, 2004), porém deve-se realizar testes de sensibilidade a cada 4 a 6 meses em alguns animais do rebanho que apresentem infecção intramamária, com o objetivo de avaliar as melhores opções de drogas do mercado (Fonseca e Santos, 2000).

Para a obtenção de um maior sucesso no tratamento das infecções intramamárias, é interessante que seja feita a determinação dos padrões de susceptibilidade frente aos antimicrobianos dos microrganismos isolados de casos de mastite. Pode-se, assim, elaborar um programa de prevenção e controle à infecção intramamária mais racional, além de permitir determinar o impacto do uso de antimicrobianos na indução de resistência bacteriana (Denamiel et al., 2005).

Antibióticos beta-lactâmicos, como a penicilina, são usados constantemente na terapia de infecções intramamárias em bovinos. Apesar de alguns trabalhos relatarem certa resistência a estes antibióticos em alguns isolados, eles continuam sendo o medicamento de escolha no tratamento ou prevenção de mastites causadas por estreptococos (Guérin-Faubleé et al., 2002; Ruoff et al., 2003). As penicilinas são antibióticos bactericidas que atuam na parede celular bacteriana; não se distribuem bem na glândula mamária sadia, porém atingem concentrações maiores quando ela está inflamada, devido ao aumento do pH local (Costa, 2002).

A associação de sulfametoxazol com trimetoprim foi utilizada por muito tempo nos tratamentos de mastites, porém atualmente existem medicamentos mais eficazes contra uma maior variedade de agentes etiológicos (Costa, 2002).

Enrofloxacina, cefalotina e florfenicol são antibióticos com crescente uso nos tratamentos de mastites, e têm apresentado baixa porcentagem de resistência pelos microrganismos causadores da enfermidade (Giannechini et al., 2002; Santos, 2004). Em contrapartida, uma alta porcentagem de amostras tem se mostrado resistente às lincosamidas, como a lincomicina, em diversos trabalhos (Guérin-Faubleé et al., 2002; Petinaki et al., 2008).

Owens et al. (1990) e Brown e Scasserra (1990) verificaram que a tetraciclina foi pouco efetiva contra amostras de *S. uberis* analisadas por eles. Em outro estudo, Vachée et al. (2008) encontraram 68% de amostras de *S. uberis* sensíveis a esse antibiótico.

Rossito et al. (2002) analisaram 133 amostras de *S. uberis* isoladas de vacas com mastite na Califórnia, EUA, e encontraram uma alta porcentagem de microrganismos sensíveis à cefalotina, ao passo que para penicilina e tetraciclina, apenas 50,4% e 27,1% se mostraram sensíveis, respectivamente.

Já o estudo de Giannechini et al. (2002) reportou 100% de sensibilidade de *S. uberis* isolados de animais com mastite de rebanhos do Uruguai, frente à penicilina G, cefalotina e tetraciclina. No entanto, apenas 12% das amostras foram sensíveis à gentamicina.

A susceptibilidade *in vitro* a antimicrobianos foi determinada por Santos (2004) em amostras de *S. uberis* oriundas de vacas com infecção intramamária de rebanhos de Minas Gerais e Rio de Janeiro. Os resultados apontaram que 80% das amostras se mostraram sensíveis à cefalotina, mas apenas 44% à penicilina e 8% à gentamicina.

2.2. *Streptococcus uberis*

Streptococcus uberis é um importante agente etiológico da mastite no gado leiteiro, principalmente durante o período seco, periparto e início de lactação. Atualmente é um dos principais agentes relacionados às infecções intramamárias em todos os continentes (Bradley et al., 2007).

A importância relativa do microrganismo como causador de infecções intramamárias varia entre diferentes países. É descrito como sendo a espécie predominante entre

os *Streptococcus* em regiões do Reino Unido (Bradley et al., 2007; Yearly Trends 2001 - 2008, 2008) e Nova Zelândia (McDougall, 2003), por exemplo, enquanto no Brasil sua ocorrência é menos expressiva (Brito et al., 1999; Santos, 2004; Costa, 2008).

Brito et al. (1999) realizaram exames microbiológicos de 6315 amostras de leite, originadas de 48 rebanhos localizados em Minas Gerais, e encontraram 4,0% de *Streptococcus* sp. esculina positivos, entre os quais está o *S. uberis*.

Em Alta Mogiana, São Paulo, Nader Filho et al. (2004) isolaram, de 200 casos clínicos de mastite em vacas lactantes, *Streptococcus* spp. em 18,5% dos casos.

Santos (2004) analisou amostras de leite mastítico de rebanhos dos estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro, com o objetivo de verificar quais espécies de estreptococos estão envolvidos na etiologia de mastite bovina. Em 68,7% das amostras, identificou a presença de *Streptococcus* spp., sendo 15,4% destes *S. uberis*.

Em estudo de Mota et al. (2004), realizado em Pernambuco, de 294 amostras provenientes de animais com mastite subclínica, 240 (81,63%) foram positivas ao exame microbiológico; destas, os principais agentes isolados foram: *Staphylococcus* spp. (52,16%, sendo 11,6% *S. aureus*), *Streptococcus* spp. (15,11%) e *Corynebacterium* spp. (13,31%). Freitas et al. (2005), também em Pernambuco, isolaram, de 477 vacas com mastite, 13,6% de *S. aureus* e 3,8% se *Streptococcus* spp.

Costa (2008) encontrou, em trinta e cinco rebanhos leiteiros da região Sul de Minas Gerais, *S. uberis* responsável por 6,52% dos casos de mastite bovina.

Em diversos países, *S. uberis* assume uma importância maior, visto que é isolado com

maior frequência. Na Nova Zelândia, a maior parte de mastites clínicas é devida a bactérias Gram positivas, particularmente *S. uberis* (McDougall, 2003). No Reino Unido, o microrganismo é responsável por 33% dos casos de mastite clínica (Santos et al., 2007) e na Dinamarca por 23% de todos os casos de mastite (Segura e Gottschalk, 2004).

O reservatório mais importante do *S. uberis* é a própria pele do animal, mas o microrganismo é encontrado também em numerosos outros locais, como trato urogenital, tonsilas, rúmen e fezes, além do solo e ambiente (Leigh, 1999; Dogan & Boor, 2004). Em sistemas de criação à base de confinamento, uma alta incidência de mastites por *S. uberis* vem sendo relacionada ao uso de material orgânico em camas, como a palha (Ward et al., 2002). Sua sobrevivência no ambiente é limitada, menor que quatro semanas (Lopez-Benavides et al., 2007); assim sendo, sua persistência no ambiente se deve à constante reintrodução, provavelmente via contaminação fecal (Ward et al., 2009).

Diversos estudos sugerem dificuldades em classificar o *S. uberis* como agente estritamente ambiental ou contagioso (Leigh, 1999; Phuektes et al., 2001a; Pullinger et al.; 2007, Zadoks, 2007).

Este microrganismo, tradicionalmente classificado como um agente ambiental, é encontrado em diversos locais do ambiente, e sua transmissão se dá principalmente no intervalo entre ordenhas. Além disso, infecções intramamárias causadas por *S. uberis* são comuns em vacas secas e podem ocorrer também em novilhas, antes do primeiro parto (Todhunter et al., 1995), indicando que não resultam de transmissão entre animais durante a ordenha.

A epidemiologia molecular de *S. uberis* relacionados a mastites em vacas leiteiras revela que uma grande variedade de cepas é

encontrada dentro de um rebanho, indicando que o ambiente provavelmente é a fonte de infecção. Trabalhos de Douglas et al. (2000) e McDougall et al. (2004) encontraram, em rebanhos da Nova Zelândia, quase a mesma quantidade de variedades de cepas quanto o número de amostras isoladas, utilizando a técnica de eletroforese de campo pulsado.

Outros trabalhos, no entanto, mostram haver certa homogeneidade entre as cepas presentes em alguns rebanhos, revelando uma possível rota contagiosa de infecção ou adaptação do microrganismo ao hospedeiro. Em um rebanho na Austrália, cepas idênticas foram isoladas de diferentes quartos de uma mesma vaca e, ainda, entre diferentes animais, o que sugere que houve transmissão entre os quartos e entre os animais (Phuektes et al., 2001a). Pullinger et al. (2007) analisaram amostras de *S. uberis* de um rebanho no Reino Unido associadas a casos de infecções intramamárias de longa e curta duração. A maioria das mastites crônicas, que duraram de 50 a 260 dias, foi devida à contínua infecção da glândula mamária pelo mesmo tipo de cepa. Por outro lado, em três de cinco rebanhos estudados na Califórnia, EUA (Cullor, 2006, citado por Zadoks, 2007), verificou-se que muitos animais apresentaram mastite causada pela mesma cepa de *S. uberis*, no entanto estas cepas não foram encontradas na cama, indicando também transmissão do microrganismo de vaca para vaca.

Atualmente, trabalha-se com a hipótese de que existem cepas de *S. uberis* adaptadas e não adaptadas ao hospedeiro. As cepas adaptadas causam mastites subclínicas crônicas, possivelmente através de um mecanismo de aderência às células epiteliais da glândula mamária e subsequente internalização, permanecendo viáveis dentro destas células. Esta cronicidade da infecção permite que a bactéria seja disseminada entre as vacas em

lactação, promovendo uma rota contagiosa de infecção e a existência de cepas predominantes do microrganismo em um rebanho. As cepas não adaptadas ao hospedeiro, que possuem o ambiente como fonte de infecção, provocam uma intensa resposta imune, resultando na maioria das vezes em mastite clínica, e podem atingir tanto animais lactantes quanto vacas secas, assim como novilhas. Estas infecções no geral são de curta duração, pois o sistema imune é capaz de eliminar estes microrganismos, mesmo sem a ação concomitante de antimicrobianos. Mastites clínicas frequentes e de curta duração, atingindo principalmente vacas no período próximo ao parto, e a presença de cepas heterogêneas, caracterizam rebanhos acometidos por cepas de *S. uberis* com rota ambiental de infecção (Zadoks, 2007).

O Programa Padrão de Prevenção e Controle de Mastites – programa de cinco pontos de controle – é eficiente contra a forma contagiosa de transmissão de *S. uberis*, porém tem pouco efeito sobre as cepas ambientais. O controle deste tipo de infecção requer a higienização do ambiente, assim como a limpeza e desinfecção dos tetos no momento da ordenha. A prática da terapia de vacas secas, ainda não usual no Brasil, e o uso de selantes internos de tetos contribuem para a redução do risco de novas infecções e de mastites clínicas (Dias, 2007).

2.2.1. Fatores de virulência

Mecanismos relacionados à evasão do sistema imune, ao seu rápido crescimento, à aderência às células epiteliais e à colonização da glândula mamária conferem vantagens à bactéria quanto ao estabelecimento de uma infecção intramamária. Vários potenciais fatores de virulência foram identificados em *S. uberis*, incluindo cápsula de ácido hialurônico, hialuronidase, fator Uberis, PauA (*plasminogen activator uberis A*) e SUAM

(*S. uberis* *adhesion molecule*), sendo alguns deles associados à célula e outros extracelulares. A cápsula de ácido hialurônico é um mecanismo de escape ao sistema imune do hospedeiro, conferindo ao microrganismo capacidade de resistir à fagocitose pelos neutrófilos. Cogita-se a possibilidade de a hialuronidase estar envolvida na disseminação da bactéria através das barreiras de tecido conjuntivo do organismo, agindo sobre o ácido hialurônico do hospedeiro, porém não há claras evidências desta ação (Leigh, 1999). O fator Uberis é uma molécula semelhante ao fator CAMP produzido por estreptococos do grupo B (*S. agalactiae*), uma co-hemolisina que possui a habilidade de se ligar à fração Fc das imunoglobulinas (Jiang et al., 1996), porém o gene que codifica esta proteína é encontrado em apenas um pequeno número de amostras (Khan et al., 2003).

A ativação do plasminogênio pelo *S. uberis* tem sido proposta como um importante mecanismo de obtenção de nutrientes pela bactéria. *In vitro*, o principal ativador de plasminogênio deste microrganismo, a proteína PauA, é responsável por converter o plasminogênio em plasmina, que hidrolisa a caseína presente no leite, disponibilizando assim nutrientes necessários para um crescimento ótimo do *S. uberis* (Rosey et al., 1999).

A capacidade de algumas cepas de *S. uberis* de aderir, invadir e permanecer viáveis dentro das células epiteliais da glândula mamária é considerada atualmente um importante fator no estabelecimento de infecções intramamárias persistentes. Este mecanismo é mediado, *in vitro*, pela SUAM, que através da adesão à lactoferrina, cria uma espécie de ponte molecular entre o *S. uberis* e a célula epitelial da glândula mamária, facilitando a sua adesão e internalização (Patel et al., 2009). Após invadir a célula, o *S. uberis* consegue permanecer viável por vários dias

sem comprometer a viabilidade celular, escapando assim do sistema imune do hospedeiro (Zadoks et al., 2007).

Embora haja uma reconhecida importância dos microrganismos ambientais como causadores de mastite, os fatores de virulência desses agentes e o papel que eles exercem na interação da bactéria com o hospedeiro ainda não são completamente esclarecidos. A compreensão dos mecanismos relacionados com a patogênese do *S. uberis* é essencial no desenvolvimento de novas estratégias de combate ao microrganismo. Esforços têm sido empregados para a elucidação desses mecanismos e para o desenvolvimento de vacinas, que tendem atualmente a ser um componente importante de programas de controle da mastite bovina (Leigh, 1999; Luther et al., 2008). PauA e SUAM são duas moléculas bastante estudadas na atualidade, com a finalidade de se conhecer seu potencial para a imunoprofilaxia das infecções intramamárias ocasionadas por *S. uberis*.

2.2.1.1. PauA

Os estreptococos são bactérias nutricionalmente fastidiosas e auxotróficas para alguns aminoácidos. Em estudo de Kitt e Leigh (1997), 12 amostras de *S. uberis* necessitaram de 10 a 13 aminoácidos para crescer em meio quimicamente definido, sendo que oito aminoácidos foram requeridos por todas as amostras. O crescimento do microrganismo é então facilitado pela sua habilidade em clivar proteínas presentes no meio. *S. uberis* não possui a capacidade de hidrolisar proteínas diretamente, mas o consegue através da secreção de ativadores de plasminogênio. O principal deles é o *plasminogen activator uberis* (PauA), uma proteína extracelular de aproximadamente 30 kDa, codificada pelo gene *pauA*, capaz de ativar o plasminogênio presente no leite em plasmina (Rosey et al., 1999). A plasmina

cliva a caseína, disponibilizando nutrientes necessários ao crescimento bacteriano. No estudo de Kitt e Leigh, (1997), na ausência de alguns aminoácidos essenciais, o crescimento de *S. uberis* pôde ser restabelecido, *in vitro*, através da adição de caseína hidrolisada pela plasmina, demonstrando que a aquisição de nutrientes pode ser feita por essa via.

O *S. uberis* possui ainda a capacidade de aderir a plasmina à sua superfície. Esta protease aderida à superfície celular, além de ser mais resistente aos efeitos inibitórios de moléculas como a α_2 antiplasmina, permite a disponibilização de peptídeos próxima à superfície bacteriana, facilitando a sua obtenção (Lincoln e Leigh, 1998).

Khan et al. (2003) encontraram o gene *pauA* em 128 de 130 amostras de *S. uberis* isolados de vacas com mastite em rebanhos da Alemanha. Ward e Leigh (2004) afirmam que ativadores de plasminogênio são universalmente distribuídos entre *S. uberis*. Em sua pesquisa, localizaram o gene *pauA* em todas as 20 amostras do microrganismo oriundas de rebanhos da Dinamarca. Segundo estes autores, a alta prevalência da proteína PauA em amostras isoladas do campo de *S. uberis* indica que a presença de ativadores de plasminogênio confere à bactéria vantagens em relação à colonização e crescimento.

Infecções intramamárias causadas por *S. uberis* não são adequadamente controladas pelos métodos tradicionais preconizados para o controle da mastite. A utilização de vacinas seria um grande trunfo na prevenção de mastites ambientais (Zadoks, 2007).

O desenvolvimento de uma vacina contra mastite bovina que seja capaz de induzir uma resposta imune efetiva sem, contudo, um grande aporte de neutrófilos à glândula mamária, vem sendo alvo de muitas pesquisas. Neste contexto, propõe-se que a

restrição do crescimento da bactéria minimiza o estímulo inflamatório provocado e o influxo de neutrófilos para a glândula mamária, conseqüentemente há uma redução nos danos teciduais e a manutenção de uma maior qualidade do leite.

A ideia de utilização da proteína PauA como imunógeno baseia-se na privação de nutrientes à bactéria através da inativação desta proteína. Trabalho desenvolvido por Leigh et al. (1999) demonstrou que um filtrado concentrado de cultura contendo a PauA pode ser efetivo como uma vacina contra *S. uberis*. A imunização de animais com este filtrado conferiu uma proteção relacionada à produção de anticorpos anti-PauA, enquanto outro grupo de animais imunizados com o filtrado cuja proteína foi previamente removida não obteve nenhum grau de proteção.

2.2.1.2. SUAM

A habilidade de aderir, internalizar e persistir no interior das células do hospedeiro é uma importante estratégia de sobrevivência e virulência de patógenos. Fang et al. (2000) afirmam que a ligação à lactoferrina bovina pelo *S. uberis* permite a aderência e internalização da bactéria às células epiteliais, um importante evento no início da colonização da glândula mamária.

A lactoferrina, uma proteína encontrada no leite e em secreções da glândula mamária seca, secretada basicamente pelas células epiteliais, tem uma atividade bacteriostática amplamente reconhecida, pela sua capacidade de se ligar ao ferro e conseqüentemente tornar este elemento indisponível para as bactérias. Entretanto, foi observado pouco efeito desta proteína sobre o crescimento *in vitro* de *S. uberis*, aparentemente pelo baixo requerimento de ferro por estreptococos associados à mastite bovina (Breau e Oliver, 1986).

Uma molécula de superfície do *S. uberis*, SUAM (*S. uberis* adhesion molecule), foi identificada recentemente (Almeida et al., 2006), e mostrou ter afinidade pela lactoferrina. Aparece ser uma molécula amplamente distribuída, tendo sido encontrada em todas as amostras analisadas por Luther et al. (2008).

Patel et al. (2009) confirmaram, *in vitro*, que a lactoferrina atua como uma ponte molecular entre a SUAM e um receptor da célula epitelial da glândula mamária bovina, favorecendo a aderência e internalização do *S. uberis* nas células epiteliais. Neste trabalho, o papel da lactoferrina foi demonstrado através da cultura de células epiteliais bovinas e *S. uberis* na presença desta proteína, onde os autores observaram um aumento significativo da internalização da bactéria, ao passo que quando a monocamada celular é pré-tratada com anticorpos anti-lactoferrina, ocorre uma diminuição deste evento. A utilização de anticorpos anti-SUAM neste mesmo tipo de cultura resultou num decréscimo nas internalizações, demonstrando a importância da SUAM na adesão e internalização do *S. uberis* *in vitro*. Adicionalmente, procurou-se detectar a presença de receptores de lactoferrina na superfície das células epiteliais e da célula bacteriana, através de microscopia eletrônica de transmissão e microscopia eletrônica de varredura. Para isso foram utilizadas culturas de célula epitelial bovina e *S. uberis* acrescidas de lactoferrina biotinilada. A presença desta lactoferrina foi observada nas superfícies do *S. uberis* e das células epiteliais, e também entre ambas as superfícies, confirmando a presença destes receptores. Estes resultados demonstram que, *in vitro*, a lactoferrina, ao se ligar à adesina de superfície do *S. uberis* (SUAM) e ao receptor da célula epitelial da glândula mamária, atua como uma ponte para facilitar a aderência e internalização do microrganismo. Este mecanismo de ponte molecular parece promover não somente

uma vantagem no que confere à internalização da bactéria, mas também uma forma de mascarar epítomos, protegendo o microrganismo dos fagócitos.

Sendo uma molécula de ampla distribuição e verificando-se seu papel na patogenia do *S. uberis*, SUAM é um importante fator de virulência e considerada uma potencial candidata a imunógeno a ser usado visando a um controle mais efetivo de mastites bovinas devidas ao *S. uberis*, através do uso de vacinas (Luther et al., 2008).

2.3. CENÁRIO ATUAL

Dos sistemas agro-industriais brasileiros, um dos mais importantes é o do leite, pela sua importância econômica e social para o país. Apesar de vários avanços terem ocorrido quanto à prevenção e controle da mastite bovina, esta permanece sendo a doença infecciosa mais onerosa à indústria leiteira, desde a produção do leite até a indústria de laticínios. São estimadas perdas anuais à indústria leiteira mundial em torno de 35 bilhões de dólares (Bradley, 2002). No Brasil, cerca de 10 – 15% da produção anual de leite são perdidos devido à mastite, o que representa de dois a três bilhões de litros por ano (Costa, 1998).

De acordo com o IBGE, em 2008 o estado de Minas Gerais contou com uma produção anual de leite de vaca em torno de 7,6 bilhões de litros. Segundo estudo de Costa et al. (1999) em propriedades de Minas Gerais e São Paulo, aproximadamente US\$ 23,98 foram gastos com prevenção à mastite por vaca/ ano, e o prejuízo relacionado à doença foi estimado em US\$ 317,38 por vaca/ ano. Sendo Minas Gerais o maior produtor leiteiro do país, as perdas econômicas relacionadas às infecções intramamárias são bastante significativas para o estado.

Atualmente, o que se observa nos rebanhos brasileiros é um lento progresso no controle da mastite, visto que o que é aplicado na

prática como programa de controle é exclusivamente o tratamento de vacas acometidas pela doença clínica (Costa, 2008). Assim, no país ainda há uma predominância da incidência de mastites causadas por agentes infecciosos com uma rota contagiosa de infecção, contrastando com rebanhos altamente tecnificados e de países desenvolvidos que implantaram rigorosos programas de controle.

O setor leiteiro, porém, vem atravessando um período de evolução, enfrentando mudanças devido à nova legislação para os padrões de qualidade do leite no país (Brasil, 2002), ao aumento nas exigências de qualidade do leite por parte das indústrias e à diferenciação do pagamento ao produtor com base na qualidade (Prata, 2001). As exigências quanto à contagem de células somáticas do leite produzido têm se intensificado; a meta para as regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste é de até 400 000 células somáticas/mL, a partir de Julho de 2011 (Brasil, 2002).

Para a adequação dos produtores a esse novo cenário, a tendência é que haja investimentos em prevenção e controle da mastite, para que seja produzido um leite de melhor qualidade, dentro das exigências e de maior valor econômico.

Estudos mostraram que quando a prevalência de mastites contagiosas cai, o número de infecções intramamárias ambientais aumenta (Oliver e Mitchell, 1984). Assim, poderá ser observada no futuro uma emergência de mastites causadas por agentes que têm o ambiente como fonte de infecção, a exemplo do que ocorre em rebanhos que tiveram as mastites contagiosas controladas.

Dentre os agentes causadores de mastites ambientais, o *S. uberis* ocupa um lugar de destaque (Rosey et al., 1999; Phuektes et al., 2001a). Segundo Hogan & Smith (1997), de 14 a 26% dos casos de mastite clínica nos Estados Unidos, Canadá e

Holanda são devidos ao microrganismo. No Reino Unido, este agente é um dos maiores responsáveis por infecções intramamárias (Bradley et al., 2007).

3. EXPERIMENTO I (Identificação e distribuição de *S. uberis* em amostras de leite procedentes de diferentes regiões leiteiras do estado de Minas Gerais)

3.1. INTRODUÇÃO

S. uberis é um agente de mastite bovina de crescente importância mundial. Sua incidência tem aumentado na medida em que as criações bovinas são tecnificadas, devido a uma maior prevenção e controle das mastites, que têm conseguido reduzir a incidência de mastites contagiosas. Porém, no Brasil, pouco se conhece a respeito de sua frequência como causador de mastites, visto que para o diagnóstico etiológico da infecção não se faz a diferenciação das espécies de estreptococos.

Sendo assim, buscou-se conhecer, através da detecção genotípica do *S. uberis* pela técnica de PCR, a frequência deste microrganismo na etiologia de mastites em rebanhos leiteiros do estado de Minas Gerais.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. Local de realização dos experimentos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Pesquisas e Diagnóstico de Doenças Infecciosas do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e no Laboratório de Análise da Qualidade do Leite (LabUFMG) da Escola de Veterinária da UFMG.

3.2.2. Amostras

3.2.2.1. Amostra de referência de *S. uberis*

Como amostra padrão para controle positivo das reações foi utilizado um isolado clínico de vaca com mastite causada por *S. uberis*, identificado, caracterizado e cedido pela EMBRAPA Gado de Leite (Silva, 2008). A amostra foi conservada a -20°C em Brain Heart Infusion Broth (caldo BHI) – marca Oxoid – contendo 20% de glicerol estéril.

3.2.2.2. Amostras de leite

Foram analisadas 250 amostras de leite enviadas ao Laboratório de Análise da

Qualidade do Leite – LabUFMG – da Rede de Laboratórios de Qualidade do Leite do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) procedentes de diferentes regiões leiteiras, no período de março a dezembro de 2009 (Figura 01). Foram selecionadas aleatoriamente amostras analisadas pelo sistema Fossomatic 900 e que apresentaram Contagem Bacteriana Total (CBT) acima de 750 mil UFC/mL (Unidades Formadoras de Colônias/ mililitro). As amostras foram provenientes de propriedades e cooperativas das seguintes regiões de Minas Gerais: Norte, Noroeste, Vale do Mucuri, Jequitinhonha, Vale do Rio Doce, Central, Centro-Oeste, Sul, Sudoeste, Triângulo Mineiro, Alto Paranaíba e Zona da Mata.

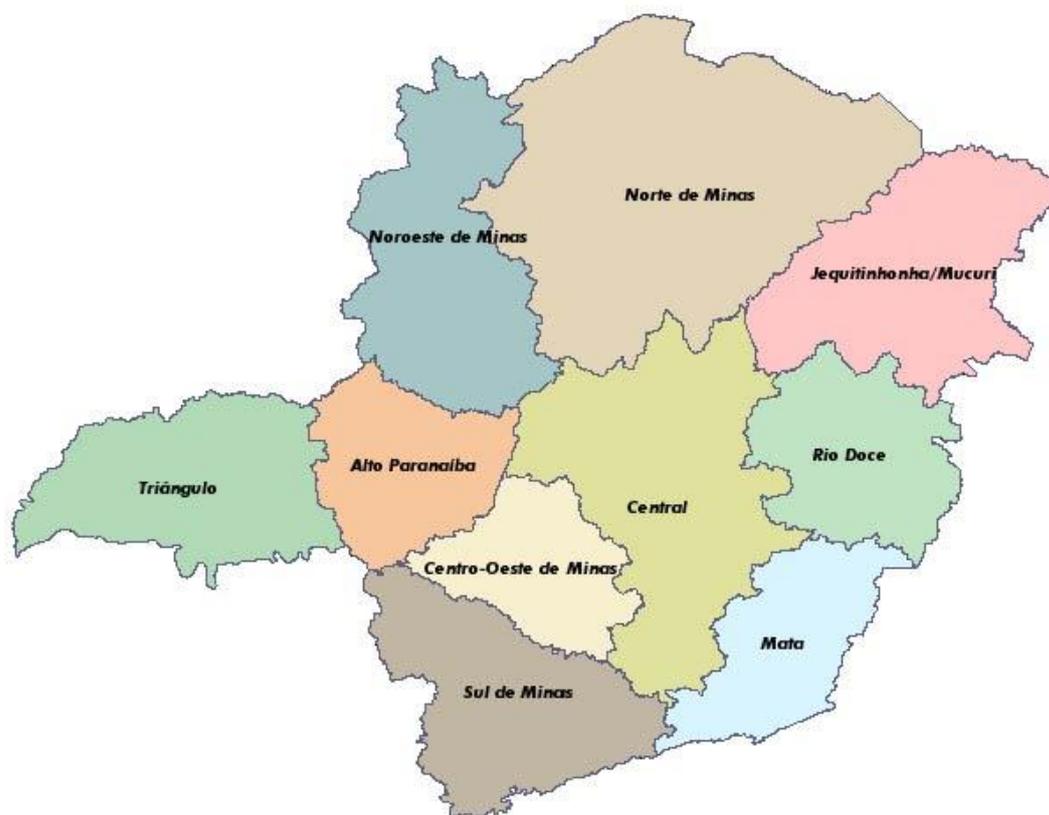


Figura 01 – Regiões do estado de Minas Gerais de origem das amostras analisadas.

3.2.3. PCR

3.2.3.1. Extração do DNA genômico da amostra de referência

A extração seguiu o protocolo de lavagem alcalina/ lise proposto por Millar et al. (2000) e Silva (2008), com algumas modificações: as amostras foram estriadas em ágar-sangue (Ágar BHI contendo 5% de sangue desfibrinado de equino), cultivadas por 24 horas a 37°C, e uma alçada de colônias foi suspensa em 1mL da solução de lavagem alcalina (0.5 M hidróxido de sódio e 0.05 M citrato de sódio). Após 10 minutos à temperatura ambiente, centrifugou-se por 5 minutos a 13000 rpm e o *pellet* foi ressuspensionado em 0,5 mL de Tris-HCl (0,5M, pH 8,0). O último passo foi repetido e o *pellet*, ressuspensionado em 50 µL de Tris-EDTA (10 mM Tris-HCl pH 8,0 e 1 mM EDTA) e aquecido a 100°C em banho-Maria por 1 hora. Centrifugou-se a suspensão por 15 minutos a 13000 rpm e transferiu-se para um novo microtubo o sobrenadante contendo o material genético extraído. A quantidade final de DNA obtida foi mensurada em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies™).

3.2.3.2. Extração do DNA genômico de *S. uberis* diretamente do leite

A extração seguiu o mesmo protocolo utilizado para a amostra de referência, com modificações: as amostras de leite foram previamente tratadas com tampão NET (50 mM NaCl, 125 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl), descrito por Romero e Lopez-Goñi (1999). 200 µL do tampão foram acrescentados a 1,5 mL de amostra, com o objetivo de retirar o cálcio presente no leite, minimizando assim o efeito inibidor de PCR deste componente. Centrifugou-se por 10 minutos a 13000 rpm e ao *pellet* resultante foi acrescentado 1mL da solução de lavagem alcalina (0.5 M hidróxido de sódio e 0.05 M citrato de sódio). Após 10

minutos à temperatura ambiente, centrifugou-se por 5 minutos a 13000 rpm e o *pellet* foi ressuspensionado em 0,5 mL de Tris-HCl (0,5M, pH 8,0). O último passo foi repetido e o *pellet*, ressuspensionado em 50 µL de Tris-EDTA (10 mM Tris-HCl pH 8,0 e 1 mM EDTA) e aquecido a 100°C em banho Maria por 1 hora. Centrifugou-se a suspensão por 15 minutos a 13000 rpm e transferiu-se para um novo microtubo o sobrenadante contendo o material genético extraído. A concentração de DNA foi mensurada em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies™).

3.2.3.3. Detecção de *S. uberis* pela técnica de PCR

Para detectar a presença de *S. uberis* nas amostras de leite, foram feitas PCRs visando amplificar o espaço intergênico 16S-23S rRNA. Os iniciadores utilizados foram os descritos originalmente por Forsman et al. (1997):

- STRU-UbI (5'-TAA GGA ACA CGT TGG TTA AG-3')
- STRU-UbII (5'-TTC CAG TCC TTA GAC CTT CT-3')

O *mix* de PCR consistiu de Tampão Especial Phoneutria 0,58X (equivalente a 2,0mM de MgCl₂), 10 pmoles de cada iniciador (Invitrogen – Brasil), 0,2mM de cada dNTP (Promega), 1U de Taq DNA polimerase (Phoneutria), 100ng de DNA e água MiliQ suficiente para uma reação de 20µL. As reações ocorreram em termociclador (MJ Research), com uma etapa de desnaturação inicial de 94°C por 3 minutos, 40 ciclos de 94°C por 1 minuto, 56°C por segundos, 72°C por 40 segundos, e um passo de extensão final a 72°C por 10 minutos.

3.2.3.4. Visualização dos segmentos amplificados

Os produtos amplificados foram visualizados após eletroforese em gel de agarose 1%, contendo 0,1µg/L de brometo de etídeo, a 200V, por 25 minutos, em fonte BioRad. O tampão utilizado foi o SB (5mM borato de sódio - Bórax), o qual permite a aplicação de uma voltagem maior sem um aumento considerável da temperatura, reduzindo, portanto, o tempo de corrida (Brody & Kern, 2004).

3.2.4. Sequenciamento

Com o objetivo de confirmar a identidade dos segmentos gênicos amplificados, os mesmos foram enviados para análise de sua sequência de nucleotídeos.

Os produtos amplificados da PCR foram purificados a partir do gel de agarose. A banda visualizada foi cortada e submetida ao protocolo de purificação, descrito por Barbas III et al. (2001). O DNA obtido foi quantificado em gel de agarose 1% e enviado para o sequenciamento (sequenciador ABI 3130 Applied Biosystems).

3.3. RESULTADOS

3.3.1. PCR das amostras de leite

A visualização das reações de amplificação por PCR do DNA bacteriano, extraído das amostras de leite, encontra-se na figura 02. A detecção de *S. uberis* foi feita por meio da amplificação do espaço intergênico 16S-23S rRNA, sendo que 23 amostras foram positivas para a presença do microrganismo. A frequência do *S. uberis* em propriedades leiteiras que enviaram amostras de leite com CBT igual ou superior a 750 000 UFC/mL, foi calculada em 9,2%. Dentre as regiões produtoras de leite, 30,43% das amostras positivas para presença de *S. uberis* foram provenientes da região do Vale do Rio Doce, enquanto 30,43% são da bacia leiteira da região Metropolitana de Belo Horizonte. Na tabela 01 estão relacionadas as amostras positivas com suas respectivas CBT e CCS.

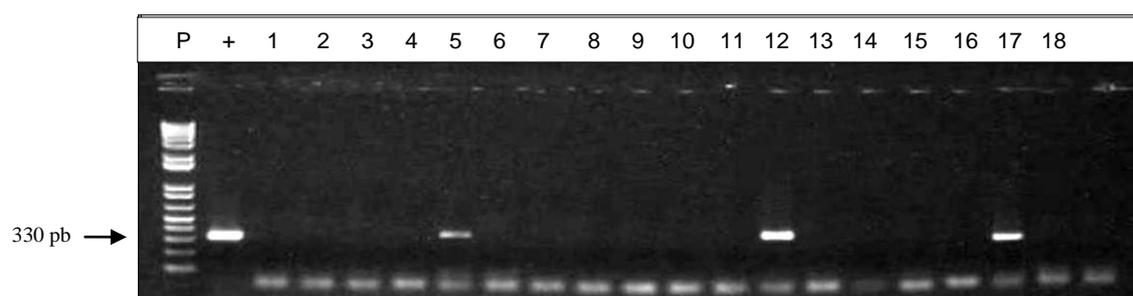


Figura 02 – Produtos de PCR do espaço intergênico 16S-23S, com 330 pb, visualizados em gel de agarose 1%, identificando amostras de *S. uberis* a partir de amostras de leite procedentes de propriedades rurais (1 a 18) de diferentes regiões leiteiras de Minas Gerais, 2009. P: Padrão de peso molecular (DNA ladder 1Kb); +: controle positivo; 1 – 18: Amostras de leite; -: controle negativo.

Tabela 1 – Distribuição das amostras de leite positivas para a presença de *S. uberis*, segundo a região de procedência, e as Contagens de Células Somáticas (CCS) e Contagem Bacteriana Total (CBT), Minas Gerais, 2009.

AMOSTRAS POSITIVAS	PROCEDÊNCIA	CBT (x 10 ³)*	CCS (x 10 ³)**
1	Central	2615	4259
8	Central	924	446
13	Central	1012	548
32	Metropolitana	2966	2349
33	Metropolitana	871	301
35	Metropolitana	8858	1769
63	Vale do Rio Doce	960	699
70	Vale do Rio Doce	5208	638
75	Vale do Rio Doce	9854	484
82	Vale do Rio Doce	2963	530
86	Vale do Rio Doce	1414	644
87	Vale do Rio Doce	2710	379
119	Noroeste	866	480
120	Vale do Rio Doce	2449	76
122	Noroeste	768	59
123	Noroeste	902	762
124	Noroeste	1350	367
126	Noroeste	787	265
168	Noroeste	4968	839
215	Metropolitana	1949	1131
220	Metropolitana	4618	175
221	Metropolitana	9440	559
241	Metropolitana	2565	356

* CBT x10³ UFC/mL

** CCS x 10³ cels/mL

3.3.2. Sequenciamento

A análise da sequência de nucleotídeos do fragmento genético amplificado revelou

100% de identidade com a sequência do espaço intergênico 16S-23S rRNA de *S. uberis* ATCC 19436, como mostram as figuras 07 e 08.

```

>|gb|AY347538.1| Streptococcus uberis strain ATCC 19436 16S-23S ribosomal RNA
intergenic spacer, complete sequence
Length=338

Score = 518 bits (280), Expect = 8e-144
Identities = 280/280 (100%), Gaps = 0/280 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1 CGCAGAGACAAACTGTGGGGCCTTAGCTCAGCTGGGAGAGCGCCTGCTTTGCACGCAGGA 60
      |||
Sbjct 56 CGCAGAGACAAACTGTGGGGCCTTAGCTCAGCTGGGAGAGCGCCTGCTTTGCACGCAGGA 115

Query 61 GGTCAGCGGTTTCGATCCCGCTAGGCTCCATAGGATACAGTTCAACTGACCTTAATAGAAG 120
      |||
Sbjct 116 GGTCAGCGGTTTCGATCCCGCTAGGCTCCATAGGATACAGTTCAACTGACCTTAATAGAAG 175

Query 121 TGAAGTTTCATTGTATCTTAGTATAGTCCATTGAAAATTGAATATCTATATCAAATTCCA 180
      |||
Sbjct 176 TGAAGTTTCATTGTATCTTAGTATAGTCCATTGAAAATTGAATATCTATATCAAATTCCA 235

Query 181 CGATCATGAAAATGATTGTAgaaaaagtaacaagaaataaacggaaaaaaagataaacgcg 240
      |||
Sbjct 236 CGATCATGAAAATGATTGTAGAAAAGTAACAAGAAATAAACGGAAAAAAGATAAACGCG 295

Query 241 aacatattaaaaaaaaaTCAAGAAGGTCTAAGGACTGGAAA 280
      |||
Sbjct 296 AACATATTAATAAAAAATCAAGAAGGTCTAAGGACTGGAAA 335

```

Figura 03 – BLAST da sequência *Forward* do segmento de DNA amplificado no experimento, mostrando 100% de identidade com a sequência do espaço intergênico 16S-23S rRNA de *S. uberis* ATCC 19436.

```

>|gb|AY347538.1| Streptococcus uberis strain ATCC 19436 16S-23S ribosomal RNA
intergenic spacer, complete sequence
Length=338

Score = 523 bits (283), Expect = 2e-145
Identities = 283/283 (100%), Gaps = 0/283 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 3 TTTCCAGTCCTTAGACCTTCTTGAatTTTTTTTaatatgttcgcgtttatctTTTTTTTCGG 62
      |||
Sbjct 335 TTTCCAGTCCTTAGACCTTCTTGAATTTTTTTTAAATATGTTTCGCGTTTATCTTTTTTTTCGG 276

Query 63 tttatTTcttGTTactTTTcTACAATCATTTTCATGATCGTGGAAATTTGATATAGATATT 122
      |||
Sbjct 275 TTTATTTCTTGTTACTTTTCTACAATCATTTTCATGATCGTGGAAATTTGATATAGATATT 216

Query 123 CAATTTTCAATGGACTATACTAAGATACAATGAAACTTCACTTCTATTAAGGTCAGTTGA 182
      |||
Sbjct 215 CAATTTTCAATGGACTATACTAAGATACAATGAAACTTCACTTCTATTAAGGTCAGTTGA 156

Query 183 ACTGTATCCTATGGAGCCTAGCGGGATCGAACCCTGACCTCCTGCGTGCAAAGCAGGCG 242
      |||
Sbjct 155 ACTGTATCCTATGGAGCCTAGCGGGATCGAACCCTGACCTCCTGCGTGCAAAGCAGGCG 96

Query 243 CTCTCCCAGCTGAGCTAAGGCCCCACAGTTTGTCTCTGCGTCT 285
      |||
Sbjct 95 CTCTCCCAGCTGAGCTAAGGCCCCACAGTTTGTCTCTGCGTCT 53

```

Figura 04 – BLAST da sequência *Reverse* complementar do segmento de DNA amplificado no experimento, mostrando 100% de identidade com a sequência do espaço intergênico 16S-23S rRNA de *S. uberis* ATCC 19436.

3.4. DISCUSSÃO

O leite de vaca está entre os produtos mais importantes da agropecuária brasileira, sendo o estado de Minas Gerais o principal produtor leiteiro do país, com uma produção estimada em 7,6 bilhões de litros de leite, no ano de 2008 (IBGE, 2008).

Visando melhorias na qualidade do produto, entrou em vigor em 2002 a IN 51 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, que preconiza para o ano de 2008 um limite de 750 000 células somáticas/mL e uma contagem bacteriana total máxima de 750 000 UFC/mL. A partir de julho de 2011, esses limites serão menores, de 400 000 células/mL e 400 000 UFC/mL (BRASIL, 2002). No entanto, a IN 51 entrou em vigor sem que o produtor estivesse preparado para atender às exigências em relação à qualidade do leite por ela preconizada.

Verificou-se no presente estudo que todas as 250 amostras analisadas neste trabalho apresentavam CBT em valores acima dos limites previstos pela IN 51, mostrando que, ainda no ano de 2009 observa-se um grande número de amostras de leite em não conformidade com as exigências mínimas de qualidade vigentes.

Em 23 (9,2%) delas foi detectado *S. uberis*, por meio da amplificação por PCR do espaço intergênico 16S-23S rRNA. Em relação à origem das amostras positivas, 30,43% delas foram provenientes da região do Vale do Rio Doce e 30,43% são da bacia leiteira da região Metropolitana de Belo Horizonte, tradicionais regiões produtoras de leite no estado. Trabalhos realizados em outras regiões brasileiras sobre a etiologia de casos de mastites clínicas e subclínicas mostram uma diversidade de resultados sobre a frequência de isolamentos de estreptococos variando entre 4% a 18% (Brito et al., 1999; Mota et al., 2004; Nader Filho et al., 2004; Santos, 2004; Freitas et

al., 2005), posto que os trabalhos em geral agrupam as espécies do gênero no diagnóstico etiológico, referindo-se a elas como *Streptococcus spp.*. Assim, na literatura, especialmente na nacional, pouco se encontra a respeito da frequência de *S. uberis* como agente etiológico da mastite bovina, dado importante para os estudos epidemiológicos das mastites, especialmente se consideramos que este estreptococo está envolvido com as chamadas mastites ambientais, como *E. coli* e o *S. dysgalactiae* (Leigh, 1999; Riffon et al., 2001; Silva, 2003; Santos, 2004). Desta maneira, visto que dentro do gênero *Streptococcus* existem espécies com diferentes características epidemiológicas, é importante que se faça o diagnóstico do agente etiológico até o nível de espécie, para que se possa conhecer melhor o tipo de microrganismo que atinge os rebanhos e assim adotar melhores estratégias de controle (Santos et al., 2007).

Apesar de serem poucos os estudos que buscam mostrar a participação de *S. uberis* nas infecções intramamárias nos rebanhos brasileiros, levantamentos realizados em rebanhos localizados em bacias leiteiras do estado de Minas Gerais (Pereira et al., 2007; Costa, 2008; Silva, 2008) mostraram frequências de isolamento e identificação (5% a 6,5%) menores que as descritas neste trabalho (9,2%). Diferentemente deste estudo, onde *S. uberis* foram isolados de amostras de leite de tanque, e à exceção do trabalho realizado por Silva (2008), nos demais trabalhos o microrganismo foi isolado diretamente de animais acometidos por mastites, e sua identificação ocorreu através de métodos microbiológicos de rotina. Segundo Cremonesi et al. (2005), Ramesh et al. (2002), Pérez-Roth et al. (2001), Phuektes et al. (2001b) e Tamarapu et al. (2001), métodos moleculares para identificação de *S. uberis*, como o utilizado neste trabalho, mostram-se mais precisos e rápidos, permitindo sua utilização em diferentes estudos epidemiológicos.

Em trabalhos internacionais encontra-se geralmente uma frequência maior de *S. uberis*, como agente etiológico de mastite bovina, em frequência de 11 %, maior que os registrados neste trabalho (Yearly Trends 2001 – 2008, 2008; Unnerstad et al., 2009). Nestes países observa-se uma maior tecnificação na exploração dos rebanhos leiteiros, nos quais foram implantados eficientes programas de controle da mastite contagiosa. Conseguiu-se, assim, ao longo dos anos uma redução no número de casos de infecções intramamárias contagiosas e uma menor CCS do leite produzido, mas não se observou uma redução significativa nas mastites devidas aos microrganismos com rota de infecção ambiental. Assim, os agentes ambientais, inclusive *S. uberis*, assumiram uma maior importância na etiologia de mastites (Leigh, 1999).

A importância do *S. uberis* como agente etiológico de mastite bovina em rebanhos brasileiros ainda se mostra limitada, ou talvez subestimada, pois, no país, boa parte da produção leiteira é oriunda de propriedades com baixo nível de tecnificação. As infecções intramamárias ocasionadas por agentes contagiosos, como *S. aureus* e *S. agalactiae*, ainda ocorrem em número expressivo e representam um problema no controle da mastite, enquanto microrganismos ambientais são encontrados em um menor número de amostras de leite de vacas com infecção intramamária.

3.5. CONCLUSÃO

S. uberis é responsável por uma pequena porcentagem dos casos de mastite bovina em rebanhos brasileiros. Entretanto, a tendência é que, devido às novas exigências da IN 51 quanto à qualidade do leite, sejam implantados nos rebanhos programas de controle da mastite mais rigorosos, reduzindo a incidência de mastites contagiosas. Por consequência, a incidência de mastites ambientais tende a ser maior, assim, o *S. uberis* assume uma maior

importância na etiologia de infecções intramamárias.

4. EXPERIMENTO II (Determinação dos fatores de virulência de *S. uberis* isolados na região da bacia leiteira do Sul de Minas Gerais)

4.1. INTRODUÇÃO

Fatores de virulência conferem vantagens ao microrganismo no estabelecimento de infecções intramamárias. Dois fatores de virulência do *S. uberis*, PauA e SUAM, têm sido apontados como importantes ferramentas de obtenção de nutrientes e aderência e consequente internalização às células epiteliais da glandula mamária, respectivamente. Este estudo objetivou avaliar a presença destes fatores de virulência em *S. uberis* isolados em casos de mastite em rebanhos bovinos de Minas Gerais, através da técnica de PCR, além de conhecer seus padrões de susceptibilidade frente a antimicrobianos.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. Amostras

4.2.1.1. Amostra de referência

A mesma amostra de *S. uberis*, fornecida pela EMBRAPA e utilizada como controle positivo no experimento I, foi empregada como amostra de referência deste experimento, sendo previamente testada e positiva para os genes *sua* e *pauA*.

4.2.1.2. Amostras de campo

Foram utilizadas 112 amostras de *Streptococcus spp.*, isoladas e caracterizadas bioquimicamente a partir de vacas com mastites clínicas ou subclínicas de rebanhos da região sul de Minas Gerais no período de 2004 a 2006.

Estas amostras, que estavam conservadas a -20 °C em caldo BHI com 20% de glicerina, foram semeadas em ágar sangue e incubadas por 24h a 37°C. Destas, três não cresceram em placas de ágar sangue. Nas 109 amostras restantes foram realizados os testes da catalase e da hidrólise da esculina, para confirmação bioquímica da presença do *S. uberis*. As amostras catalase negativas e esculina positivas foram confirmadas presuntivamente como tal e selecionadas para serem utilizadas no experimento.

4.2.2. Identificação das amostras de *S. uberis* pela técnica de PCR

4.2.2.1. Extração do DNA genômico

A extração seguiu o protocolo de lavagem alcalina/ lise proposto por Millar et al. (2000), com algumas modificações: as amostras foram estriadas em Ágar sangue, cultivadas por 24 horas a 37°C, e uma alçada de colônias foi suspensa em 1mL da solução de lavagem alcalina. O restante do procedimento se deu como no experimento I. A quantidade final de DNA obtida foi mensurada em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies™).

4.2.2.2. Identificação de *S. uberis* pela técnica de PCR

Com o objetivo de confirmar a identidade dos microrganismos que foram previamente caracterizados bioquimicamente (catalase negativo e esculina positivo), realizou-se a PCR para amplificação da sequência do espaço intergênico 16S-23S do rRNA. Os iniciadores utilizados foram os mesmos do experimento I, descritos por Forsman et al. (1997) e Silva (2008).

O *mix* de PCR foi o mesmo utilizado para a amplificação do espaço intergênico 16S-23S no DNA extraído do leite (item 3.1.3.3), com a exceção de que aqui foram usados 5 pmoles de cada iniciador. As

reações foram feitas com uma etapa de desnaturação inicial de 94°C por 3 minutos, 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos, 72°C por 40 segundos, e um passo de extensão final a 72°C por 10 minutos.

4.2.2.3. Detecção dos fatores de virulência de *S. uberis* pela técnica de PCR

As amostras identificadas genotipicamente como *S. uberis* foram submetidas à PCR para a detecção dos genes *pauA* e *sua*. Para a amplificação do gene *pauA* foram utilizados os seguintes iniciadores, descritos originalmente por Khan et al. (2003):

- P38 (5'-AAT AAC CGG TTA TGA TTC CGA CTA C-3')
- P39 (5'-AAA ATT TAC TCG AGA CTT CCT TTA AGG-3')

Na preparação do *mix* foram utilizados Tampão Especial Phoneutria 1X (equivalente a 3,5mM de MgCl₂), 10 pmoles de cada iniciador, 0,2mM de cada dNTP, 1U de Taq DNA polimerase, 100ng de DNA e água (MiliQ) suficiente para uma reação de 20 µL. A reação consistiu de um passo de desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 53°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, e uma etapa de extensão final a 72°C por 10 minutos.

Para a detecção do gene *sua*, utilizaram-se os iniciadores descritos originalmente por Almeida et al. (2006):

- LfbpDL5 (5'-GTC ATT TGG TAG GAG TGG CTG-3')
- LfbpDL6 (5'-TGG TTG ATA TAG CAC TTG GTG AC-3')

O *mix* foi preparado com Tampão Especial Phoneutria 1X, 3 pmoles de cada iniciador,

0,2mM de cada dNTP, 1U de Taq DNA polimerase, 100ng de DNA e água (MiliQ) suficiente para uma reação de 20 µL. A reação ocorreu a 94°C por 3 minutos, 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 56°C por 1 minuto e 15 segundos e 72°C por 1 minuto e 15 segundos, com uma etapa de extensão final a 72°C por 10 minutos.

4.2.2.4. Visualização dos produtos de PCR

A eletroforese em gel de agarose seguiu a mesma metodologia anterior descrita no item 3.2.3.4.

4.2.3. Testes de susceptibilidade a antimicrobianos

Os testes de susceptibilidade a antimicrobianos foram realizados nas amostras que geneticamente foram confirmadas como sendo *S. uberis*, de acordo com o método de disco difusão descrito no manual do CLSI (2008). O inóculo foi preparado pelo método de suspensão direta de colônias: as amostras foram cultivadas em ágar sangue por 24h, e então colônias isoladas foram suspensas em solução salina 0,9% até atingir turbidez equivalente à escala McFarland 0,5. Utilizando-se um *swab*, foi feita a inoculação dessa suspensão em placas contendo meio cultura de ágar Müeller-Hinton acrescido de 5% de sangue desfibrinado de equino, e, após a absorção

do excesso de umidade, os discos impregnados com antimicrobianos foram aplicados na superfície do meio. As placas foram deixadas em estufa a 37°C e a leitura dos resultados foi realizada após 24 horas de incubação.

Foram testados os seguintes agentes antimicrobianos: Penicilina G (10 UI), Sulfametoxazole + Trimetoprim (25µg), Florfenicol (30µg), Lincomicina (2µg), Cefalotina (30µg), Gentamicina (10µg), Tetraciclina (30µg) e Enrofloxacina (5µg) (CECON discos).

4.3. RESULTADOS

4.3.1. PCR realizadas em amostras de campo

Todas as 109 amostras de *Streptococcus spp.* isoladas de vacas com mastites de rebanhos do sul do estado de Minas Gerais foram catalase negativas, porém somente 65 apresentaram-se positivas à prova de esculina. Destas, apenas 28 foram confirmadas, através da PCR para amplificação do DNA do espaço intergênico 16S-23S, como sendo efetivamente *S. uberis*.

Das 28 amostras pesquisadas, em 22 (78,6%) o gene *pauA*, que codifica o fator de virulência PauA foi encontrado, conforme mostrado na Figura 05.

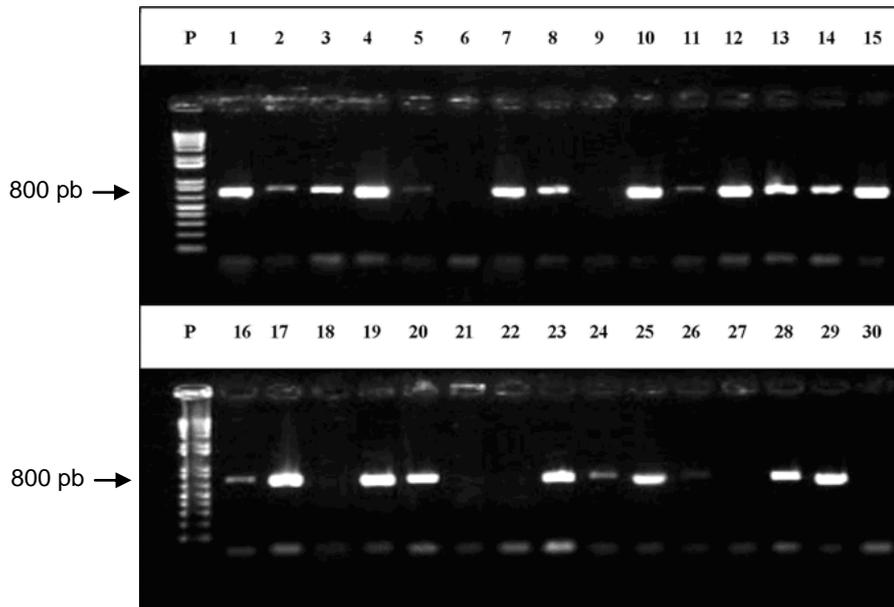


Figura 05 – Produtos de PCR do gene *pauA*, com 800 pb, visualizados em gel de agarose 1% das amostras de *S. uberis* isoladas de casos de mastites na região da bacia leiteira do Sul de Minas Gerais. P: Padrão de peso molecular (DNA ladder 1Kb); 1: controle positivo; 2 – 29: amostras de campo de *S. uberis*; 30: controle negativo.

Em 19 amostras (67,9%) foi encontrado o gene *sua*, responsável pela codificação do

fator de virulência SUAM, como se vê na Figura 06.

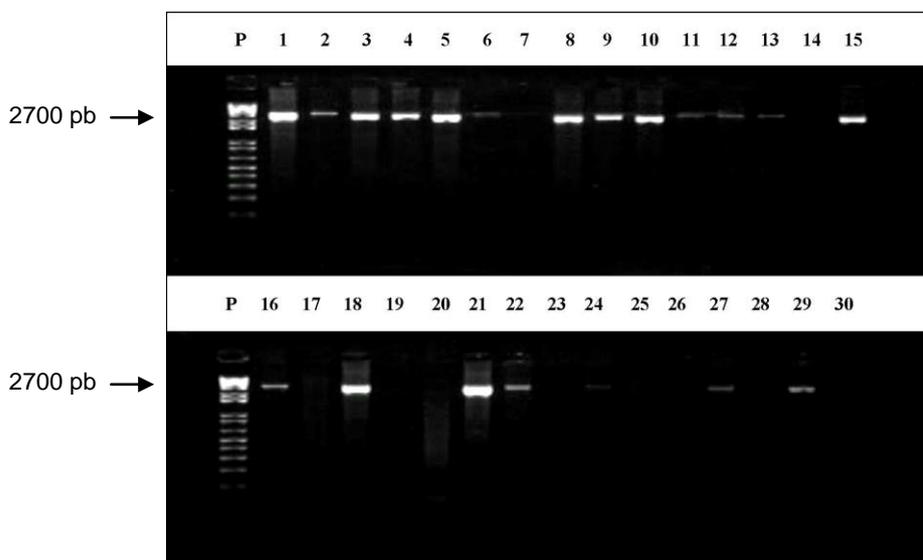


Figura 06 – Produtos de PCR do gene *sua*, com 2700 pb, visualizados em gel de agarose a 1% das amostras de *S. uberis* isoladas de casos de mastites na região da bacia leiteira do Sul de Minas Gerais. P: Padrão de peso molecular (DNA ladder 1Kb); 1: controle positivo; 2 – 29: Amostras de campo de *S. uberis*; 30: controle negativo.

4.3.2. Testes de susceptibilidade a antimicrobianos

O gráfico 01 apresenta a distribuição dos resultados dos testes de susceptibilidade *in vitro* das amostras de campo de *S. uberis* frente aos antimicrobianos avaliados. Observa-se que as drogas que apresentaram maior número de amostras sensíveis foram o Florfenicol e a Cefalotina (100% cada), seguidas de Gentamicina (92,9%), Enrofloxacina (89,3%), Penicilina G (75%), Lincomicina e Sulfametoxazole +

Trimetoprim (67,9% cada) e Tetraciclina (46,5%). Tetraciclina foi o antimicrobiano para o qual se observou a maior porcentagem de amostras resistentes *in vitro* (35,7%), seguida por Lincomicina (28%), Sulfametoxazol + Trimetoprim (17,9%), Penicilina G (14,3%) e Gentamicina (3,6%), enquanto que para Cefalotina, Florfenicol e Enrofloxacina não se observou nenhuma amostra resistente. A figura 09 ilustra os resultados do teste de susceptibilidade aos antimicrobianos por disco-difusão da amostra de referência.

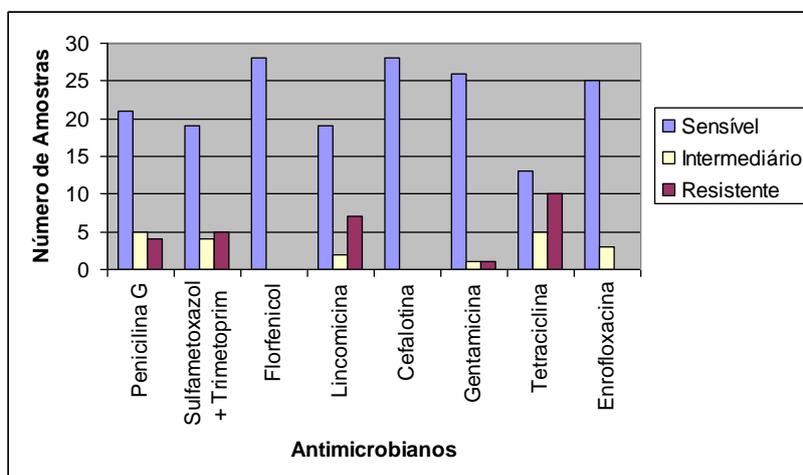


Gráfico 01 – Distribuição dos resultados dos testes de susceptibilidade frente aos antimicrobianos de amostras de *S. uberis* isoladas de casos de mastites em rebanhos bovinos da bacia leiteira do Sul de Minas Gerais.

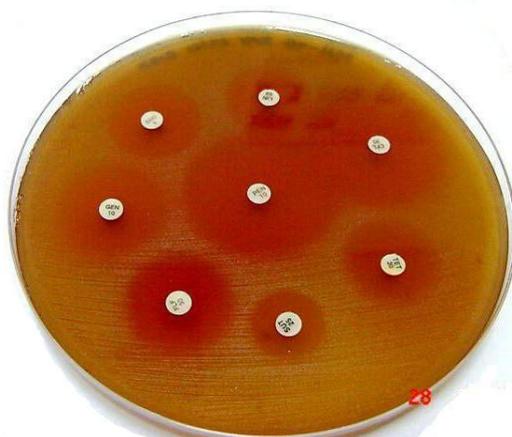


Figura 07 – Teste de susceptibilidade a antimicrobianos por disco-difusão, em ágar Mueller-Hinton-sangue, da amostra de referência. Antimicrobianos utilizados: Penicilina G, Cefalotina, Tetraciclina, Sulfametoxazol + Trimetoprim, Florfenicol, Gentamicina, Enrofloxacina e Lincomicina.

4.4. DISCUSSÃO

Das 112 amostras recebidas, três não apresentaram crescimento em ágar sangue e apenas 28 foram genotipicamente confirmadas como sendo *S. uberis*, através de PCR. A biologia molecular tem sido amplamente utilizada no diagnóstico etiológico das enfermidades, em substituição às técnicas fenotípicas, conferindo uma identificação mais rápida e acurada (Oliveira e Ramos, 2002).

O gene *pauA*, que codifica a proteína ativadora do plasminogênio bovino PauA, foi encontrado em 78,6% das amostras. Khan et al. (2003) encontraram o gene em 128 de 130 amostras de *S. uberis* isolados de vacas com mastite em rebanhos da Alemanha (98,5%). Ward e Leigh (2004) afirmam que ativadores de plasminogênio são universalmente distribuídos entre *S. uberis*. Em sua pesquisa, localizaram o gene *pauA* em todas as 20 amostras do microrganismo oriundas de rebanhos da Dinamarca.

A alta prevalência do gene *pauA* em amostras de *S. uberis* isoladas do campo corrobora a teoria de que ativadores do plasminogênio bovino provavelmente conferem uma vantagem em relação à colonização da glândula mamária e crescimento do microrganismo.

McVey et al. (2005) identificaram vários epitopos lineares da molécula PauA que foram reconhecidos por anticorpos monoclonais anti-PauA, característica que pode facilitar o desenvolvimento de uma vacina contra a mastite bovina causada por *S. uberis*.

Uma alta porcentagem das amostras analisadas (78,6%), oriundas da bacia leiteira do sul de Minas Gerais, apresentou o gene que codifica o fator de virulência PauA.

Em 19 (67,9%) das 28 amostras foi detectada a presença do gene *sua*, uma frequência inferior à encontrada por Luther et al. (2008), que localizaram o gene em todas as 12 amostras de *S. uberis* estudadas, provindas de diversas regiões dos EUA e Nova Zelândia.

Quando avaliados *in vitro*, anticorpos contra a molécula SUAM foram capazes de prevenir a aderência e internalização do *S. uberis* em células epiteliais da glândula mamária bovina (Luther et al., 2008; Patel et al., 2009). Estes resultados sustentam a ideia de que a SUAM possui uma importante função na colonização da glândula mamária pelo microrganismo, e é uma promissora candidata a antígeno a ser utilizado na confecção de uma vacina contra mastite devida ao *S. uberis*.

A ampla distribuição do gene *sua* em amostras de *S. uberis* isoladas de diferentes regiões geográficas sugere que este gene é conservado em muitas amostras do microrganismo. Nas amostras estudadas no presente trabalho, isoladas de propriedades do sul de Minas Gerais, foi encontrada uma frequência alta do gene (67,9%). Assim, pesquisas adicionais envolvendo a SUAM, como um potencial imunógeno para a construção de vacinas, são necessárias para melhor entendimento do real papel desempenhado por este gene na patogenia das infecções intramamárias produzidas por este microrganismo.

Na literatura consultada não foram encontrados trabalhos a respeito da presença dos genes *pauA* e *sua* em *S. uberis* isolados de animais de rebanhos brasileiros. Sendo as moléculas PauA e SUAM promissoras candidatas a imunógenos para o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra a mastite bovina devida ao *S. uberis*, mais pesquisas devem ser desenvolvidas para conhecer a distribuição destas proteínas entre as amostras brasileiras, e

assim avaliar a validade de uma vacina específica para as condições do país.

O conhecimento dos padrões de susceptibilidade dos agentes etiológicos da mastite frente aos antimicrobianos utilizados no tratamento da infecção é de extrema importância para o sucesso do tratamento. O uso racional destes medicamentos pode auxiliar na prevenção do aparecimento de novos casos de resistência bacteriana, que vêm se acentuando devido ao uso indiscriminado e inadequado de antibióticos (Costa, 2002).

O correto uso dos antimicrobianos contribui ainda para a redução de resíduos do medicamento no leite. Sua presença no leite constitui uma preocupação em relação à saúde pública, pelo risco de ocorrência de reações alérgicas, frequentemente associadas aos antibióticos beta-lactâmicos. Os resíduos de medicamentos interferem também na produção de derivados, muitas vezes inviabilizando sua produção, gerando também prejuízos econômicos.

Antibióticos beta-lactâmicos, como a Penicilina G, são bastante utilizados na bovinocultura leiteira para o tratamento de infecções intramamárias. São antibióticos bactericidas que atuam na parede celular bacteriana. No presente trabalho, 75% das amostras foram sensíveis e apenas duas mostraram-se resistentes à Penicilina G, porém várias apresentaram resultado intermediário (17,9%), portanto, não se pode afirmar que estas amostras são sensíveis ao antibiótico. Guérin-Faubleé et al. (2002) encontraram uma frequência de 14% de amostras de *S. uberis*, isoladas na França, classificadas como intermediárias à Penicilina G, enquanto, Santos (2004) encontrou 44% de amostras de *S. uberis*, de rebanhos de Minas Gerais e Rio de Janeiro, sensíveis à Penicilina G, frequência semelhante à reportada neste estudo. Em contrapartida, Rossitto et al. (2002) avaliaram a susceptibilidade antimicrobiana

de amostras de estreptococos ambientais da Califórnia, EUA, e encontraram apenas 50,4% dos *S. uberis* sensíveis à Penicilina G.

Todas as amostras foram sensíveis ao Florfenicol e à Cefalotina. Os resultados são concordantes com os obtidos por Giannechini et al. (2002), que, ao avaliarem a susceptibilidade de *S. uberis* à Cefalotina, encontraram 100% de amostras sensíveis em amostras no Uruguai, enquanto este percentual foi de 80% no estudo de Santos (2004) para a mesma droga.

As amostras avaliadas apresentaram 89,3% de sensibilidade à Enrofloxacin, uma quinolona que tem tido um crescente uso na terapia de infecções intramamárias (Costa, 2002). A frequência encontrada é semelhante à relatada no estudo de Owens et al. (1997), que foi de 88% de amostras sensíveis.

A associação sulfametoxazol com trimetoprim foi testada, e encontrou-se apenas 67,9% de amostras sensíveis, com 17,9% de resistência. Estes quimioterápicos foram utilizados por muito tempo no tratamento de mastites, porém atualmente há disponíveis medicamentos mais efetivos contra uma maior variedade de agentes etiológicos.

Encontrou-se 92,9% das amostras sensíveis à Gentamicina, número que difere dos resultados encontrados por Giannechini et al. (2002) e Santos (2004), que obtiveram apenas 12% e 8% de sensibilidade, respectivamente.

Tetraciclina e Lincomicina foram os agentes antimicrobianos para os quais se verificou a maior porcentagem de resistência *in vitro* (35,7% e 28% respectivamente). Owens et al. (1990) encontraram resistência à Tetraciclina em 24% de amostras, enquanto Guérin-Faubleé

et al. (2002) reportaram 10% de amostras resistentes, oriundas de rebanhos da França. Vachée et al. (2008) ao estudarem a sensibilidade de amostras de *S. uberis* a antibióticos, também na França, encontraram 68% de sensibilidade à Tetraciclina. Hendriksen et al. (2008) estudaram amostras de patógenos isolados de rebanhos bovinos de vários países no período de 2003 a 2005, e encontraram 11% e 44% de amostras resistentes a este antimicrobiano na Inglaterra e Itália, respectivamente, no ano de 2003. Vários autores afirmam ser comum a resistência de *S. uberis* a este antibiótico (Owens et al., 1997; Vachée et al., 2002).

Guérin-Faubleé et al. (2002) relataram uma alta frequência de amostras de *S. uberis*, isolados de mastites clínicas, resistentes à Lincomicina. *Streptococcus spp.* isolados de vacas, em particular o *S. uberis*, desenvolveram resistência às lincosamidas, que se dá através da alteração do alvo de ação do antimicrobiano na célula ou por modificação enzimática; isto explica a alta porcentagem de amostras resistentes à Lincomicina encontrada em diversos trabalhos (Petinaki et al., 2008).

Esta diversidade de resultados apresentada nos trabalhos descritos anteriormente, em diferentes regiões e rebanhos, mostra que a resistência a antimicrobianos é importante no estabelecimento e disseminação de clones bacterianos em um rebanho, tendo estreita associação com mudanças no manejo, tais como a implementação de tratamento antibiótico sistemático, estabulação e a introdução de ordenhadeira mecânica, fatores que atuam como forças seletivas sobre patógenos causadores de mastite (Myllys et al., 1994).

4.5. CONCLUSÃO

Os genes que codificam as proteínas PauA e SUAM, que atuam na colonização da glândula mamária pelo *S. uberis*, são

amplamente distribuídos entre as amostras do microrganismo isoladas de rebanhos do sul do estado de Minas Gerais.

A ocorrência de resistência em várias amostras de *S. uberis* a diversos antimicrobianos reafirma a necessidade de um diagnóstico etiológico preciso da mastite bovina, e que a susceptibilidade dos agentes patogênicos frente aos antimicrobianos seja conhecida, a fim de que um tratamento racional seja instituído.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com a adoção de medidas mais rigorosas de controle e prevenção de mastites bovinas, visando à produção de leite de melhor qualidade, o que se deve observar nos rebanhos brasileiros é uma redução dos casos de mastites contagiosas e um aumento na incidência de mastites ambientais, inclusive as originadas por *S. uberis*. Vacinas tendem a ser um importante componente de programas de controle de mastites. Pesquisas vêm sendo desenvolvidas visando avaliar a utilização das proteínas PauA e SUAM como componentes de vacinas contra mastites causadas por *S. uberis*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMADZADEH, A.; FRAGO, F.; SHAFII, B. et al. Effect of clinical mastitis and other diseases on reproductive performance of Holstein cows. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 112, n. 3-4, p. 273-282, 2009.
- ALMEIDA, R. A.; LUTHER, D. A.; PARK, H. M. Identification, isolation and partial characterization of a novel *Streptococcus uberis* adhesion molecule (SUAM). *Vet. Microbiol.*, v. 115, n. 1-3, p. 183-191, 2006.

- BARBAS III, C. F.; BURTON, D. R.; SCOTT, J. K. et al. Extração de DNA de gel de agarose usando Freeze/Squeeze. In: *Phage Display: a Laboratory Manual*. New York: Gold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- BERRY, E. A.; HILLERTON, J. E. The effect of selective dry cow treatment on new intramammary infections. *J. Dairy Sci.*, v. 85, n. 1, p. 112–121, 2002.
- BRADLEY, A. J. Bovine mastitis: an evolving disease. *Vet. J.*, v. 164, n. 2, p. 116-128, 2002.
- BRADLEY, A. J.; LEACH, K. A.; BREEN, J. E. et al. Survey of the incidence and aetiology of mastitis on dairy farms in England and Wales. *Vet. Rec.*, v. 160, n. 8, p. 253–257, 2007.
- BRAMLEY, A. J.; CULLOR, J. S.; ERSKINE, R. J. et al. Current concepts of bovine mastitis. 4 ed. Madison: National Mastitis Council, 1996, 64p.
- BRASIL. Instrução Normativa SDA/n. 51 de 18 de setembro de 2002. Estabelece os parâmetros técnicos de produção, qualidade e identidade do leite tipo A, do leite tipo B, do leite tipo C, do leite pasteurizado e do leite cru refrigerado e seu transporte a granel, em conformidade com os Anexos a esta Instrução Normativa. Diário Oficial da União, 18/09/2002.
- BREAU, W. C.; OLIVER, S. P. Growth inhibition of environmental mastitis pathogens during physiologic transitions of the bovine mammary gland. *Am. J. Vet. Res.*, v. 47, n. 2, p. 218-222, 1986.
- BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; RIBEIRO, M. T. et al. Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 51, n. 2, p. 129-135, 1999.
- BRODY, J. R.; KERN, S. E. Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. *Biotechniques*, v. 36, n. 2, p. 214-216, 2004.
- BROWN, M. B.; SCASSERRA, A. E. Antimicrobial resistance in streptococcal species isolated from bovine mammary glands. *Am. J. Vet. Res.*, v. 51, n. 12, p. 2015-2018, 1990.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Padronização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão: norma aprovada. 8. ed. Wayne: CLSI, 2008, 58 p. Documento M2-A8, v. 23, n. 1.
- 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.
- COSTA, E. O. Uso de antimicrobianos na mastite. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIAC, S. L.; BERNARDI, M. M. *Farmacologia aplicada à Medicina Veterinária*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. Cap. 42, p. 443-455.
- 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, G. M. *Mamite bovina em rebanhos leiteiros da região sul do estado de Minas Gerais*. 2008. 123 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

- CREMONESI, P.; LUZZANA, M.; BRASCA, M. et al. Development of a multiplex PCR assay for the identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. *Mol. Cel. Probes*, v. 19, n. 5, p. 299-305, 2005.
- CULLOR, J. S. Streptococcus uberis ecology in housed cows. In: NATIONAL MASTITIS COUNCIL ANNUAL MEETING. 45, 2006. Tampa. *Proceedings...* Verona: National Mastitis Council, 2006. p. 145-146.
- DENAMIEL, G.; LLORENTE, P.; CRABELLA, M. et al. Anti-microbial susceptibility of *Streptococcus* spp. isolated from bovine mastitis in Argentina. *J. Vet. Med.*, v. 52, n. 3, p. 125-128, 2005.
- DIAS, R. V. C. Principais métodos de diagnóstico e controle da mastite bovina. *Acta Vet. Bras.*, v. 1, n. 1, p. 23-27, 2007.
- DOGAN, B.; BOOR, K. J. Short communication: growth characteristics of *Streptococcus uberis* in UHT-treated milk. *J. Dairy Sci.*, v. 87, n. 4, p. 813-815, 2004.
- DOUGLAS, V. L.; FENWICK, S. G.; PFEIFFER, D. U. et al. Genomic typing of *Streptococcus uberis* isolates from cases of mastitis, in New Zealand dairy cows, using pulsed-field gel electrophoresis. *Vet. Microbiol.*, v. 75, n. 1, p. 27-41, 2000.
- ERSKINE, R.; CULLOR, J.; SCHAELLIMBAUM, M. et al. Bovine mastitis pathogens and trends in resistance to antibacterial drugs. In: NATIONAL MASTITIS COUNCIL ANNUAL MEETING, 43, 2004, Charlotte. *Proceedings...* Verona: National Mastitis Council, 2004. p. 400-414.
- FANG, W.; ALMEIDA, R. A.; OLIVER, S. P. Effects of lactoferrin and milk on adherence of *Streptococcus uberis* to bovine mammary epithelial cells. *Am. J. Vet. Res.*, v. 61, n.3, p. 275-279, 2000.
- FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. Qualidade do leite e controle de mastite. São Paulo: Lemos Editorial, 2000, 175 p.
- FORSMAN, P.; TILSALA-TIMISJÄRVI, A.; ALATOSSAVA, T. Identification of staphylococcal and streptococcal causes of bovine mastitis using 16S-23S rRNA spacer regions. *Microbiology*, v. 143, n. 11, p. 3491-3500, 1997.
- FREITAS, M. F. L.; PINHEIRO JÚNIOR, J. W.; STAMFORD, T. L. M. et al. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus* coagulase positivos isolados de leite de vacas com mastite no agreste do estado de Pernambuco. *Arq. Inst. Biol.*, v. 72, n. 2, p. 171-177, 2005.
- GIANNECHINI, R. E.; CONCHA, C.; FRANKLIN, A. Antimicrobial susceptibility of udder pathogens isolated from dairy herds in the west littoral region of Uruguay. *Acta Vet. Scand.*, v. 43, n. 1, p. 31-41, 2002.
- GUÉRIN-FAUBLÉ, V.; TARDY, F.; BOUVERON, C. et al. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus* species isolated from clinical mastitis in dairy cows. *Int. J. Antimicrob. Agents*, v. 19, n. 3, p. 219-226, 2002.
- HENDRIKSEN, R. S.; MEVIUS, D. J.; SCHOETER, A. et al. Prevalence of antimicrobial resistance among bacterial pathogens isolated from cattle in different European countries: 2002-2004. *Acta. Vet. Scand.*, v. 50, n. 1, p. 28, 2008.

- HILLERTON, J. E.; BERRY, E. A. The management and treatment of environmental streptococcal mastitis. *Vet. Clin. Food. Anim.*, v. 19, n. 1, p. 157-169, 2003.
- HOGAN, J. S.; SMITH, K. L.; HOBLET, K. H. et al. Field survey of clinical mastitis in low somatic cell count herds. *J. Dairy Sci.*, v. 72, n. 6, p. 1547-1556, 1989.
- HOGAN, J.S.; SMITH, K.L. Occurrence of clinical and subclinical environmental streptococcal mastitis. In: SYMPOSIUM ON UDDER HEALTH MANAGEMENT FOR ENVIRONMENTAL STREPTOCOCCI, 1997. Guelph. *Proceedings...* Verona: National Mastitis Council, 1997. p.59-75.
- IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Produção da Pecuária Municipal – 2008. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=mg&tema=pecuaria2008>> Acesso em: dez. 2009.
- JIANG, M.; BABIUK, L. A.; POTTER, A. Cloning, sequencing and expression of the CAMP factor gene of *Streptococcus uberis*. *Microb. Pathog.*, v. 20, n. 5, p. 297-307, 1996.
- KHAN, I. U.; HASSAN, A. A.; ABDULMAWJOOD, A. et al. Identification and epidemiological characterization of *Streptococcus uberis* isolated from bovine mastitis using conventional and molecular methods. *J. Vet. Sci.*, v. 4, n. 3, p.213-223, 2003.
- KITT, A. J.; LEIGH, J. A. The auxotrophic nature of *Streptococcus uberis*. The acquisition of essential amino acids from plasmin derived casein peptides. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v. 418, p. 647-50, 1997.
- LeBLANK, S. J.; LISSEMORE, K. D.; KELTON, D. F. et al. Major advances in diseases prevention in dairy cattle. *J Dairy Sci.*, v. 89, n. 4, p. 1267-1279, 2006.
- LEIGH, J. A. *Streptococcus uberis*: A permanent barrier to the control of bovine mastitis? *Vet. J.*, v. 157, n. 3, p. 225-238, 1999.
- LINCOLN, R. A.; LEIGH, J. A. Characterisation of the interaction of bovine plasmin with *Streptococcus uberis*. *J. Appl. Microbiol.*, v. 84, n. 6, p. 1104-10, 1998.
- LOPEZ-BENAVIDEZ, M. G.; WILLIAMSON, J. H.; PULLINGER, G. D. et al. Field observations on the variation of *Streptococcus uberis* populations in a pasture-based dairy farm. *J. Dairy Sci.*, v. 90, n. 12, p. 5558-5566, 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. *Vet. Microbiol.*, v. 128, n. 3-4, p. 304-312, 2008.
- McDOUGALL, S. Intramammary treatment of clinical mastitis of dairy cows with a combination of lincomycin and neomycin, or penicillin and dihydrostreptomycin. *N. Z. Vet. J.*, v. 51, n. 3, p. 111-116, 2003.
- McDOUGALL, S.; PARKINSON, T. J.; LEYLAND, M. et al. Duration of infection and strain variation in *Streptococcus uberis* isolated from cows' milk. *J. Dairy Sci.*, v. 87, n. 7, p. 2062-2072, 2004.

- McVEY, D. S.; SHI, J.; LEIGH, J. A. et al. Identification of multiple linear epitopes of the plasminogen activator A (PauA) of *Streptococcus uberis* with murine monoclonal antibodies. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 104, n. 3-4, p. 155-162, 2005.
- MILLAR, B. C.; JIRU, X.; MOORE, J. E. et al. A simple and sensitive method to extract bacterial, yeast and fungal DNA from blood culture material. *J. Microbiol. Methods*, v. 42, n. 2, p. 139-147, 2000.
- MOTA, R. A.; PINHEIRO JÚNIOR, J. W.; SILVA, D. R. et al. Etiologia da mastite subclínica em bovinos da bacia leiteira do estado de Pernambuco. *Rev. Napgama*, v. 7, n. 1, p. 10-13, 2004.
- MYLLYS, V.; HOKANEN-BUZALSKI, T.; HUOVINEN, P. et al. Association of changes in the bacterial ecology of bovine mastitis with changes in the use of milking machines and antibacterial drugs. *Acta Vet. Scandi.*, v. 35, n. 4, p. 363-369, 1994.
- NADER FILHO, A.; HELLÚ, J. A. A.; OLIVEIRA, M. B. C. et al. Eficácia da associação Sulfametoxazol, Trimetropim e Diclofenaco de Sódio no tratamento da mastite clínica bovina. *Rev. Napgama*, v. 7, n. 1, p. 7-9, 2004.
- OLIVEIRA, A. M.; RAMOS, M. C. PCR-based ribotyping of *Staphylococcus aureus*. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 35, n. 2, p. 175-180, 2002.
- OLIVER, S.P.; MITCHELL, B.A. Prevalence of mastitis pathogens in herds participating in a mastitis control program. *J. Dairy Sci.*, v. 67, n. 10, p. 2436-2440, 1984.
- OWENS, W. E.; WATTS, J. L.; GREENE, B. B. et al. Minimum inhibitory concentrations and disk diffusion zone diameter for selected antibiotics against *Streptococci* isolated from bovine intramammary infections. *J. Dairy Sci.*, v. 73, n. 5, p. 1225-1231, 1990.
- OWENS, W. E.; RAY, C. H.; WATTS, J. L. et al. Comparison of success of antibiotic therapy during lactation and results of antimicrobial susceptibility tests for bovine mastitis. *J. Dairy Sci.*, v. 80, n.2, p. 313-317, 1997.
- PATEL, D.; ALMEIDA, R. A.; DUNLAP, J. R. et al. Bovine lactoferrin serves as a molecular bridge for internalization of *Streptococcus uberis* into bovine mammary epithelial cells. *Vet. Microbiol.*, v. 137, n. 3-4, p. 297-301, 2009.
- PEREIRA, U. P.; COSTA, G. M.; SILVA, M. A. Mastite subclínica em bovinos leiteiros do sul de Minas Gerais. In: ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITES. 4, 2007. Botucatu. *Anais...* Botucatu: FMVZ – UNESP, 2007. p. 92.
- PÉREZ-ROTH, E.; CLAVERIE-MARTÍN, F.; VILLAR, J. et al. Multiplex PCR for simultaneous identification of *Staphylococcus aureus* and detection of methicillin and mupirocin resistance. *J. Clin. Microbiol.*, v. 39, n. 11, p. 4037-4041, 2001.
- PETINAKI, E.; GUÉRIN-FAUBLÉ, V.; PICHEREAU, V. et al. Lincomycin resistance gene *lnu(D)* in *Streptococcus uberis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 52, n. 2, p. 626-630, 2008.
- PHILPOT, W. N. Economics of mastitis control. *Vet. Clin. North Am. Large Anim. Pract.*, v.6, n.2, p.233-45, 1984.

- PHILPOT, W. N.; NICKERSON, S. C. *Vencendo a luta contra a mastite*. São Paulo: Milkbizz, 2002. 192p.
- PHUEKTES, P.; MANSELL, P. D.; DYSON, R. S. et al. Molecular epidemiology of *Streptococcus uberis* isolates from dairy cows with mastitis. *J. Clin. Microbiol.*, v. 39, n. 4, p. 1460-1466, 2001a.
- PHUEKTES, P.; MANSELL, P. D.; BROWNING, G. F. Multiplex Polymerase Chain Reaction assay for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and Streptococcal causes of bovine mastitis. *J. Dairy Sci.*, v. 84, n. 2, p. 1140-1148, 2001b.
- PRATA, L. F. *Fundamentos de ciência do leite*. São Paulo: Unesp, 2001, 287p.
- PULLINGER, G. D.; COFFEY, T. J.; MAIDEN, M. C. et al. Multilocus-sequence typing analysis reveals similar populations of *Streptococcus uberis* are responsible for bovine intramammary infections of short and long duration. *Vet. Microbiol.*, v. 119, n. 2-4, p. 194-204, 2007.
- PYÖRÄLÄ, S. New strategies to prevent mastitis. *Reprod. Dom. Anim.*, v. 37, n. 4, p. 211-216, 2002.
- RAMESH, A.; PADMAPRIYA, B. P.; CHANDRASHEKAR, A. et al. Application of a convenient DNA extraction method and multiplex PCR for the direct detection of *Staphylococcus aureus* and *Yersinia enterocolitica* in milk samples. *Mol. Cel. Probes*, v. 16, n. 4, p. 307-314, 2002.
- RIFFON, R.; SAYASITH, K.; KHALIL, H. et al. Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, v. 39, n. 7, p. 2584-2589, 2001.
- RISTOW, L. E.; JÚNIOR, A. A. P.; MEIRA, F. A. Coleta de material para análise laboratorial e diagnóstico de mastite. *Revista técnica da bovinocultura de leite Leite Integral*, v. 1, n. 1, fev., 2006.
- ROMERO, C.; LOPEZ-GOÑI, I. Improved method for purification of bacterial DNA from bovine milk for detection of *Brucella* spp. by PCR. *Appl. Environm. Microbiol.*, v. 65, n. 8, p. 3735-3737, 1999.
- ROSEY, E. L.; LINCOLN, R. A.; WARD, P. N. et al. PauA: a novel plasminogen activator from *Streptococcus uberis*. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 178, n. 1, p. 27-33, 1999.
- ROSSITTO, P. V.; RUIZ, L.; KIKUCHI, Y. et al. Antibiotic susceptibility patterns for environmental *Streptococci* isolated from bovine mastitis in Central California dairies. *J. Dairy Sci.* v. 85, n. 1, p. 132-138, 2002.
- RUOFF, K. L.; WHILEY, R. A.; BEIGHTON, D. *Streptococcus*. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H. et al. *Manual of clinical microbiology*. 8. ed. Washington: American Society for Microbiology, 2003. Cap. 29, p. 405-421.
- RUPP, R.; BEAUDEAU, F.; BOICHARD, D. Relationship between milk somatic-cell counts in the first lactation and clinical mastitis occurrence in the second lactation of French Holstein cows. *Prev. Vet. Med.*, v. 46, n. 2, p. 99-111, 2000.
- SANTOS, E. M. P. *Identificação e susceptibilidade antimicrobiana de Streptococcus e gêneros relacionados isolados de mastite bovina*. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal). 2004. 81f. Escola de Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

- SANTOS, E. M. P.; BRITO, M. A. V. P.; LANGE, C. et al. *Streptococcus* e gêneros relacionados como agentes etiológicos de mastite bovina. *Acta Sci. Vet.*, v. 35, n. 1, p. 17-27, 2007.
- SCHRICK, F. N.; HOCKETT, M. E.; SAXTON, A. M. et al. Influence of subclinical mastitis during early lactation on reproductive parameters. *J. Dairy Sci.*, v. 84, n. 6, p. 1407–1412, 2001.
- SCHUKKEN, Y. H.; BENNETT, G.; GREEN, L. et al. Can somatic cell counts get too low? In: NATIONAL MASTITIS COUNCIL ANNUAL MEETING. 40, 2001. *Proceedings...* Verona: National Mastitis Council, 2001. p. 19-28.
- SEGURA, M.; GOTTSCHALK, M. Extracellular virulence factors of streptococci associated with animal diseases. *Frontiers in Bioscience*, v. 9, p. 1157-1188, 2004.
- SILVA, N. Doença da glândula mamária. In: MARQUES, D. C. *Criação de Bovinos*. 7. ed. Belo Horizonte: CVP – Consultoria Veterinária e Publicações, 2003. p. 435-451.
- SILVA, M. A. *Utilização de PCR multiplex para o diagnóstico etiológico da mastite bovina*. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva). 2008, 38 f. Escola de Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- SILVA, E. R.; SILVA, N. Coagulase gene typing of *Staphylococcus aureus* isolated from cows with mastitis in southeastern Brazil. *Can. J. Vet. Res.*, v. 69, n. 4, p. 260-264, 2005.
- SURIYASATHAPORN, W.; SCHUKKEN, Y. H.; NIELEN, M. et al. Low somatic cell count: a risk factor for subsequent clinical mastitis in a dairy herd. *J. Dairy Sci.*, v. 83, n. 6, p. 1248–1255, 2000.
- TALBOT, B. G.; LACASSE, P. Progress in the development of mastitis vaccines. *Livestock production science*, v. 98, n. 1, p. 101-113, 2005.
- TAMARAPU, S.; MCKILLIP, J. L.; DRAKE, M. Development of a Multiplex Polymerase Chain Reaction Assay for detection and differentiation of *Staphylococcus aureus* in dairy products. *J. Food Prot.*, v. 64, n. 5, p. 664-668, 2001.
- TODHUNTER, D. A.; SMITH, K. L.; HOGAN, J. S. Environmental streptococcal intramammary infections of bovine mammary gland. *J. Dairy Sci.*, v. 78, n. 11, p. 2366-2374, 1995.
- UNNERSTAD, H. E.; LINDBERG, A.; WALLER, K. P. et al. Microbial aetiology of acute clinical mastitis and agent-specific risk factors. *Vet. Microbiol.*, v. 137, n. 1-2, p. 90-97, 2009.
- VACHÉE, A.; VARON, E.; JOUY, E. et al. Sensibilité aux antibiotiques chez les streptocoques (hors pneumocoque) et les entérocoques: données Onerba. *Pathol. Biol.*, v. 57, n. 3, p. 240-244, 2008.
- YEARLY TRENDS 2001 – 2008. Veterinary Investigation Surveillance Report 2008. *Veterinary laboratories agency (VLA)*. Disponível em: <http://www.defra.gov.uk/vla/reports/rep_vida08.htm> Acesso em: dez. 2009.
- WARD, W. R.; HUGHES, J. W.; FAULL, W. B. et al. Observational study of temperature, moisture, pH and bacteria in straw bedding, and faecal consistency, cleanliness and mastitis in cows in four dairy herds. *Vet. Rec.*, v. 151, n. 7, p. 199-206, 2002.
- WARD, P. N.; LEIGH, J. A. Genetic analysis of *Streptococcus uberis* plasminogen activators. *Indian J. Med. Res.*, v. 119 Suppl., p. 136-140, 2004.

WARD, P. N.; HOLDEN, M. T. G.; LEIGH, J. A. Evidence for niche adaptation in the genome of the bovine pathogen *Streptococcus uberis*. *BMC Genomics*, v. 10, n. 54, 2009.

WATTS, J. L. Etiological agents of bovine mastitis. *Vet. Microbiol.*, v. 16, n. 1, p. 41-46, 1988.

WHITE, D. G.; McDERMOTT, P. F. Emergence and transfer of antibacterial resistance. *J. Dairy Sci.*, v. 84 (E. Suppl.), p. E151-E155, 2001

YEARLY TRENDS 2001 – 2008. Veterinary Investigation Surveillance Report 2008. *Veterinary laboratories agency (VLA)*. Disponível em: <http://www.defra.gov.uk/vla/reports/rep_vida08.htm> Acesso em: dez. 2009.

ZADOKS, R. N. Sources and epidemiology of *Streptococcus uberis*, with special emphasis on mastitis in dairy cattle. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, v. 2, n. 30, 2007.

ZADOKS, R. N.; SCHUKKEN, Y. H. *Streptococcus uberis*: environmental or contagious pathogens? In: NATIONAL MASTITIS COUNCIL ANNUAL MEETING, 42., 2003. Fort Worth. *Proceedings...* Verona: National Mastitis Council, 2003. p. 61-67.