

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE FARMÁCIA E BIOQUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO LEITE E
DERIVADOS**

Mariluce Jaguraba de Jesus Almeida

**Determinação do tipo capsular e do perfil de resistência aos antimicrobianos
em linhagens de *Streptococcus agalactiae* isoladas de amostras de leite
bovino**

**Juiz de Fora
2024**

Mariluce Jaguraba de Jesus Almeida

**Determinação do tipo capsular e do perfil de resistência aos antimicrobianos
em linhagens de *Streptococcus agalactiae* isoladas de amostras de leite
bovino**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados. Área de concentração: Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados.

Orientador: Prof. Dr. João Batista Ribeiro

Juiz de Fora

2024

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Almeida, Mariluce Jaguraba de Jesus.

Determinação do tipo capsular e do perfil de resistência aos antimicrobianos em linhagens de *Streptococcus agalactiae* isoladas de amostras de leite bovino / Mariluce Jaguraba de Jesus Almeida. -- 2024.

61 p. : il.

Orientador: João Batista Ribeiro

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, 2024.

1. Multirresistência a antimicrobianos . 2. mastite bovina. 3. tipagem. 4. diversidade genômica. 5. sorotipos. I. Ribeiro, João Batista, orient. II. Título.

Mariluce Jaguraba de Jesus Almeida

Determinação do tipo capsular e do perfil de resistência aos antimicrobianos de linhagens de *Streptococcus agalactiae* isolados de amostra de leite bovino

Dissertação
apresentada ao
Programa de Pós-
graduação em
Ciência e Tecnologia
do Leite e Derivados
da Universidade
Federal de Juiz de
Fora como requisito
parcial à obtenção do
título de Mestre
em Ciência e
Tecnologia do Leite e
Derivados. Área de
concentração: Ciência
e Tecnologia do Leite
e Derivados.

Aprovada em 30 de janeiro de 2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. João Batista Ribeiro - Orientador

Embrapa Gado de Leite

Prof. Dr. Guilherme Nunes de Souza

Embrapa Gado de Leite

Profa. Dra. Helenice Gonzalez

Universidade Federal de Pelotas

Juiz de Fora, 15/01/2024.



Documento assinado eletronicamente por **João Batista Ribeiro, Usuário Externo**, em 07/02/2024, às 16:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Helenice Gonzalez de Lima, Usuário Externo**, em 16/02/2024, às 17:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Guilherme Nunes de Souza, Usuário Externo**, em 26/02/2024, às 13:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **1665429** e o código CRC **62F4D9FF**.

“Se não puder voar, corra. Se não puder correr, ande. Se não puder andar, rasteje, mas continue em frente de qualquer jeito”. Martin Luther King

Agradecimento

Primeiramente, agradeço a Deus pelo dom da vida, por me conceder a oportunidade em avançar mais um degrau na minha vida profissional e por sempre guiar meus caminhos e me dar forças para que eu vencesse os obstáculos e dificuldades que a vida impusera.

À minha mãe, Marcionilla Maria Jaguraba e ao meu pai Joaquim Jaguraba de Jesus (*in memorian*) pela brilhante educação que foi dada a mim e aos meus irmãos, por sempre priorizarem o estudo e nos mostrar que somente através dele podemos conquistar as coisas de maneira honesta e honrosa. Aos meus queridos irmãos, Mariângela Jaguraba de Jesus, Marciléia Imaculada Jaguraba de Jesus, Michelângelo Jaguraba de Jesus e Marciélen Jaguraba de Jesus Nascimento, por todo apoio e incentivo nos momentos que precisei. Ao meu amado esposo, Carlos André de Almeida, sem você caminhando ao meu lado, conquistar esse título seria impossível. Obrigada por ser esse parceiro de vida que sempre me incentiva e me motiva a buscar sempre mais. Aos meus amados e abençoados filhos Matheus Jaguraba de Almeida e Miguel Jaguraba de Almeida, por compreenderem minha ausência e entender que tudo que faço nesta vida é pensando em vocês. Agradeço à toda minha família pelo carinho e amor.

Agradeço imensamente ao meu orientador João Batista Ribeiro, por ter confiado em mim e ter me dado essa oportunidade de alcançar esse tão sonhado título. Minha eterna gratidão a Paula Aparecida Azevedo Almeida, Bianca de Oliveira Hosken, Joice Fátima Moreira Silva e Adalgisa Ribeiro Torres (Gisa), vocês foram anjos em minha vida, obrigada por toda ajuda e compartilhamento de conhecimentos. Aprendi muito com vocês!!!! À Embrapa Gado de Leite, por sido “palco” que possibilitou aprendizados incríveis em minha caminhada acadêmica e profissional.

Meus agradecimentos ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados da Universidade Federal de Juiz de Fora, aos professores da Universidade Federal de Juiz de Fora, Embrapa e Epamig, por todos ensinamentos construídos ao longo desta caminhada.

Resumo

O sucesso das infecções por *Streptococcus agalactiae* pode ser atribuído, dentre outros fatores, à cápsula polissacarídica que é um fator de virulência, que auxilia na evasão do sistema imune e na persistência do patógeno dentro do hospedeiro. Além disso, os diversos tipos de mecanismos de resistência a antimicrobianos e a facilidade em adquirir material genético (genes) de outros microrganismos, contribuem para sua sobrevivência, mesmo na presença de certos antimicrobianos utilizados para tratamento da mastite bovina, uma das doenças mais prevalentes em rebanhos leiteiros no Brasil e que tem *S. agalactiae* como uma das principais causas. Apesar disso, informações sobre as características de *S. agalactiae* acometendo bovinos no país são escassas e a prevalência deste patógeno nos rebanhos brasileiros é alta. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi determinar o tipo capsular de cepas de *S. agalactiae* e estabelecer o perfil de resistência aos antimicrobianos utilizados para o tratamento de mastite em linhagens de *S. agalactiae* isoladas de vacas leiteiras na região da Zona da Mata Mineira e Campo das Vertentes. Mil cento e setenta ($n= 1170$) amostras de leite foram coletadas durante quatro semestres consecutivos, entre julho de 2009 e junho de 2011, em 11 fazendas leiteiras localizadas nas regiões da Zona da Mata Mineira e Campo das Vertentes. Dentre os isolados bacterianos 284 cepas foram identificadas como *S. agalactiae* por métodos bioquímicos e por PCR, sendo 141 isolados das coletas 1 e 4 (intervalo de 20 meses) usados no presente estudo. A diversidade genética dessa subpopulação foi avaliada por meio da comparação de perfis de restrição de macrofragmentos de DNA gerados pela enzima *Sma*I separados por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE). A distribuição epidemiológica de *S. agalactiae* foi inferida pela sorotipagem capsular de isolados por meio de PCR multiplex. Foram realizados testes de suscetibilidade antimicrobiana, por difusão em disco, aos antimicrobianos ampicilina, penicilina, oxacilina, cefalotina, ceftiofur, clindamicina, gentamicina, eritromicina, enrofloxacina, sulfametoxazol, sulfametoxazol+trimetoprima e tetraciclina. A presença de genes *ermA*, *ermB*, *tetO*, *tetK*, *tetL*, *tetM* e *aacA-aphD* de resistência aos antimicrobianos gentamicina, eritromicina e tetraciclina foi investigada por PCR. Entre os 97 perfis de DNA que foram digeridos pela enzima de restrição *Sma*I, 95 cepas de *S. agalactiae* apresentaram perfis de DNA geneticamente distintos, no PFGE. Dezessete isolados foram considerados geneticamente redundantes e 78 se apresentaram geneticamente não redundantes, revelando grande diversidade genética entre os isolados de *S. agalactiae*, da primeira e quarta coletas. O sorotipo capsular II foi o de maior ocorrência ($n= 34$), seguido dos sorotipos III ($n= 23$) e Ia ($n= 10$). Entre os 78 isolados de *S. agalactiae* submetidos ao antibiograma, 74 foram considerados resistentes a pelo menos um antibiótico e uma cepa (628) foi resistente a nove antimicrobianos. Cinquenta e quatro (69,2%) isolados apresentaram resistência à tetraciclina no teste fenotípico. Quarenta e seis isolados apresentaram alta resistência à tetraciclina, e carregam os genes *tetM* e *tetO*. A distribuição dos pulsotipos entre os isolados de *S. agalactiae* sugere que em alguns casos os mesmos microrganismos permaneceram no rebanho durante o período de vinte meses. Quando associado ao sorotipo/resistência antimicrobiana, o sorotipo II apresentou elevadas resistências antimicrobiana a eritromicina (65,8%), tetraciclina (59,2%), e gentamicina (45,1%). Estudos sobre avaliação da diversidade genética, sorotipagem capsular e suscetibilidade antimicrobiana de linhagens de *S. agalactiae* isoladas de bovinos leiteiros, em diferentes regiões do Brasil, se fazem necessários, a fim de conhecer melhor a biologia deste patógeno visando desenvolver e implementar novas opções de prevenção e tratamento para mastite causada por *S. agalactiae*.

Palavras-chave: Multirresistência a antimicrobianos, mastite bovina, tipagem, diversidade genômica, sorotipos.

Abstract

The success of *Streptococcus agalactiae* infections can be attributed to the polysaccharide capsule (CPS), which is one of the virulence factors, capable of enabling evasion of the immune system and the persistence of the pathogen within the host. Furthermore, the different types of antimicrobials resistance mechanisms and the ease of acquiring genetic material (genes) from other microorganisms contribute to its survival, even in the presence of certain antimicrobials used for the treatment of bovine mastitis, one of the most prevalent diseases in dairy herds in Brazil, with *S. agalactiae* being one of the main causes. Nevertheless, information about the characteristics of *S. agalactiae* affecting cattle in the country is scarce and the prevalence of this pathogen in Brazilian herds is high. Thus, the aim of the present study was to determine the capsular serotyping of *S. agalactiae* strains and establish the antimicrobial resistance profile used for mastitis treatment in *S. agalactiae* isolates from dairy cows in the Zona da Mata Mineira and Campo das Vertentes regions. One thousand one hundred and seventy (n= 1170) milk samples were collected during four consecutive semesters, between the years 2009 and 2011, on 11 dairy farms located in Zona da Mata Mineira and Campo das Vertentes regions. Among the bacterial isolates, 284 strains were identified as *S. agalactiae* through biochemical methods and PCR, with 141 isolates from collects 1 and 4 (20 months interval) used in the present study. The genetic diversity of this subpopulation was assessed by comparing restriction profiles of DNA macrofragments generated by the *Sma*I enzyme separated by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). The epidemiological distribution of *S. agalactiae* was inferred by capsular serotyping of isolates using multiplex PCR. Antibiotic susceptibility tests were performed by disk diffusion for the antimicrobials ampicillin, penicillin, oxacillin, cephalothin, ceftiofur, clindamycin, gentamicin, erythromycin, enrofloxacin, sulfamethoxazole, sulfamethoxazole+trimethoprim and tetracycline. Resistance genes to the most prevalent antimicrobials (gentamicin, erythromycin and tetracycline) were evaluated by PCR, using the genetic markers *ermA*, *ermB*, *tetO*, *tetK*, *tetL*, *tetM* and *aacA-aphD*. Among the 97 DNA profiles that were digested by *Sma*I restriction enzyme, 95 strains of *S. agalactiae* presented genetically distinct DNA profiles in PFGE. Seventeen isolates were considered genetically redundant and 78 were genetically non-redundant, revealing great genetic diversity between *S. agalactiae* isolates from the first and fourth collection. Serotype II was the most prevalent (n= 34), followed by serotypes III (n= 24) and Ia (n= 10). Among the 78 *S. agalactiae* isolates subjected to antibiogram, 74 were considered resistant to at least one antibiotic, and one strain (628) was resistant to nine antimicrobials. Fifty-four (69,2%) isolates showed resistance to tetracycline in the phenotypic test. Forty-six (58,9%) isolates showed high resistance to tetracycline and carried the *tetM* and *tetO*. The distribution of pulsotypes among *S. agalactiae* isolates suggests that, in some cases, the same microorganisms remained in the herd over a period of twenty-months. When associated with serotype/antimicrobial resistance, serotype II showed high resistance to the antibiotics erythromycin (65,8%), tetracycline (59,2%) and gentamicin (45,1%). Studies on the assessment of genetic diversity, capsular serotyping and antimicrobial susceptibility of *S. agalactiae* strains isolated from dairy cattle in different regions of Brazil are necessary in order to better understand the

biology of this pathogen with a view to developing and implementing new prevention and treatment options for mastitis caused by *S. agalactiae*.

Keywords: Multiresistance to antimicrobials, bovine mastitis, genomic diversity, serotypes, typing.

Lista de Tabelas

- Tabela 1- Genes alvo e primers usados para amplificar genes de resistência antimicrobiana isolados de *S. agalactiae*Pág. 21
- Tabela 2- Distribuição geográfica das amostras recuperadas do leite de bovinos das 11 fazendasPág. 23
- Tabela 3- Distribuição dos pulsotipos entre isolados de *S. agalactiae* recuperados de bovinos no sudeste de Minas Gerais, Brasil..... Pág. 28
- Tabela 4- Distribuição dos sorotipos capsulares de linhagens de *S. agalactiae* por municípios da Zona da Mata e Campos das Vertentes..... Pág. 29
- Tabela 5- Tabela 5. Perfis de multirresistência de *S. agalactiae* isolados de amostras de leite, da primeira e quarta coletas de fazendas localizadas na Zona da mata e Campos das Vertentes..... Pág. 30
- Tabela 6- Descrição dos antimicrobianos prevalentes de acordo com os sorotipos capsulares das linhagens de *S. agalactiae* em fazendas da Zona da Mata e Campos das Vertentes..... Pág. 46

Lista de Figuras

Figura 1- Mapa da Distribuição Geográfica de *S. agalactiae* Isolados em Amostras de Leite Bovino provenientes de fazendas leiteiras localizadas nas regiões da Zona Mata Mineira e Campos das Vertentes..... Pág. 24

Figura 2- Dendrograma mostrando padrões de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) para *S. agalactiae* isolados de amostras de leite bovino de 11 fazendas leiteiras localizadas nas regiões da Zona da Mata Mineira e Campos das Vertentes..... Pág. 26 e 27

Figura 3- Correlação entre fenótipos de resistência antimicrobiana e sorotipos capsulares de *S. agalactiae* isolados de leite bovino de fazendas da Zona da Mata Mineira e Campos das Vertentes..... Pág.45

1 INTRODUÇÃO

A mastite bovina é uma das doenças infecciosas mais frequentes e que mais traz prejuízos econômicos para as fazendas leiteiras, tanto no Brasil quanto no mundo (Keefe, 2012; Minist *et al.*, 2012; Fonseca *et al.*, 2021). *Streptococcus agalactiae* (*Estreptococo* do grupo B de Lancefield [EGB]) é um dos principais patógenos contagiosos envolvidos, na maioria das vezes, na mastite subclínica (MS) em bovinos, e é responsável por causar grande impacto na qualidade (com elevada contagem de células somáticas) e na produção de leite (Keefe, 2012; Sá *et al.*, 2018). Além de agente etiológico da mastite bovina, o *S. agalactiae* tem grande importância na saúde pública, uma vez que algumas linhagens desse patógeno são responsáveis por causar uma série de infecções em humanos, incluindo infecções invasivas neonatal, septicemia, celulite, meningite e pneumonia (Zadoks *et al.*, 2011; Yao *et al.*, 2013).

Apesar dos numerosos programas de erradicação de *S. agalactiae* existentes, a prevalência do patógeno em rebanhos brasileiros é alta, tendo sido isolado em diferentes regiões do país, com porcentagem que variam entre 3,2% a 67% (Keefe, 2012; Sá *et al.*, 2018; Mesquita *et al.*, 2019). Na região Sudeste do Brasil, este microrganismo tem sido considerado um dos principais patógenos da mastite com base nos rebanhos leiteiros estudados (Carvalho-Castro *et al.*, 2017; Tomazi, 2017). O controle desta bactéria nos rebanhos leiteiros bovinos ainda é um desafio para o país, portanto, estudos que visam a tipagem epidemiológica, o que envolve a sorotipagem capsular, e o perfil fenotípico e genotípico de resistência a antimicrobianos se fazem necessários.

Por outro lado, em países com a pecuária desenvolvida e que adotaram medidas efetivas de controle e biossegurança, a prevalência do *S. agalactiae* nos rebanhos infectados foi reduzida, em torno de 1,6% (Riekerink *et al.*, 2006; Keefe, 2012). Nos países como Canadá, Reino Unido e norte da Europa, foram implementados programas de controle e prevenção de *S. agalactiae*. Tais programas se concentraram na identificação dos bovinos infectados e tratamento dos mesmos com antimicrobianos, e também na prevenção da transmissão de *S. agalactiae* durante a ordenha, levando a quase eliminação deste patógeno nestas áreas (Crestani *et al.*, 2021). Contudo, estudos relataram o reaparecimento desse patógeno no norte da Europa, e apontam que a principal fonte da reintrodução nos rebanhos leiteiros foi através do homem, que pode atuar como fonte de infecção para o gado

35 (Zadoks *et al.*, 2011; Tomazi *et al.*, 2018). Além da reintrodução de origem humana,
36 outros fatores também podem contribuir para isto, como tratamento inadequado de
37 animais doentes e variações genéticas nas cepas bacterianas causadoras da mastite,
38 que resultam em diferentes potenciais patogênicos e de virulência das cepas,
39 incluindo resistência a antimicrobianos (Rossi *et al.*, 2019). Como não há nenhum
40 estudo brasileiro que forneça uma visão nacional das características fenotípicas e
41 genotípicas de isolados circulantes de *S. agalactiae* em bovinos, este estudo traz
42 informações sobre o sorotipo capsular e o perfil de resistência antimicrobiana de *S.*
43 *agalactiae* de uma área restrita no Brasil, que pode contribuir, no futuro, para estudo
44 de caracterização nacional dessas cepas.

45 Diversos métodos de tipagem molecular são utilizados em investigações
46 epidemiológicas e contribuem para compreensão de fatores relacionados a biologia e
47 patogênia do hospedeiro. Um dos fatores frequentemente relacionados ao potencial
48 patogênico, de virulência e perfis de suscetibilidade a antimicrobianos de cepas de *S.*
49 *agalactiae* é a genotipagem capsular (Burtet, 2019). A genotipagem capsular é
50 considerada altamente adequada para investigações epidemiológicas porque os
51 sorotipos podem ser identificados na presença ou ausência de expressão de
52 polissacarídeos capsulares (CPS) (Carvalho-Castro *et al.*, 2017). Atualmente são
53 conhecidos dez desses sorotipos (Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX), os quais podem
54 variar conforme a região geográfica, tempo e grupos populacionais estudados (Burtet,
55 2019; Metcalf *et al.*, 2017). Tendo na pesquisa observada a utilização dessa
56 ferramenta para determinar o tipo capsular de cepas de *S. agalactiae*, em diferentes
57 regiões do Brasil, estudo de sorotipagem capsular, realizado por Carvalho-Castro *et al.*
58 *al.* (2017) nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Paraná e Pernambuco,
59 determinou que o sorotipo III foi o mais frequente entre *S. agalactiae* isolados de
60 amostras de leite. Já o sorotipo V foi o mais prevalente entre os isolados bovinos dos
61 estados do Rio de Janeiro, São Paulo e Santa Catarina, de acordo com Pinto *et al.*
62 (2013).

63 Uma importante abordagem para caracterização de grupos populacionais de *S.*
64 *agalactiae* consiste na análise de perfis gerados pela atuação de enzimas de restrição,
65 (principalmente *Sma*I) por meio do PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*). Tal
66 técnica permite analisar grandes populações e verificar possíveis relações genéticas
67 entre as linhagens de acordo com o padrão de fragmentação do seu material genético,
68 a fim de selecionar isolados geneticamente não redundantes para análises posteriores

69 (Gandra *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2018). Nos últimos anos, estudos são realizados
70 para avaliar a diversidade genética de *S. agalactiae* de origem bovina, utilizando
71 ferramentas moleculares. Com base no PFGE, Duarte *et al.* (2004) revelou 47 perfis
72 de digestão *Sma*I entre 64 isolados de leite bovino em 3 estados da região sudeste
73 (Minas Gerais, São Paulo e Rio de Janeiro).

74 A resistência a antimicrobianos também é um importante aspecto a ser
75 analisado, pois não só pode estar associada à permanência de *S. agalactiae* nos
76 rebanhos, como é reconhecida com uma grande preocupação de saúde global (World
77 Health Organization, 2014). A emergência da resistência a antimicrobianos é um
78 fenômeno complexo, que envolve a interação entre humanos, animais, bactérias,
79 medicamentos e o meio ambiente. Antimicrobianos são comumente utilizados na
80 pecuária animal para curar ou prevenir infecções bacterianas, mas o uso
81 indiscriminado pode exercer uma pressão seletiva, resultando na adaptação da
82 bactéria às mudanças ambientais (Rozman *et al.*, 2020). Essa adaptação pode
83 acontecer com a aquisição de genes de resistência a antimicrobianos de outra
84 bactéria, através do mecanismo de transferência horizontal, o que contribui para a
85 emergência e propagação de bactérias antibiótico-resistentes (Colautti *et al.*, 2022).

86 Por este motivo, estudos epidemiológicos têm avaliado não só o fenótipo de
87 resistência aos antimicrobianos utilizados para tratamento da mastite bovina causada
88 por *S. agalactiae*, como também os genes de resistência a esses antimicrobianos.
89 Com base nisso, em estudo realizado por Pinto *et al.* (2013), observou isolados
90 bovinos resistentes aos seguintes antimicrobianos: clindamicina (20,7%), eritromicina
91 (27,6%) e tetraciclina (89,6%), nos estados do Rio de Janeiro, São Paulo e Santa
92 Catarina.

93 Até o presente momento, poucos dados estão disponíveis sobre a diversidade
94 genética, sorotipagem capsular e suscetibilidade antimicrobiana de linhagens de *S.*
95 *agalactiae* circulantes em fazendas leiteiras no Brasil. Carvalho-Castro *et al.* (2017)
96 avaliaram a epidemiologia molecular de *S. agalactiae* isolados de 36 fazendas
97 localizadas nas regiões de Minas Gerais, São Paulo, Paraná e Pernambuco. Pinto *et*
98 *al.* (2013) avaliaram a distribuição de sorotipos e a suscetibilidade a antimicrobianos
99 de *S. agalactiae* de origem humana e animal de diferentes estados do Brasil. No
100 entanto, o estudo foi realizado entre 1980 e 2006, além de não incluir isolados
101 oriundos de Minas Gerais.

102 A fim de desenvolver melhores opções de tratamento e prevenção para animais
103 portadores de *S. agalactiae* causadores de mastite bovina no Brasil, e também
104 diminuir os impactos relacionados a saudabilidade (transferência de genes de
105 resistência a antimicrobianos) e financeiro (prejuízos na produção de leite) dos
106 produtores, estudos que permitem o conhecimento do tipo, patogenicidade e
107 suscetibilidade antimicrobiana de cepas de *S. agalactiae* relacionados à mastite
108 bovina precisam ser desenvolvidos, no intuito de traçar um projeto futuro, com a
109 criação de um banco de dados nacional que reúna informações como perfil de
110 resistência, tipo capsular de cepas de *S. agalactiae* circulantes em fazendas leiteiras
111 no Brasil. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi determinar a sorotipagem
112 capsular de cepas de *S. agalactiae* e estabelecer o perfil de resistência aos
113 antimicrobianos utilizados para o tratamento de mastite em linhagens de *S. agalactiae*
114 isoladas de vacas leiteiras na região da Zona da Mata Mineira e Campo das Vertentes
115 entre os anos de 2009 e 2011.

116

117

118

119

120

121

122

123

124

125

126

127

128

129

130

131

132

133

134

135

136 2 MATERIAL E MÉTODOS

137

138 2.1 Coleta, transporte de amostra e isolamento

139

140 Os isolados bacterianos utilizados neste estudo foram obtidos por meio do
141 isolamento a partir de amostras compostas de leite, obtidas em 4 coletas realizadas
142 em intervalos de 6 meses, entre os anos de 2009 e 2011, em rebanhos de diferentes
143 fazendas ($n=11$) localizadas no estado de Minas Gerais, na região da Zona da Mata
144 Mineira e Campo das Vertentes.

145 As fazendas apresentavam características diferentes quanto ao padrão racial,
146 processo de ordenha, número de animais lactantes e manejo. As amostras foram
147 coletadas após a limpeza dos tetos, descartando os primeiros jatos de leite e
148 realizando a assepsia dos tetos com algodão embebido em álcool 70%. Em seguida,
149 foram coletados aproximadamente 10 mL de leite em frascos estéreis e transportados
150 sob refrigeração em caixas térmicas contendo gelo reciclável até o Laboratório de
151 Microbiologia do Leite da Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora, Minas Gerais,
152 Brasil, onde foram utilizados para posteriores análises microbiológicas. No laboratório
153 as amostras foram congeladas e mantidas a -20°C até o processamento.

154 Para o isolamento dos agentes da mastite, 0,1 mL de leite de cada amostra foi
155 inoculada em ágar sangue de ovelha a 5% por meio de esfregaço e foi realizada a
156 contagem de colônias 24 e 48 horas após a incubação a 35°C . Pequenas colônias de
157 cerca de 0,5–1 mm, translúcidas, com hemólise α ou β e suspeitas de serem *S.*
158 *agalactiae* foram sub cultivadas para análise microscópica pela coloração de Gram. A
159 identificação de isolados da espécie *S. agalactiae* foi realizada através de testes de
160 rotina, como morfologia das colônias, hemólise em ágar 5% de sangue de carneiro
161 v/v, coloração de Gram, catalase, CAMP, hipurato, testes de hidrólise de esculina e
162 crescimento em NaCl a 6,5%.

163 A fim de confirmar a identidade dos isolados identificados presuntivamente
164 como *S. agalactiae*, foi realizada a amplificação da reação em cadeia da polimerase
165 (PCR) de partes específicas da espécie do gene que codifica o 16S rRNA, a região
166 espaçadora intergênica 16S-23S rDNA (Abdulmawjood e Lämmeler, 1999). Uma cepa
167 ATCC de *S. agalactiae* (ATCC 12386) foi utilizada como controle positivo da PCR. Os
168 isolados identificados como *S. agalactiae* foram mantidos como suspensões em

169 solução de leite desnatado a 10% (Difco Laboratories, Detroit, Michigan) contendo
170 10% de glicerol a -20°C.

171 Para reativação dos isolados de *S. agalactiae*, estes foram cultivados em ágar
172 triptona de soja (Himedia® India), suplementados com 5% de sangue ovino a 37°C
173 durante 48 horas. Após esse período, foram inoculados em caldo BHI (Brain Heart
174 Infusion) (Sigma-Aldrich®, India) a 37°C por 48 horas, para que a extração do DNA
175 genômico fosse realizada de acordo com o protocolo padrão para extração de
176 bactérias Gram-positivas, do kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega®,
177 Estados Unidos).

178 O acesso ao patrimônio genético foi realizado em conformidade com os
179 requisitos da Lei 13.123/2015 cadastro número A19AFEA.

180

181

182 **2.2 Caracterização molecular de isolados de *S. agalactiae* por eletroforese em** 183 **gel de campo pulsado (PFGE)**

184

185 A fim de evitar o uso de linhagens geneticamente redundantes, foi realizada
186 uma triagem molecular dos isolados de *S. agalactiae* por meio da clivagem do genoma
187 por enzimas de restrição (*Sma*I ou *Sal*I) seguida de separação de macro fragmentos
188 de DNA por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) conforme descrito por
189 Benson e Ferrieri (2001), com modificações. Resumidamente, os isolados foram
190 cultivados em placas de Petri contendo ágar BHI a 37 °C durante 18 a 24 h. Após o
191 crescimento, as células foram raspadas da superfície do ágar e preparada uma
192 suspensão de células em tampão TE (Tris 100 mM, EDTA 100 mM, pH 7.6) com
193 densidade óptica (DO₆₁₀) entre 2,0 e 2,2. Em seguida, 250 µL da suspensão foram
194 adicionados 2 µl de lisozima (10 mg/ml) (Sigma), e o tubo incubado a 37°C durante 15
195 minutos. Após incubação, adicionou-se à suspensão 5 µl de proteinase K (20 mg/ml)
196 (Sigma), 20 µl de mutanolisina (1 mg/ml) (Sigma) e 250 µl de agarose de baixo ponto
197 de fusão 2,0% preparada em tampão TE. Esta mistura foi imediatamente adicionada
198 em formas de acrílico para formação de blocos de agarose embebidos com os
199 isolados bacterianos. Estes foram incubados em 1,0 ml de tampão ES (0,5 M EDTA
200 [pH 8.0], 1% n-lauril sarcosina) e 50 µl de proteinase K (20 mg/ml) em um banho de
201 água a 55 °C por 90 min, com agitação branda. Os plugs foram lavados uma vez a 55
202 °C durante 15 min com água deionizada estéril e três vezes à mesma temperatura

203 com tampão TE (Tris 10 mM e EDTA 1 mM, pH 7.6). As fatias de plugs de 2 a 5 mm
204 lavadas foram digeridas com 20 U de endonuclease *Sma*I por pelo menos 6 horas, de
205 acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen). Posteriormente, plugs foram
206 fixados no pente, e a solução de agarose 1%, previamente fundida, foi vertida no
207 molde do gel. Os fragmentos foram separados por PFGE em gel de agarose 1,2% em
208 um sistema CHEF-DRIII (Bio-Rad) com tempos de pulso aumentando de 5 a 60 s em
209 13,5 h (fase 1) e de 1 a 3 s em 9,5 h (fase 2) a 14 °C com um gradiente de voltagem
210 de 6 V/cm. Após a eletroforese, os géis foram corados com brometo de etídio 0,01%,
211 fotografados sob luz ultravioleta e documentados com auxílio do Sistema de
212 fotodocumentação L'PIX (Loccus®).

213 Além da inspeção visual, conforme sugerido por Tenover *et al.* (1995), as
214 imagens dos géis anteriormente fotodocumentadas, foram utilizadas para construção
215 de dendrogramas utilizando o software *Bionumerics* V. 6.0 (Applied Maths, Kortrijk,
216 Belgium) para análise por comparação dos *fingerprints* gerados. Os valores de
217 similaridade genética foram calculados pelo coeficiente de Jaccard e estes foram
218 utilizados para gerar o dendrograma de similaridade pelo método UPGMA
219 (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean). Foi estabelecido um limite
220 mínimo de 80% de similaridade ($\geq 80\%$) para que as amostras clusterizadas a partir
221 dessa porcentagem fossem consideradas de mesma linhagem, ou seja,
222 geneticamente redundantes. A partir da análise dos dendrogramas e da observação
223 dos isolados geneticamente redundantes, 78 linhagens geneticamente distintas foram
224 selecionadas.

225

226

227 **2.3 Pesquisa dos sorotipos capsulares por PCR multiplex**

228

229 A determinação dos sorotipos capsulares de *S. agalactiae* foram utilizadas 78
230 linhagens de *S. agalactiae* selecionadas a partir do PFGE para realização da PCR
231 multiplex conforme descrito por Imperi *et al.* (2010), com adaptações. Para isso, foram
232 utilizados conjuntos de primers de PCR específicos para identificação dos sorotipos
233 Ia, Ib, II ao IX. As amostras do DNA bacteriano foram extraídas de acordo com Almeida
234 (2018). A mistura da reação consistiu de 5 μ L de tampão 10x (Tris-HCl 200 mM, pH
235 8.4, KCl 500 mM), 80 μ M de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 1,5 mM de
236 $MgCl_2$, 0,2 μ M de cada oligonucleotídeo, 1 U da enzima Taq DNA polymerase

237 Platinum (Life Technologies), 1 µL de DNA (25ng/µL) e água estéril deionizada em
238 quantidade suficiente para um volume final de reação de 50 µL. As ampliações
239 foram realizadas em um termociclador de gradiente Eppendorf Mastercycler
240 (Eppendorf, Alemanha) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 1
241 min e extensão final a 72°C por 10 min, totalizando 35 ciclos. Cada ciclo consistiu em
242 desnaturação a 94°C por 30 s, anelamento a 55°C por 30 s e extensão de 72°C por 1
243 min. Uma alíquota (5 µL) do produto de amplificação foi submetida a eletroforese em
244 gel de agarose a 2%. Os géis foram corados com brometo de etídio 0,01%,
245 fotografados sob luz ultravioleta e documentados com auxílio do Sistema de
246 fotodocumentação L'PIX (Loccus®).

247

248

249 **2.4 Perfil de suscetibilidade de *Streptococcus agalactiae* aos antimicrobianos**

250

251 Para esse teste, foram utilizadas 78 linhagens de *S. agalactiae* selecionadas
252 mediante a análise dos perfis de restrição por PFGE. A suscetibilidade antimicrobiana
253 das linhagens foi determinada pelo método de difusão em disco utilizando ágar
254 Mueller-Hinton (MH) (Merck, Alemanha) e discos disponíveis comercialmente CECON
255 (São Paulo, Brasil) contendo antimicrobianos de acordo com as diretrizes do *Clinical*
256 *and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2018). Os seguintes antimicrobianos foram
257 testados: ampicilina (10 µg), penicilina G (10 µg), oxacilina (1 µg), cefalotina (30 µg),
258 ceftiofur (30 µg), clindamicina (2 µg), gentamicina (10 µg), eritromicina (15 µg),
259 enrofloxacina (5 µg), sulfametoxazol (25 µg), sulfametoxazol-trimetoprima (25 µg) e
260 tetraciclina (30 µg). Uma alíquota da cultura de *S. agalactiae* cultivada por 18 horas
261 foi diluída em solução salina 0,85%, em uma DO de 600 nm (10^8 UFC/mL) em
262 equivalente espectrofotômetro, que corresponde a uma solução padrão 1,0
263 McFarland. Após, 200 µL da solução foram distribuídos sobre placas contendo ágar
264 MH com auxílio de swab estéril. Os discos foram colocados nas placas contendo o
265 microrganismo previamente distribuído com swab, com auxílio de uma pinça
266 previamente flambada, mantendo uma distância de 2,5cm entre os discos. Feito isso
267 e aguardados 15 minutos para a adsorção dos antimicrobianos, as placas foram
268 incubadas a 35 °C por 24 horas. A linhagem de *S. agalactiae* ATCC 12386 foi utilizada
269 como controle positivo e foi cultivada em ágar MH sem disco antimicrobiano. Após a
270 incubação, os diâmetros da zona de inibição nas placas de Petri foram medidos

271 utilizando uma régua estéril e depois as linhagens de *S. agalactiae* foram classificados
272 como suscetíveis, intermediários ou resistentes de acordo com os critérios do CLSI
273 (2018). Linhagens com halo intermediário foram consideradas resistentes.

274

275 **2.5 Detecção de genes de resistência a Eritromicina, Tetraciclina e Gentamicina** 276 **por PCR convencional**

277

278 Linhagens de *S. agalactiae* considerados resistentes à eritromicina, tetraciclina
279 e gentamicina de acordo com o teste fenotípico, foram avaliados quanto à presença
280 de genes de resistência a esses antimicrobianos por PCR. Para isso, foram extraídas
281 e diluídas (20 ng/ul) amostras do DNA bacteriano de acordo com Almeida (2018). Os
282 conjuntos de iniciadores (sintetizados por Síntese Biotecnologia) podem ser
283 observados na tabela 1.

284 A detecção dos genes *tetK*, *tetL*, *tetM* e *tetO*, relacionados a resistência à
285 tetraciclina, foi realizada de acordo com as reações descritas por Trzcinski *et al.*
286 (2000). Para detecção dos genes *ermB* e *ermA*, relacionados à resistência a
287 eritromicina, foram realizadas PCR de acordo com Sutcliffe *et al.* (1996) e Seppa
288 (1998), respectivamente. E para a detecção dos genes *aphA3* e *aad-6*, relacionados
289 à resistência a aminoglicosídeos, foram utilizadas as reações descritas por Poyart *et*
290 *al.* (1995) e Poyart-Salmeron *et al.* (1990), respectivamente. Já para a detecção do
291 gene *aacA-aphD*, também relacionado à resistência à gentamicina, a PCR foi
292 realizada de acordo com Strommenger *et al.* (2003).

293 A separação eletroforética foi realizada em gel de agarose a 1,5%, 80V. Os géis
294 foram corados com brometo de etídio 0,01% e fotodocumentados com auxílio do
295 Sistema de fotodocumentação L'PIX (Loccus®).

296

297

298

299

300

301

302

303

304

305

306

307

308

309

310

311 Tabela 1. Genes alvo e primers usados para amplificar genes de resistência
 312 antimicrobiana isolados de *S. agalactiae*
 313

Tipo de gene e gene alvo	Sequência (5' - 3')	Tamanho do amplicon (pb)	Temperatura de anelamento (°C)	Referências
Genes de resistência à Eritromicina	-	-	-	-
<i>ermA</i>	F: GCA TGA CAT AAA CCT TCA R: AGG TTA TAA TGA AAC AGA	206	52	Seppa, 1998
<i>ermB</i>	F: GAA AAG GTA CTC AAC CAA ATA R: AGT AAC GGT ACT TAA ATT GTT TAC	639	52	Sutcliffe <i>et al.</i> , 1996
Genes de resistência à Tetraciclina	-	-	-	-
<i>tetK</i>	F: TAT TTT GGC TTT GTA TTC TTT CAT R: GCT ATA CCT GTT CCC TCT GAT AA	1159	50	Trzcinski <i>et al.</i> ; 2000
<i>tetL</i>	F: ATA AAT TGT TTC GGG TCG GTA AT R: AAC CAG CCA ACT AAT GAC AAT GAT	1077	50	Trzcinski <i>et al.</i> ; 2000
<i>tetM</i>	F: AGT TTT AGC TCA TGT TGA TG R: TCC GCA TAT TTA GAC GG	1862	50	Trzcinski <i>et al.</i> ; 2000
<i>tetO</i>	F: AGC GTC AAA GGG GAA TCA CTA TCC R: CGG CGG GGT TGG CAA ATA	1723	55	Trzcinski <i>et al.</i> ; 2000
Genes de resistência à Aminoglicosídeos	-	-	-	-
<i>aphA3</i>	F: GGG GTA CCT TTA AAT ACT GTA G R: TCT GGA TCC TAA AAC AAT TCA TCC	848	65	Poyart <i>et al.</i> ; 1995
<i>aad-6</i>	F: AGA AGA TGTA ATA ATA TAG R: CTG TAA TCA CTG TTC CCG CCT	978	65	Poyart-Salmeron <i>et al.</i> ; 1990
<i>aacA-aphD</i>	F: TAATCCAAGAGCAATAAGGGC R: GCCACACTATCATAACCACTA	228	55	Strommenger <i>et al.</i> 2003

314

315

316

317

318

319

320

321 **3 RESULTADOS**

322

323 **3.1 Características fenogenóticas dos isolados de *S. agalactiae***

324

325 Dentre os isolados obtidos do cultivo em ágar sangue, 284 isolados das quatro
326 coletas apresentaram-se como gram-positivos, catalase negativos, teste CAMP e
327 hipurato positivos, hidrólise de esculina negativo, crescimento em NaCl,
328 características de *S. agalactiae*, sendo assim identificados presuntivamente. Para o
329 presente estudo, foram selecionados isolados da primeira e quarta coleta, totalizando
330 141 isolados identificados presuntivamente como *S. agalactiae*. Dentre os 141
331 isolados, todos (100%) amplificaram o fragmento de 120 pb, que se relaciona à região
332 geneticamente mais diversificada altamente variáveis em termos de sequência e
333 tamanho, o que corresponde a um resultado positivo para a presença da região
334 espaçadora intergênica 16S-23S rDNA em *S. agalactiae*. A distribuição geográfica das
335 amostras utilizadas neste estudo, podem ser visualizadas na tabela 2 e figura 1.

336

337

338

339

340

341

342

343

344

345

346

347

348

349

350

351

352

353

354 **Tabela 2. Distribuição geográfica das amostras recuperadas do leite de bovinos das 11**
 355 **fazendas**

Fazendas	Região	Número de isolados		
		1ª Coleta (Jul-dez. 2009)	4ª Coleta (Jan-jun. 2011)	Nº total de amostras por fazenda
I	21° 13' 35" Sul, 43° 46' 27" Oeste	10	11	21
II	21° 36' 21" Sul, 43° 45' 26" Oeste	03	-	03
III	21° 33' 36" Sul, 43° 55' 24" Oeste	10	13	23
IV	21° 33' 36" Sul, 43° 55' 24" Oeste	20	17	37
V	21° 33' 36" Sul, 43° 55' 24" Oeste	01	02	03
VI	21° 50' 54" Sul, 43° 48' 27" Oeste	-	-	0
VII	22° 5' 21" Sul, 43° 49' 39" Oeste	12	15	27
VIII	22° 5' 21" Sul, 43° 49' 39" Oeste	08	06	14
IX	22° 5' 21" Sul, 43° 49' 39" Oeste	-	06	06
X	21° 45' 51" Sul, 43° 20' 59" Oeste	-	02	02
XI	21° 43' 45" Sul, 43° 4' 2" Oeste	02	03	05
			Total	141

356
357

358

359

360

361

362

363

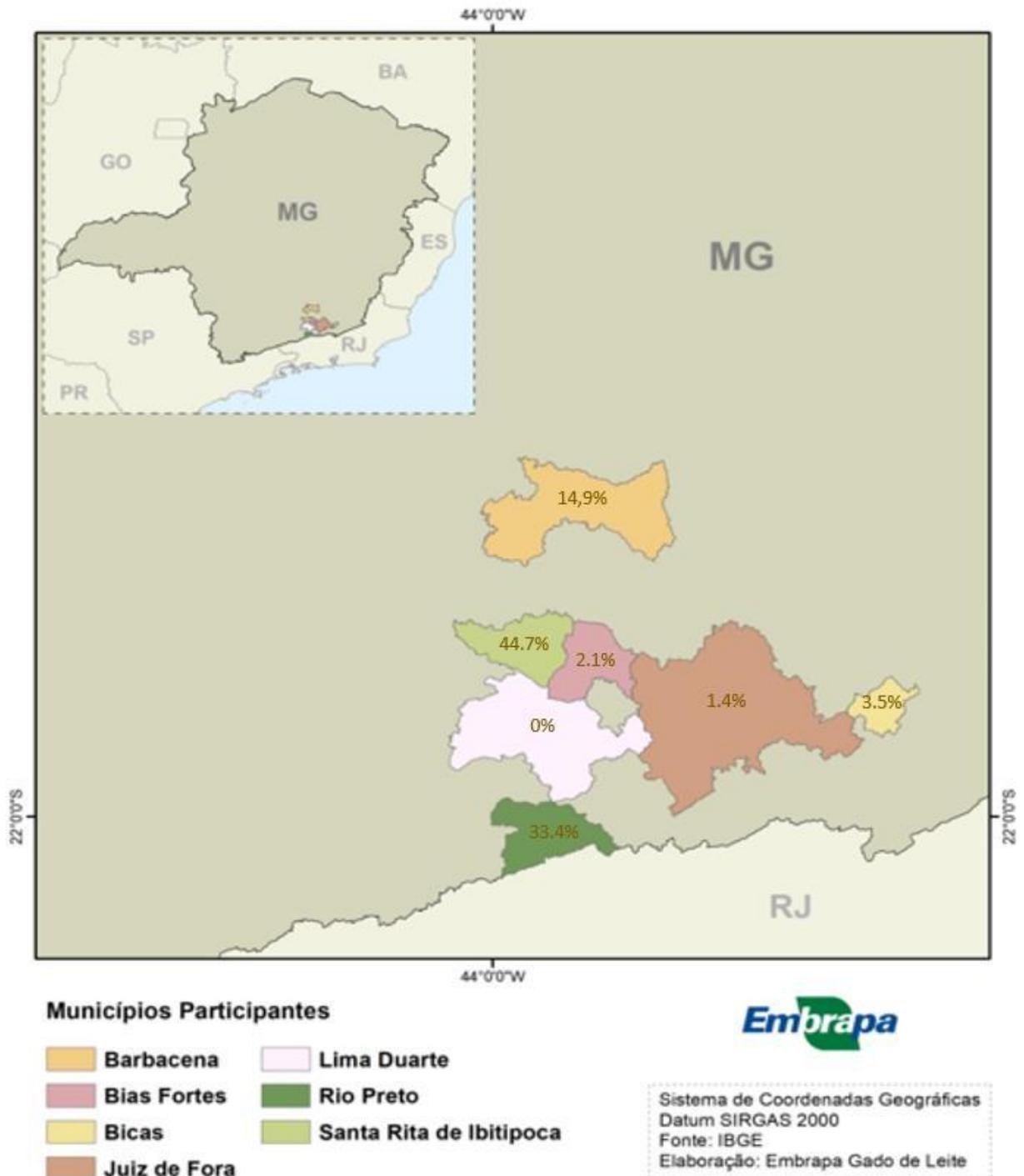
364

365

366

367

368



369

370

371

372

373

374

375

Figura 1. Mapa da Distribuição Geográfica de *Streptococcus agalactiae* Isolados em Amostras de Leite Bovino provenientes de fazendas leiteiras localizadas nas regiões da Zona Mata Mineira e Campo das Vertentes. O mapa foi gerado usando o Programa Arcgis versão 10.5

376 **3.2 Análise dos perfis de restrição do DNA cromossômico por PFGE**

377

378 Na caracterização molecular, entre 141 isolados *S. agalactiae* da primeira e
379 quarta coletas, submetidos à análise de PFGE. Para 44 isolados (30,71%), as
380 amostras de DNA se apresentaram sem digestão efetiva pela enzima de restrição
381 *Sma*I (Tabela 3) e para 97 cepas de *S. agalactiae* as amostras de DNA foram clivadas
382 completamente por esta enzima de restrição. Através do PFGE, foram identificados
383 95 perfis de DNA geneticamente distintos entre as 97 cepas de *S. agalactiae*, cujos
384 DNAs foram clivados pela *Sma*I. Dezesete desses perfis foram organizados em 8
385 *clusters* com base em seus perfis genéticos nomeados por letras alfabéticas de A –
386 H, de acordo com Duarte *et al.* (2004) (Figura 2). A partir da análise do PFGE, foram
387 selecionados 78 isolados de *S. agalactiae* geneticamente não redundantes para
388 realização das análises do sorotipo capsular, perfil fenotípico de suscetibilidade
389 antimicrobiana e pesquisa de genes de resistência. Alguns *S. agalactiae* coletados no
390 mesmo rebanho, mas em tempos distintos, apresentaram o mesmo pulstipo (Tabela
391 3). Em geral, isolados de um mesmo rebanho apresentaram perfis de PFGE mais
392 intimamente relacionados entre si do que aqueles isolados de animais em rebanhos
393 distintos.

394

395

396

397

398

399

400

401

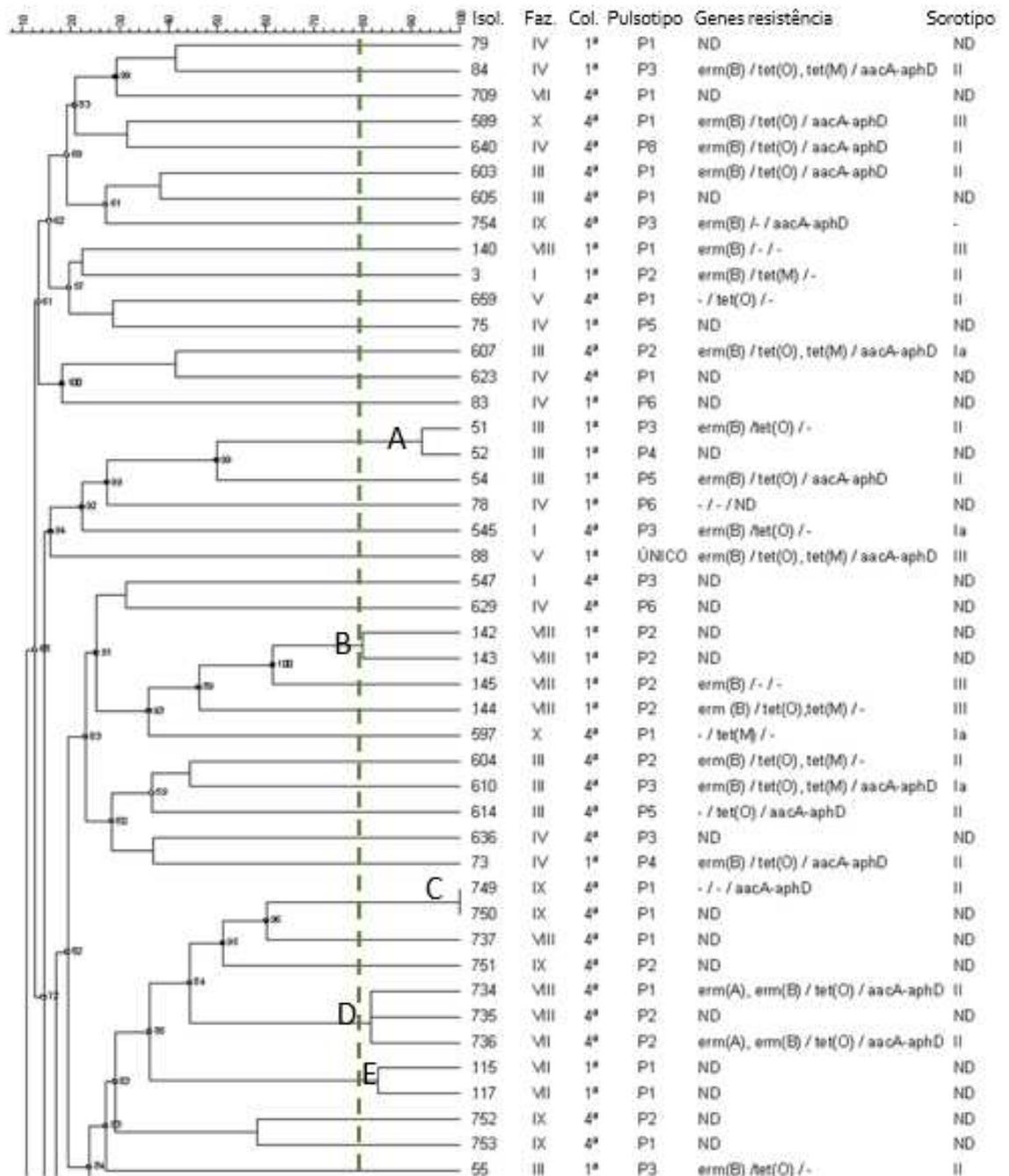
402

403

404

405

406

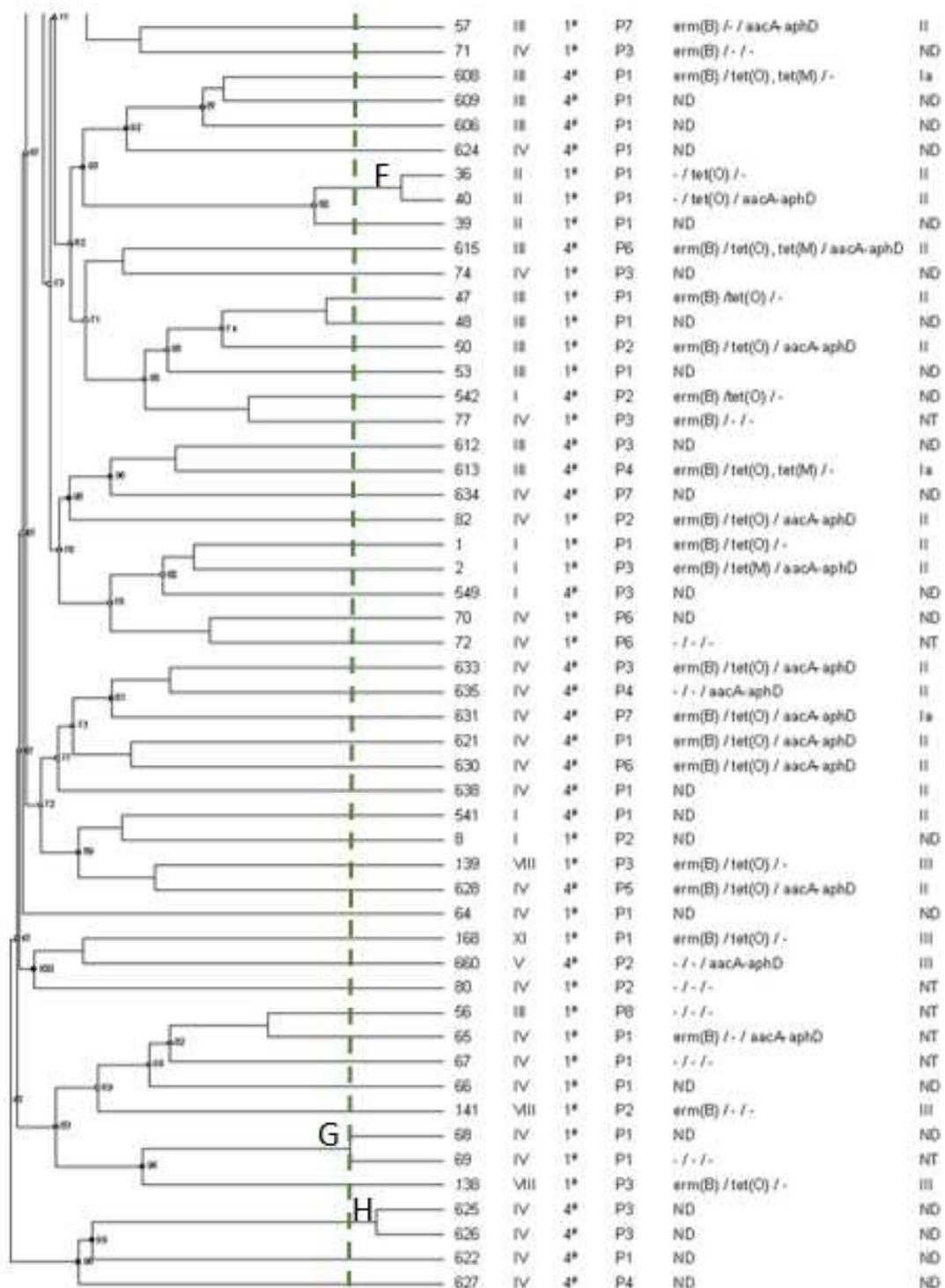


407

408

409 **Figura 2 - Dendrograma mostrando padrões de eletroforese em gel de campo pulsado**
 410 **(PFGE) digerido por *Sma*I para *Streptococcus agalactiae* isolados de amostras de leite**
 411 **bovino de 11 fazendas leiteiras localizadas nas regiões da Zona da Mata Mineira e**
 412 **Campo das Vertentes. A linha vertical mostra o corte de similaridade definido por 80%,**
 413 **de acordo com padrão de bandas. Os clusters A - H, isolado, nº da fazenda, tempo da**
 414 **coleta, pulsotipo, genes de resistência e sorotipos são mostrados, respectivamente, no**
 415 **dendrograma. ND: não definido; NT: não tipável.**

416



417

418 **Figura 2 - Dendrograma mostrando padrões de eletroforese em gel de campo pulsado**
 419 **(PFGE) digerido por *Sma*I para *Streptococcus agalactiae* isolados de amostras de leite**
 420 **bovino de 11 fazendas leiteiras localizadas nas regiões da Zona da Mata Mineira e**
 421 **Campo das Vertentes. A linha vertical mostra o corte de similaridade definido por 80%,**
 422 **de acordo com padrão de bandas. O isolado, nº da fazenda, tempo da coleta, pulsotipo,**
 423 **genes de resistência e sorotipos são mostrados, respectivamente, no dendrograma.**
 424 **ND: não definido; NT: não tipável. Continuação**

425 **Tabela 3. Distribuição dos pulsotipos entre *S. agalactiae* isolados de leite bovino no**
 426 **sudeste de Minas Gerais, Brasil.**

Fazendas	1ª colheita		4ª colheita	
	Número de pulsotipo/n	Número de cepas sem pulsotipo*	Número de pulsotipo	Número de cepas sem pulsotipo*
I	03/10	06	03/11	06
II	01/03	00	00/00	00
III	07/10	00	06/13	01
IV	06/20	01	07/17	00
V	01/01	00	02/02	00
VI	00/00	00	00/00	00
VII	01/12	10	01/15	14
VIII	03/08	00	02/06	02
IX	00/00	00	03/06	00
X	00/00	00	01/02	00
XI	01/02	01	00/03	03

427

428

429

430

431

432

433 **3.3 Caracterização dos sorotipos capsulares de linhagens de *S. agalactiae***

434

435 Nas 78 linhagens de *S. agalactiae* anteriormente selecionadas foram
 436 identificados 3 sorotipos, sendo estes o II (n= 34[43,6%]), III (n= 23[29,5%]) e Ia (n=
 437 10[12,8%]), sendo o sorotipo II o mais frequente. Sete linhagens de *S. agalactiae*
 438 foram não tipificáveis (NT) (n= 7[9,0%]). Outras quatro linhagens não amplificaram
 439 (75, 542, 589 e 754). A frequência das linhagens por município de acordo com o tipo
 440 capsular, pode ser consultada na tabela 4.

441 O sorotipo mais identificado na primeira e na quarta coleta foi o sorotipo II,
 442 sendo identificado este tipo capsular em 14 linhagens da primeira coleta e em 19
 443 linhagens da segunda coleta.

444

445

446 **Tabela 4. Distribuição dos sorotipos capsulares de linhagens de *S. agalactiae* por**
 447 **municípios da Zona da Mata e Campo das Vertentes.**

Fazenda	Sorotipos	Municípios
I	Ia e II	Barbacena
II	II	Bias Fortes
III	Ia e II	Santa Rita de Ibitipoca
IV	Ia e II	Santa Rita de Ibitipoca
V	II e III	Santa Rita de Ibitipoca
VI	-	Lima Duarte
VII	III	Rio Preto
VIII	II e III	Rio Preto
IX	II	Rio Preto
X	I	Juiz de Fora
XI	III	Bicas

448

449

450

451

452

453 **3.4 Perfis fenotípicos de suscetibilidade antimicrobiana de linhagens de *S.***
 454 ***agalactiae***

455

456 Todas as linhagens de *S. agalactiae* geneticamente não redundantes avaliadas
 457 no presente estudo (n= 78) foram suscetíveis à cefalotina e ceftiofur. Cinco linhagens
 458 foram suscetíveis a todos antimicrobianos testados (Ampicilina, Penicilina, Oxacilina,
 459 Clindamicina, Sulfametoxazol, Trimetoprim+Sulfametoxazol, Enrofloxacina,
 460 Gentamicina, Cefalotina, Ceftiofur, Eritromicina e Tetraciclina) simultaneamente.
 461 Foram observadas linhagens resistentes aos seguintes antimicrobianos: tetraciclina
 462 (69,2%, n=54), gentamicina (62,8%, n=49), clindamicina (55,1%, n=43),
 463 sulfametoxazol (52,6%, n=41), eritromicina (48,7%, n=38), enrofloxacina (34,6%,
 464 n=27), trimetoprim+sulfametoxazol (16,6%, n=13), oxacilina (14,1%, n=11), ampicilina
 465 (8,9%, n=07) e penicilina (8,9%, n=07). Cabe ressaltar que os isolados que
 466 apresentaram resistência à clindamicina, não foram avaliados quanto a resistência
 467 induzida à clindamicina.

468 Algumas linhagens apresentaram o perfil de multirresistência, caracterizada
 469 pela resistência a mais de uma classe de antibiótico. Neste caso, as linhagens
 470 apresentaram resistência a gentamicina, eritromicina e tetraciclina, que correspondem
 471 a classe de aminoglicosídeos, macrolídeos e tetraciclina. Esse perfil foi encontrado
 472 tanto na primeira coleta (n= 12), quanto na quarta (n= 14) (tabela 5).

473

474

475 **Tabela 5. Perfis de multirresistência de *S. agalactiae* isolados de amostras de leite, da**
 476 **primeira e quarta coletas de fazendas localizadas na Zona da mata e Campo das**
 477 **Vertentes.**

Antimicrobianos	1ª Coleta (nº isolados resistentes)	4ª Coleta (nº isolados resistentes)
Gentamicina	26	25
Eritromicina	19	19
Tetraciclina	25	29
Multirresistência Genta/Eritro/Tetra*	12	14

478

479 *Genta: Gentamicina; Eritro: Eritomicina; Tetra: Tetraciclina

480 3.5 Detecção de genes de resistência antimicrobiana em *S. agalactiae*

481

482 Do total de 78 DNAs de *S. agalactiae* analisados, 54 (69,23%) apresentaram
483 genes de resistência à tetraciclina. Os genes *tetM* e *tetO* foram os determinantes de
484 resistência à tetraciclina mais comuns nas cepas com fenótipo de resistência a esse
485 antibiótico. O gene *tetM* foi detectado em 6 linhagens (7,7%) e *tetO* em 27 (34,61%).
486 15 linhagens com fenótipo de resistência à tetraciclina apresentaram simultaneamente
487 os genes *tetM* e *tetO*. E em oito (10,25%) linhagens com fenótipo de resistência à
488 tetraciclina não foram detectados os genes *tetO* e *tetM*. Seis linhagens consideradas
489 sensíveis pelo teste fenotípico, apresentaram determinantes genéticos relacionados à
490 resistência à tetraciclina. Em uma das linhagens, foi detectado o gene *tetM*, em 2 delas
491 foi detectado o gene *tetO* e em uma foram detectados simultaneamente os genes *tetM*
492 e *tetO*. Os determinantes genéticos *tetL* e *tetK* não foram detectados em nenhuma
493 das linhagens analisadas.

494 Em 37 (47,4%) linhagens consideradas resistentes no teste fenotípico à
495 eritromicina, foi detectado o gene *ermB* em 36. Apenas 1 isolado considerado
496 resistente no teste fenotípico não apresentou nenhum dos determinantes genéticos
497 relacionados à resistência a eritromicina (*ermB* e *ermA*) investigados no presente
498 trabalho. Em 9 das 78 linhagens sensíveis à eritromicina foi detectado o gene *ermB*.
499 Em nenhuma das linhagens foi detectado o gene *ermA*.

500 Em relação à resistência aos aminoglicosídeos, os determinantes genéticos
501 *aad6* e *aphA3* não foram detectados em nenhuma das linhagens. O gene *aacA-aphD*
502 foi detectado em 32 (41%) entre as 78 linhagens da primeira e quarta coleta. As 49
503 (62,8%) linhagens fenotipicamente resistentes à gentamicina, 35 (44,9%) não
504 apresentaram o gene *aacA-aphD*. Já 18 (23,1%) linhagens fenotipicamente sensíveis
505 à gentamicina, apresentaram o gene *aacA-aphD*.

506 Algumas linhagens apresentaram determinantes genéticos relacionados a
507 diferentes classes de antimicrobianos. Em 22 (28,2%) linhagens foram detectados os
508 genes *ermB* e *tetO*. Em 14 (17,9%) linhagens foram detectados os genes *ermB*, *tetO*
509 e *aacA-aphD*. Em 1 (1,3%) isolado foram detectados os genes *ermB*, *tetM* e *aacA-aphD*.
510 Em 9 (11,5%) linhagens, os genes *ermB*, *tetO* e *tetM* e em 6, (7,7%) os genes
511 *ermB*, *tetO*, *tetM* e *aacA-aphD*.

512

513

514 4 Discussão

515

516 Das 11 fazendas participantes do presente estudo, apenas uma apresentou-se
517 livre de *S. agalactiae* (Fazenda VI), não sendo identificado nenhum isolado dessa
518 espécie durante todo o período analisado (2009 a 2011). Com base nessa informação,
519 vale ressaltar que o *S. agalactiae* é passível evitar a introdução destes nas
520 propriedades leiteiras, desde que as medidas de controle e profilaxia sejam adotadas
521 e seguidas corretamente, bem como a importância de se conhecer o perfil de
522 resistência antimicrobiana deste patógeno, afim de que o tratamento da mastite seja
523 bem-sucedido. Apesar da análise da prevalência não ser o objetivo deste trabalho, o
524 fato de 284 isolados terem sido identificados presuntivamente como *S. agalactiae* e
525 dos 141 selecionados (da primeira e quarta coletas), todos serem identificados como
526 *S. agalactiae* por PCR e, ainda, terem sido identificados em 10 das 11 propriedades
527 estudadas, confirma a elevada ocorrência dessa bactéria em rebanhos bovinos
528 leiteiros na região estudada, e reitera a possibilidade de que esse microrganismo seja
529 uma das principais causas de mastite nesses rebanhos. Tomazi *et al.* (2018)
530 coletaram leite de 4.212 vacas com mastite clínica e o terceiro patógeno mais
531 frequentemente isolado dos casos foi *S. agalactiae*, sendo obtidos 248 isolados (os
532 primeiros foram *E. coli*, n=276 e *S. uberis*, n=256). Conforme diversas pesquisas, os
533 microrganismos mais comumente encontrados nos casos de mastite são *S. aureus*,
534 *S. agalactiae*, *S. uberis*, *E. coli* e *K. pneumoniae* (Klaas e Zadoks, 2018; Ashraf e
535 Imran, 2020; Cadona-Hernandez *et al.*, 2021). Sendo que, *S. aureus*, *S. agalactiae* e
536 *Mycoplasma* spp. são os mais associados à ocorrência de mastite subclínica, após a
537 cronificação da infecção, se transforma em mastite clínica (Keefe, 2012, Brito *et al.*
538 2012). Além da presença de *S. agalactiae* nos rebanhos analisados no presente
539 estudo, também foi observado uma permanência de *S. agalactiae* nos rebanhos
540 bovinos leiteiros de 2009 para 2011, o que pode ser atribuído a sua alta
541 contagiosidade e os animais infectados serem importantes reservatórios para o
542 rebanho (Langoni *et al.*, 2017).

543 Erradicar totalmente um microrganismo de rebanho não é fácil, mas é possível.
544 Geralmente, os problemas de mastite no rebanho são resolvidos de maneira fácil e
545 econômica, por meio da implementação de programas de prevenção e controle da
546 mastite, a fim de impedir a introdução do microrganismo no rebanho e a disseminação

547 dos mesmos aos animais. Dentre os fatores que devem ser levados em consideração
548 estão o tratamento do animal doente com o antibiótico adequado, monitoramento da
549 mastite no rebanho, monitoramento da resistência a antimicrobianos dos
550 microrganismos isolados do rebanho, entre outros (Brito *et al.*, 2002; Zadocks *et al.*,
551 2012).

552 Após identificação prévia por meio de testes fenotípicos para triagem
553 microbiológica de *S. agalactiae* e identificação da espécie por PCR, os isolados foram
554 submetidos a técnica de PFGE, que representa uma importante ferramenta de
555 tipagem molecular para avaliação da relação epidemiológica e para análise de
556 similaridade genética entre as cepas de *S. agalactiae* (Ribeiro *et al.*, 2013; Dutra *et*
557 *al.*, 2014). Essa técnica permitiu, com auxílio dos dendrogramas, a seleção de
558 isolados geneticamente distintos para serem utilizados nas análises posteriores neste
559 estudo. Em dendrogramas construídos a partir dos resultados de PFGE, em geral, os
560 isolados são considerados indistinguíveis se apresentarem 100% de similaridade e
561 possuem relação clonal se a similaridade entre eles for maior do que 80% (Corrêa *et*
562 *al.*; 2011). Neste estudo, a análise dos isolados de *S. agalactiae* provenientes de
563 amostras de leite bovino permitiu constatar a presença de um grupo clonal formado
564 por isolados com 100% de similaridade, por exemplo, 749 e 750. E outros
565 apresentando similaridade superior a 80%, por exemplo, 51 e 52 (Figura 2). Neste
566 estudo, ao compararmos as cepas presentes em 2009 e depois em 2011, estes
567 resultados sugerem que além da ocorrência de disseminação clonal de *S. agalactiae*
568 nos rebanhos, há também o aparecimento de cepas que sofreram mutação a partir
569 das cepas únicas, sugerindo a permanência dessas cepas nos rebanhos ao longo do
570 tempo. Na fazenda I isolados da primeira (1, 2 e 3) e da quarta (541, 542 e 545) coleta
571 apresentaram os mesmos pulsotipos (P1, P2 e P3, respectivamente), mesmo com
572 intervalo de 20 meses entre as coletas (tabela 3). Para os 44 isolados de *S. agalactiae*
573 considerados não tipáveis pela enzima *Sma*I, sugere-se o uso de outras enzimas para
574 esse fim, como por exemplo, a *Sal* I. Em um estudo de caracterização de *S. agalactiae*,
575 realizado por Ribeiro *et al.* (2013) essa enzima se mostrou eficaz na digestão do DNA
576 genômico de alguns isolados que foram escolhidos aleatoriamente. Desta forma, no
577 presente estudo, alguns desses isolados não tipáveis também foram escolhidos
578 aleatoriamente para testar a digestão do DNA com *Sal* I, e essa enzima se mostrou
579 eficaz. Os isolados não tipáveis podem apresentar uma restrição a *Sma*I, isso tem a

580 ver com modificação no sítio de reconhecimento dessa enzima (5'-CCCGGG-3' e 3'-
581 GGGCCC-5'). A *Sma*I é considerada um neoesquisômero, que seria aquela enzima
582 que reconhece a sequência, mas corta em locais diferentes (Lima, 2008). Os perfis
583 eletroforéticos dos isolados digeridos com *Sal*I, não foram analisados no *Bionumerics*.
584 Mas por meio do gel, foi possível verificar que os isolados apresentavam padrões de
585 bandas bem definidos com essa enzima. Logo, estudos futuros devem ser realizados,
586 a fim de testar a digestão do DNA de todos os isolados não tipáveis com essa enzima.

587 Isolados das fazendas III e IV foram os que apresentaram uma maior
588 diversidade de pulsotipos (P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7 e P8), de acordo com os critérios
589 de Tenover *et al.* (1995). Esse critério segue as seguintes diretrizes: uma diferença
590 no padrão de bandas de três fragmentos poderia ter ocorrido devido a um único evento
591 genético e, portanto, esses isolados são classificados como altamente relacionados;
592 diferenças de quatro a seis fragmentos de restrição são provavelmente oriundas de
593 dois eventos genéticos, e diferenças maiores que sete fragmentos de restrição são
594 resultado de três ou mais eventos genéticos. Na primeira coleta, a fazenda III
595 apresentou os pulsotipos de P1 a P8, já na segunda os pulsotipos variaram de P1 a
596 P6. Já na fazenda IV, na primeira coleta os pulsotipos variaram de P1 a P6, e na
597 segunda coleta essa variação foi de P1 a P8.

598 A partir da análise dos pulsotipos, as linhagens geneticamente não
599 redundantes foram selecionadas e foi realizada a tipagem capsular. Essa análise
600 representa uma abordagem clássica empregada em pesquisas epidemiológicas
601 envolvendo *S. agalactiae*. A cápsula polissacarídica do *Streptococcus* do grupo B (*S.*
602 *agalactiae*) desempenha um papel crucial em sua virulência e interação com o
603 hospedeiro. Funcionando como um fator de virulência, a cápsula contribui para a
604 evasão do sistema imunológico ao dificultar a fagocitose por células imunes. Além
605 disso, fornece proteção contra a ativação do sistema complemento, essencial para a
606 sobrevivência no hospedeiro. A variação antigênica entre sorotipos é importante para
607 a classificação epidemiológica. A cápsula também desempenha papel na adesão e
608 colonização de tecidos, sendo crucial para a capacidade da bactéria de causar
609 infecções. Em última análise, a cápsula desempenha um papel crucial na virulência e
610 antigenicidade, proporcionando proteção contra a fagocitose pelo sistema
611 imunológico e conferindo resistência aos antimicrobianos ao microrganismo. Até o
612 momento, foram identificados 10 sorotipos de polissacarídeos capsulares (CPSs) *S.*

613 *agalactiae* (Ia, Ib e II-IX). Além disso, a genotipagem capsular é considerada altamente
614 adequada para investigações epidemiológicas porque os sorotipos podem ser
615 identificados na presença ou ausência de expressão de CPS (Yang *et al.*, 2013;
616 Hacker, 2019).

617 A identificação de dez sorotipos foi realizada com base nas variações nos tipos
618 de CPS por meio de PCR Multiplex segundo Imperi *et al.* (2010). Neste estudo, os
619 sorotipos encontrados foram II (n= 34(43,6%)), III (n= 23(29,5%)) e Ia (n= 10(12,8%))
620 e algumas linhagens não puderam ser tipificados (NT) (n= 7(9,0%)). Como pode-se
621 observar, o sorotipo II foi o mais encontrado entre as linhagens de *S. agalactiae*
622 analisados, seguido do sorotipo III. E em fazendas distintas de uma mesma região
623 geográfica, foi possível observar sorotipos distintos. Por exemplo, quando
624 comparados os sorotipos identificados nas fazendas IV e V foram identificados
625 sorotipos distintos, sendo Ia e II na fazenda IV e II e III na fazenda V.

626 No Brasil, já foram previamente reconhecidos cinco distintos tipos capsulares
627 (Ia, Ib, II, III e IV), sendo II e III os mais frequentemente encontrados em Minas Gerais
628 e nas demais regiões do Brasil (Duarte *et al.*, 2005; Pinto *et al.*, 2014; Carvalho-Castro
629 *et al.*, 2017). Carvalho-Castro *et al.* (2017) ao analisarem o sorotipo nas linhagens de
630 *S. agalactiae* provenientes de fazendas de Minas Gerais, constataram que o sorotipo
631 III foi o mais frequente (74%), independente da localização geográfica da fazenda e
632 da gravidade da mastite (clínica e subclínica). No entanto, alguns sorotipos como Ia,
633 II e III têm sido os mais frequentemente associados a infecções graves e invasivas no
634 Brasil, em comparação com outros sorotipos, sendo a presença desses uma ameaça
635 em potencial para os rebanhos leiteiros bovinos. Dutra *et al.* (2014) ao avaliarem 185
636 *S. agalactiae* isolados de humanos, de diferentes regiões do Brasil, constataram que
637 os sorotipos Ia (27.6%), II (19.1%), Ib (18.7%) e V (13.6%) foram os
638 predominantemente encontrados, na região sudeste e também no Brasil como um
639 todo. Palmeiro *et al.* (2010) também avaliaram *S. agalactiae* (n=168) isolados de
640 humanos, de amostras obtidas em um hospital localizado no Sul do Brasil, e obtiveram
641 a prevalência dos sorotipos Ia (38.1%), IV (13.1%) e III (3%). Já em um estudo
642 realizado no Japão, os sorotipos VI e VIII predominaram entre *S. agalactiae* isolados
643 de mulheres grávidas (Lachenauer *et al.*, 1999). Isso demonstra que a localização
644 geográfica e a fonte de isolamento talvez possam sim influenciar na prevalência dos
645 sorotipos de *S. agalactiae*, demonstrando a importância de realizar estudos em

646 regiões específicas do Brasil e do mundo, a fim de conhecer o perfil de virulência das
647 cepas circundantes na região em estudo. Por fim, assim como no estudo de Carvalho
648 e colaboradores (2017), no presente estudo também um menor número de isolados
649 foram considerados não tipáveis, o que pode ser atribuído à técnica de tipagem
650 molecular utilizada, que é considerada específica e sensível.

651 Em relação às análises de suscetibilidade aos antimicrobianos, no presente
652 estudo foi constatada a presença de linhagens resistentes aos seguintes
653 antimicrobianos: tetraciclina (69,2%, n=54/78), gentamicina (65,4%, n=51/78),
654 clindamicina (55,1%, n=43/78), sulfametoaxol (52,6%, n=41/78), eritromicina (48,7%,
655 n=38/78), enrofloxacina (34,6%, n=27/78), trimetoprim+sulfametoxazol (16,6%,
656 n=13/78), oxacilina (14,1%, n=11/78), ampicilina (8,9%, n=7/78) e penicilina (8,9%,
657 n=7/78). Observa-se que mais de 40% das linhagens de *S. agalactiae* são resistentes
658 aos antimicrobianos tetraciclina, gentamicina, clindamicina, sulfametoxazol e
659 eritromicina. A alta taxa de resistência à tetraciclina encontrada no atual estudo, se
660 assemelha a um estudo recente realizado em *S. agalactiae* isolados de rebanhos de
661 leite no Nordeste do Brasil. Oliveira *et al.* (2022) apontaram que 75.9% (n=12/16) dos
662 *S. agalactiae* analisados apresentaram resistência à tetraciclina. No entanto, depois
663 da tetraciclina, as maiores taxas de resistência de *S. agalactiae* encontrados na
664 pesquisa de Oliveira *et al.* (2022), são em relação aos antimicrobianos ampicilina
665 (56,2% n=9/16), cefoxitin (43.3% n=7/16) e penicilina (56,2% n=9/16). Mesquita *et al.*
666 (2017), também identificaram altas taxas de resistência à oxacilina e penicilina, de *S.*
667 *agalactiae* de rebanhos bovinos de Minas Gerais (OXA: 97% e PEN: 86%). Outro
668 antibiótico que também apresentou altas taxas de resistência e que apresenta um
669 fenótipo de resistência induzida é a clindamicina. A resistência induzida à clindamicina
670 depende da presença de um indutor macrolídeo, que no caso é a eritromicina. Esse
671 indutor estimula a produção da ribossomo metilase da eritromicina (*erm*) que induz a
672 expressão da resistência à clindamicina (Kishk *et al.*, 2020). Por esse motivo, optou-
673 se por não trabalhar neste estudo com a genética da resistência à clindamicina, mas
674 será um objeto de trabalho à parte.

675 Neste estudo, foram encontradas 13 linhagens *S. agalactiae* que apresentaram
676 resistência a pelo menos 1 betalactâmico testado. Desses, cinco linhagens (621, 628,
677 633, 635 e 749) apresentaram resistências a todos os beta-lactâmicos (Ampicilina,
678 Penicilina e Oxacilina). Apesar de no presente estudo termos encontrado taxas

679 menores relacionadas a presença de linhagens resistentes a beta-lactâmicos em
680 comparação ao estudo de Oliveira *et al.* (2022) e Mesquita *et al.* (2017) esse foi um
681 resultado que despertou a atenção dos autores, especialmente em relação a
682 penicilina, uma vez que não é um resultado comum de ser encontrado (Kaczorek *et*
683 *al.*, 2017). Devido a raridade de cepas resistentes à penicilina, o CLSI recomenda a
684 repetição dos testes de resistência, bem como da identificação das cepas (McDougall
685 *et al.*, 2014). Confirmar esses resultados é de extrema importância, pois uma das
686 estratégias de controle da mastite, inclui tratamento com soluções comerciais de
687 macrolídeos, beta-lactâmicos e tetraciclina, sendo os beta-lactâmicos os mais
688 comumente utilizados (Pinto *et al.*, 2014). Os antimicrobianos pertencentes a essa
689 classe são os de primeira escolha para o tratamento da mastite bovina em rebanhos
690 leiteiros, mas não podemos relacionar o perfil de resistência obtido e a permanência
691 de *S.agalactiae* nos rebanhos entre os anos de 2009 e 2011, com a ineficácia do
692 tratamento com essa classe de antimicrobianos. Essa observação aponta o quão
693 importante é a realização de estudos que avaliem o perfil fenotípico de suscetibilidade
694 antimicrobiana de bactérias presentes nos rebanhos.

695 Todavia, outros antimicrobianos podem ser prescritos, como os pertencentes à
696 classe das cefalosporinas (Soares, 2021; Massiero, *et al.*; 2023). Ao analisarmos o
697 perfil de suscetibilidade à Cefalotina e Ceftiofur (da classe das cefalosporinas), todas
698 as linhagens foram consideradas sensíveis à ação desses antimicrobianos. No estudo
699 realizado por Silva *et al.* (2017), todas as linhagens também foram consideradas
700 suscetíveis a esses dois antimicrobianos, o que demonstra que a Cefalotina e Ceftiofur
701 são boas alternativas para o tratamento da mastite bovina nos rebanhos leiteiros.
702 Entretanto, a utilização das cefalosporinas deve ser realizada com precaução, visando
703 prevenir o desenvolvimento de estirpes bacterianas resistentes. Essa precaução é
704 especialmente crítica, pois as cefalosporinas de quarta geração são classificadas pela
705 Organização Mundial da Saúde (OMS) como antimicrobianos "criticamente
706 importantes" para a saúde humana (OMS, 2019). E de fato, ao realizarmos pesquisas
707 de resistência a antimicrobianos em linhagens provenientes de animais ou ambientes,
708 devemos também considerar a saúde humana, e realizar pesquisas que abrangem a
709 abordagem de saúde única implementada pelo Ministério da Saúde (Brasil, 2023).
710 Abordagens como essa são importantes, pois relatos de bactérias multirresistentes
711 tem acontecido em todo mundo e afetam todo o microbioma, dificultando o tratamento

712 de infecções em animais e humanos (Rocha, 2015; Santos, 2020ABCS, 2022; Puresa
713 e Carvalho, 2023). Além disso, alimentos derivados de animais/plantas podem servir
714 como vetores de transmissão importantes de bactérias resistentes a antimicrobianos
715 e também de genes de resistência. Dessa forma, o estudo da resistência
716 antimicrobiana englobando o conceito de saúde única se torna essencial para
717 promover o tratamento adequado de infecções e para o desenvolvimento de práticas
718 eficazes nas fazendas leiteiras (McDougall *et al.*, 2021; Demil *et al.*, 2022; Tiedje *et*
719 *al.*, 2023).

720 Os testes de disco difusão para antibiograma são uma técnica padrão e
721 amplamente utilizada para determinar a sensibilidade de uma bactéria a diferentes
722 antimicrobianos. Esses testes são confiáveis quando realizados corretamente e
723 interpretados adequadamente. No entanto, algumas limitações devem ser
724 consideradas. Dificuldades podem surgir na avaliação da suscetibilidade a
725 antimicrobianos que têm uma difusão limitada através do ágar, como a polimixina. O
726 teste de bactérias nutricionalmente exigentes pode requerer a suplementação dos
727 meios de cultura. Adicionalmente, os resultados são puramente qualitativos (S, I ou
728 R) e podem apresentar desafios na interpretação de microrganismos anaeróbios ou
729 fastidiosos. E até mesmo a falta de controle de qualidade na execução do método
730 quanto na produção dos discos de antimicrobianos podem influenciar nos resultados
731 obtidos (Sejas *et al.*, 2003). Vale lembrar que, isolados de resistência induzida à
732 clindamicina apresentam resistência a eritromicina, mas falsamente suscetíveis à
733 clindamicina no método de difusão em disco.

734 Além do estudo fenotípico da resistência, estudos têm demonstrado a
735 importância da realização de pesquisas dos genes de resistência, a fim de melhor
736 compreender sobre os mecanismos de resistência envolvidos, bem como os
737 mecanismos de transferência desses genes (Pinto *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2021; Leghari
738 *et al.*, 2022; Oliveira *et al.*, 2022). No presente estudo, foi pesquisada a presença dos
739 determinantes genéticos *ermA* e *ermB*, relacionados a resistência a eritromicina, que
740 pertence à classe dos macrolídeos. Esses foram os determinantes de escolha, pois
741 são os comumente encontrados em patógenos da mastite bovina (Silva *et al.*, 2017;
742 Hernandez *et al.*, 2021; Leghari *et al.*, 2022). Essa classe de antibiótico atua ligando-
743 se a subunidade 23S do ribossomo bacteriano, causando a liberação prematura de
744 peptídeos durante a tradução. Por outro lado, os genes *erm* codificam a produção de

745 metilases, que ao metilarem o rRNA no sítio ativo, reduzem a capacidade do
746 antibiótico de se ligar ao ribossomo e interferem na tradução (Choi *et al.*, 2018). No
747 presente estudo, observou-se que o gene *ermB* foi o determinante genético
748 relacionado à resistência a eritromicina mais detectado nas linhagens de *S.*
749 *agalactiae*, em comparação ao gene *ermA*. Os resultados obtidos assemelham-se aos
750 encontrados por outros pesquisadores. Duarte *et al.* (2005) ao analisarem o
751 determinante genético mais associado ao fenótipo de resistência à eritromicina, em *S.*
752 *agalactiae* obtidos de leite de vacas com mastite clínica e subclínica nas regiões de
753 Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo, constataram a presença do gene *ermB* em
754 100% dos *S. agalactiae* analisados. Gao *et al.* (2012) ao analisarem *S. agalactiae*
755 isolados de vacas com mastite na China, detectaram a presença do gene *ermB* em
756 100% dos *S. agalactiae* fenotipicamente resistentes a eritromicina, não sendo
757 detectado nenhum outro gene *erm*. Rato *et al.* (2013) ao analisarem *S. agalactiae*
758 isolados de leite de vaca com mastite subclínica, em Portugal, com fenótipo de
759 resistência à eritromicina, detectaram a presença do gene *ermB* na maioria (13/15),
760 sendo que em apenas 2 (n=15) foi detectada a presença do gene *ermA*, ao invés do
761 gene *ermB*. Entretanto, outros genes *erm* também já foram encontrados em *S.*
762 *agalactiae* em maiores proporções. Kaczorek *et al.* (2017) realizaram um estudo na
763 Polônia utilizando 135 isolados pertencentes ao gênero *Streptococcus*. Nesse estudo
764 eles analisaram a presença de genes *erm* em *S. uberis*, *S. agalactiae* e *S.*
765 *dysgalactiae*. Apesar do gene *ermB* ter sido o determinante genético relacionado à
766 eritromicina mais presente entre as linhagens, estando presente em 17% delas, ele
767 não foi detectado na espécie *S. agalactiae*, apenas em *S. uberis* e *S. dysgalactiae*. O
768 gene encontrado em *S. agalactiae* foi *ermC*, que também foi encontrado nas outras
769 espécies, sendo o segundo determinante genético mais presente (11%), e o gene
770 *ermA* estava presente em apenas 2 linhagens (1%). Por outro lado, Leghari *et al.*
771 (2022) observaram uma maior frequência do gene *ermA*, estando este presente em
772 84% dos *S. agalactiae* obtidos de leite proveniente da China, e em 73% do Paquistão.
773 Porém, *ermB* também foi o determinante genético mais encontrado no trabalho de
774 Leghari e colaboradores (2022), estando presente em 94% das linhagens
775 provenientes da China e 91% do Paquistão.

776 Portanto, ainda que outros genes relacionados à resistência a eritromicina
777 sejam encontrados em *S. agalactiae*, nota-se que o gene *ermB* é o determinante

778 genético mais encontrado, e isso tem sido associado à localização desse gene em
779 transposons, o que facilita a disseminação desse gene para diferentes
780 microrganismos, devido a ocorrência de transferência horizontal de genes entre eles
781 (Leghari *et al.*, 2022). Também já foi relatado a presença desse gene em plasmídeos,
782 o que também favorece a transferência (Di Pilato *et al.*, 2019). Relatos da presença
783 do gene *ermB* localizados em transposons ou plasmídeos não foram encontrados por
784 nosso grupo de pesquisa em trabalhos realizados com *S. agalactiae* isolados no
785 Brasil. Portanto, as linhagens obtidas no presente estudo, e que fazem parte de uma
786 coleção institucional, são úteis para estudos futuros com foco neste aspecto.

787 Genes de relacionados a resistência à tetraciclina também foram avaliados no
788 presente estudo, sendo eles *tetO*, *tetM*, *tetK* e *tetL*, os determinantes genéticos
789 relacionados à tetraciclina mais encontrados em patógenos da mastite bovina (Silva
790 *et al.*, 2017; Hernandez *et al.*, 2021; Leghari *et al.*, 2022;). As tetraciclinas agem
791 inibindo a síntese de proteínas bacterianas através do impedimento da associação do
792 aminoacil-tRNA com o ribossomo bacteriano. E para interagir com os seus alvos, estas
793 moléculas precisam atravessar um ou mais sistemas de membrana, a depender se o
794 microrganismo alvo é gram-positivo ou gram-negativo. Os mecanismos de resistência
795 à tetraciclina envolvem a proteção ao ribossomo e bomba de efluxo. Genes como *tetO*
796 e *tetM*, codificam proteínas que se ligam ao ribossomo causando uma mudança de
797 conformação, o que impede a ligação da tetraciclina aos ribossomos. Já os genes
798 *tetL* e *tetK*, codificam proteínas responsáveis pela bomba de efluxo. Nele, as proteínas
799 associadas à membrana exportam tetraciclina da célula, o que reduz a concentração
800 intracelular do fármaco e, conseqüentemente, sua ação é reduzida (Chopra e Roberts,
801 2001). No presente trabalho, os genes *tetO* e *tetM* foram encontrados nas proporções
802 de 56,4% e 24,4%, respectivamente, sendo os determinantes genéticos relacionados
803 à resistência a tetraciclina mais encontrados. E os genes *tetL* e *tetK* não foram
804 encontrados nas linhagens analisadas. Os dados obtidos corroboram os dados
805 encontrados por Duarte *et al.* (2005), que também analisaram *S. agalactiae* isolados
806 de leite de vacas com mastite, obtidos no Brasil, onde também detectaram apenas a
807 presença de *tetO* e *tetM*. Leghari *et al.* (2022) também constataram a presença apenas
808 dos determinantes genéticos *tetO* e *tetM*, sendo *tetO* detectado em maior proporção
809 (*tetM*: em linhagens da China 53%, em linhagens do Paquistão 68%; *tetO*: em
810 linhagens da China 90%, em linhagens do Paquistão 91%). Com base nesses

811 trabalhos, podemos observar uma presença mais frequente do gene *tetO* em *S.*
812 *agalactiae* provenientes de rebanhos leiteiros é mais comum do que a presença do
813 gene *tetM*, uma vez que o gene *tetM* vem sendo mais associado a *S. agalactiae* de
814 origem humana (Leghari *et al.*, 2022; Dogan *et al.*, 2005).

815 Por outro lado, Gao *et al.* (2012) apontaram os genes *tetM* e *tetL* como os
816 determinantes genéticos mais encontrados em *S. agalactiae* isolados de rebanhos
817 leiteiros bovinos na China. Outros estudos mais recentes também relataram a
818 detecção em maior frequência do gene *tetM*, mas em outros microrganismos isolados
819 de animais ou de produtos de origem animal, como *Lactobacillus* e *Enterococcus*
820 (Colautti *et al.*, 2022; Rozman *et al.*, 2023). A presença do gene *tetM* em diferentes
821 microrganismos (patogênicos e não patogênicos) e de diferentes origens (animal e
822 humana) pode ser atribuída a localização desse gene, que já foi encontrado em
823 transposons e plasmídeos, o que facilita a transferência desse gene para diferentes
824 microrganismos (Colautti *et al.*, 2022).

825 A resistência à gentamicina nas linhagens foi atribuída à presença do gene
826 *aacA-aphD* (também conhecido por *aac(6')-aph(2'')*). Esse gene codifica uma enzima
827 bifuncional, que demonstra atividade de acetiltransferase e fosfotransferase (Poyart *et*
828 *al.*, 2003), capaz de conferir um amplo espectro de ação contra todos os
829 aminoglicosídeos, exceto estreptomicina (Colautti *et al.*, 2022). Apesar de *aacA-aphD*
830 ser predominante em enterococos e estafilococos (Doumith *et al.*, 2017), Horaud *et*
831 *al.* (1996), demonstraram em seu estudo que uma cepa de *S. agalactiae* (B128)
832 continha o transposon *Tn3706* composto por um fragmento central contendo o gene
833 *aacA-aphD*, que é semelhante, senão idêntico, aos transposons *Tn4001* e *Tn5281*
834 encontrados em *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*, respectivamente, o
835 que pode ser devido à transferência horizontal de genes.

836 Em nosso estudo, 51 (65,4%) linhagens apresentaram resistência a
837 gentamicina, sendo que 35 linhagens resistentes, não apresentaram o gene *aacA-*
838 *aphD* e 18 linhagens sensíveis ao teste de disco difusão, apresentaram o gene *aacA-*
839 *aphD*. No estudo de Han *et al.* (2022), todos os *S. agalactiae* isolados de vacas
840 leiteiras com mastite clínica, analisados apresentaram alta sensibilidade aos
841 aminoglicosídeos e foram detectados os seguintes genes: *aph(3')-Ia*, *ant(3')-I*, *aac(6')-*
842 *Ib* e *aac(3')-Ib* (genes de resistência a aminoglicosídeos). Um estudo no norte da
843 China, isolou estreptococos de vacas com mastite, com sensibilidade média aos

844 aminoglicosídeos (92,9%), sendo detectados o gene *aph3'* (Tian *et. al.*, 2019). Já no
845 estudo de Carra *et al.* (2021) todos os *Streptococcus agalactiae* analisados,
846 provenientes de bovinos e humanos, demonstraram resistência aos aminoglicosídeos
847 no Norte da Itália. A discrepância entre esses resultados (diferentes perfis fenotípicos
848 e genes relacionados) e nossas descobertas atuais, pode ser resultado de
849 disparidades na antibioticoterapia, o que envolve tanto qual o antibiótico está sendo
850 utilizado (ex. gentamicina, canamicina e outros) e também a dosagem (uso racional
851 ou não) que estão sendo empregados empregada na prática em diferentes regiões.

852 Outros genes para aminoglicosídeos foram pesquisados no presente estudo,
853 sendo o *aphA3* (conhecido também como *aph(3'')-III*) mais comumente disseminado
854 entre bactérias Gram-positivas. Este gene confere resistência à canamicina,
855 neomicina, lividomicina, paromomicina, livostamicina, butirosina, amicacina e
856 isepamicina (Vakulenko e Mobashery, 2003). Muitas vezes, a presença do gene
857 *aphA3* em bactérias Gram-positivas está associada à existência de genes que
858 codificam outras enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, ou então está
859 geneticamente ligada a genes de resistência a diferentes classes de antimicrobianos
860 (Udo e Dashti, 2000; Werner *et. al.*, 2001;). Como por exemplo, enterococos clínicos
861 que expressam *aphA3* são resistentes ao sinergismo amicacina-ampicilina (Leclercq
862 *et. al.* 1992; Vakulenko e Mobashery, 2003). As linhagens de *S. agalactiae* analisadas
863 no presente estudo, não continham esse gene.

864 Outro gene conhecido relacionado à resistência aos aminoglicosídeos é o *aad-*
865 *6* (conhecido também como *aadE* e ANT(6)-Ia), que codifica resistência à
866 estreptomicina. O gene *aad-6* foi encontrado por hibridização DNA-DNA em mais de
867 80% dos isolados clínicos identificados como enterococos e estafilococos na Europa.
868 E em uma pesquisa conduzida no Japão, foram examinadas cepas de enterococos
869 por meio de PCR para verificar a existência de genes relacionados a enzimas
870 modificadoras de aminoglicosídeos e o gene ANT(6)-Ia foi detectado em quase
871 metade dos *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* analisados (Vakulenko e
872 Mobashery, 2003). No presente estudo o gene *aadE* não foi detectado em nenhuma
873 das linhagens analisadas.

874 Os antimicrobianos da classe dos betalactâmicos ainda continuam sendo a
875 primeira escolha para o tratamento da mastite causada por *S. agalactiae* (Denamiel *et*
876 *al.*, 2005), embora já exista relato de resistência nesses microrganismos de origem de

877 vacas leiteiras (Hu *et. al*, 2018). Tian *et. al*. (2019), isolou estreptococos em vacas
878 leiteiras com mastite na China, com taxa de resistência de 100% à penicilina. No
879 presente estudo, 13 linhagens apresentaram resistência ao teste de disco difusão aos
880 beta-lactâmicos, sendo que sete (9%) são resistentes a ampicilina, outros sete (9%) a
881 penicilina e 11 (14,1%) a oxacilina. Desses, cinco linhagens (621, 628, 633, 635 e 749)
882 apresentaram resistência a todos os betalactâmicos testados (ampicilina, penicilina e
883 oxacilina). Mais estudos se fazem necessários com essas linhagens a fim de investigar
884 qual o mecanismo molecular dessas resistências.

885 Em outras espécies de patógenos contagiosos como *Staphylococcus aureus*,
886 a presença do gene de resistência *blaZ*, expressa resistência aos antimicrobianos,
887 especialmente os betalactâmicos, fazendo com que a escolha do antimicrobiano para
888 tratamento das infecções causadas por este patógeno, fique limitada. Para todos os
889 genes pesquisados em *S. agalactiae*, foi possível correlacionar a presença do gene
890 de resistência e o perfil fenotípico. Em alguns casos, foi possível observar a presença
891 de genes de resistência em linhagens com fenótipo suscetível ao antibiótico em
892 questão. Em 18 (23,1%) linhagens susceptíveis a gentamicina, foi possível observar
893 a presença do gene *aacA-aphD*. Em 9 (11,5%) linhagens susceptíveis a eritromicina,
894 foi possível observar a presença do gene *ermB* e em 3 (3,8%) linhagens susceptíveis
895 a tetraciclina foi detectado o gene *tetO* (n=4, 5,1%) e *tetM* (n=3, 3,8%). Também foi
896 possível observar que algumas linhagens, resistentes aos antimicrobianos avaliados
897 no teste fenotípico, não possuíam quaisquer dos genes de resistência pesquisados.
898 Em 35 (44,9%) linhagens resistentes a gentamicina não foi detectado nenhum dos
899 determinantes avaliados no presente trabalho (*aacA-aphD*, *aphA3*, *aad-6*). Em 2
900 (2,6%) linhagens resistentes à eritromicina, não foi possível detectar nem *ermA*, nem
901 *ermB*. E em 8 linhagens resistentes à tetraciclina, não foi possível detectar os
902 determinantes genéticos relacionados a tetraciclina que foram avaliados (*tetK*, *tetL*,
903 *tetO* e *tetM*). Contudo, é importante destacar que no presente estudo nem todos os
904 genes relacionados aos fenótipos de resistência a gentamicina, eritromicina e
905 tetraciclina foram pesquisados. Assim, em estudos futuros é necessário a inclusão de
906 *primers* para a pesquisa dos genes *tetZ* e *tcr3* (associados ao mecanismo de efluxo
907 do antibiótico tetraciclina); *tetS*, *tetW*, *tetQ*, *tetT* e *otrA* (associados ao mecanismo de
908 proteção ao ribossomo contra ação da tetraciclina); *ermC*, *ermT* e *ermLF* (associados
909 ao mecanismo de metilação do ribossomo para proteger contra a ação de

910 eritromicina); *mefA* (associado a bomba de efluxo de eritromicina); e *aac6-li*, *ant4-la*,
911 *aph2-lb*, *aph2-lc* e *6'-le-aph 2-la* (relacionados a resistência a aminoglicosídeos,
912 classe em que pertence a gentamicina) (Colautti et al., 2022). Além disso, novos
913 primers podem ser desenhados se pertinente a partir da análise dos genomas dos
914 microrganismos estudados e a partir da descoberta de novos mecanismos de
915 resistência relacionados aos antimicrobianos em questão.

916 Esses resultados que correlacionam os dados de fenótipo e genótipo e
917 demonstram que nem sempre há uma correlação entre o perfil fenotípico e a presença
918 de genes de resistência, são de grande importância. Isso porque, os resultados do
919 teste fenotípico indicam a qual antibiótico o microrganismo possui suscetibilidade ou
920 não, e o genotípico se relaciona ao mecanismo de resistência, podendo ou não
921 fornecer dados que permitam o conhecimento de como essa resistência está sendo
922 estabelecida. Ademais, correlacionando os dados de fenótipo e genótipo é possível
923 ter uma visão mais acurada sobre a resistência a antimicrobianos em rebanhos
924 bovinos leiteiros. Isso porque, ao correlacionar os resultados, é possível inferir se a
925 resistência é intrínseca (específica para gêneros e espécies bacterianas) e extrínseca
926 (ou adquirida, o que acontece na maioria das vezes pela aquisição de genes por
927 transferência horizontal).

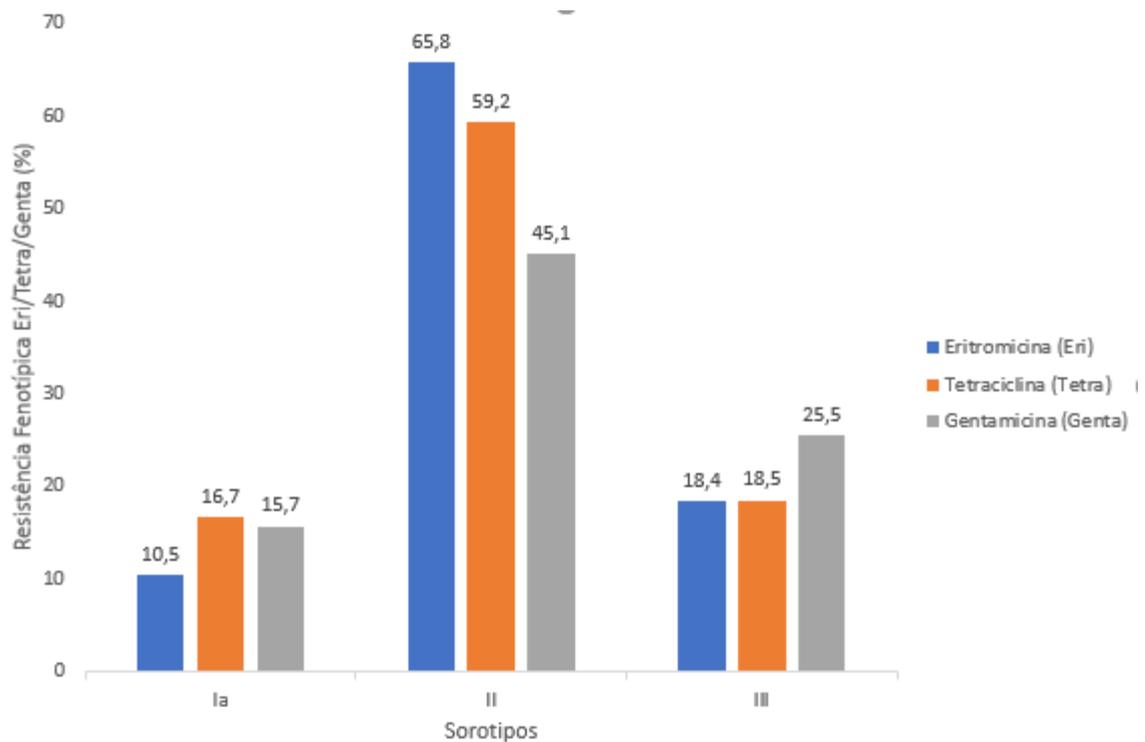
928 No entanto, um fenótipo negativo não garante a ausência de genes de
929 resistência que podem ser transferidos. Isso porque, a ausência de expressão de um
930 determinado gene (ou fenótipo negativo) pode ocorrer devido à sua localização
931 distante do promotor ou à sua ausência na região a frente de uma sequência
932 codificante (Gao et al., 2021). Portanto, além da análise em nível molecular, é
933 interessante a realização do sequenciamento do genoma a fim de identificar a
934 presença do gene, e também sua posição, evitando falsas presunções. Por outro lado,
935 a presença do gene no genoma do microrganismo, nem sempre resultará em um
936 fenótipo de resistência. Gao et al. (2012) sugerem que a resistência fenotípica pode
937 resultar de mutações específicas em genes, e não necessariamente da presença
938 destes. Ainda, a possível presença de *stop* códons, inserções, ou deleções, podem
939 tornar o gene não funcional (Colautti et al., 2022).

940 Relacionando os sorotipos capsulares à resistência fenotípica aos
941 antimicrobianos (eritromicina, tetraciclina e gentamicina), neste estudo observa-se
942 que o sorotipo II apresentou elevadas resistências (65,8%; 59,2% e 45,1%)

943 respectivamente, aos 3 antimicrobianos (figura 3, tabela 6). No estudo realizado por
944 Pinto *et al.* (2013) não foi observada correlação entre a resistência à eritromicina e um
945 sorotipo específico, se opondo ao nosso. Isso sugere que essa correlação pode estar
946 relacionada à região de cada fazenda em estudo. Existem poucos relatos na literatura,
947 que estabeleçam essa correlação. É necessário mais estudos que evidenciem que
948 essa correlação esteja ligada à região geográfica das fazendas.

949 Compreender os fatores determinantes da infecção por *Streptococcus*
950 *agalactiae* em vacas leiteiras é crucial para a saúde do rebanho. A presença dessa
951 bactéria pode impactar a qualidade do leite, exigindo a identificação de métodos
952 preventivos e terapêuticos para assegurar um produto final de alta qualidade. A
953 investigação da resistência a antimicrobianos promove o uso racional desses
954 medicamentos na pecuária, preservando sua eficácia e mitigando o desenvolvimento
955 de resistência bacteriana. O monitoramento contínuo possibilita a compreensão da
956 epidemiologia e diversidade genética permitindo ajustes nas práticas de manejo,
957 incluindo biossegurança e estratégias de tratamento, contribuindo para a saúde global
958 dos animais.

959



960 **Figura 3 - Correlação entre fenótipos de resistência antimicrobiana e sorotipos**
 961 **capsulares de *S. agalactiae* isolados de leite bovino de fazendas da Zona da Mata**
 962 **Mineira e Campo das Vertentes.**

963

964

965 **Tabela 6. Descrição dos antimicrobianos prevalentes x sorotipos capsulares das**
 966 **linhagens de *S. agalactiae* em fazendas da Zona da Mata e Campo das Vertentes.**

Antimicrobianos	Nº de linhagens	Sorotipos Nº (%)				
		Ia	II	III	NT	Falhou
Eritromicina	38	4 (10,5)	25 (65,8)	7 (18,4)	0 (0)	2 (5,3)
Tetraciclina	54	9 (16,7)	32 (59,2)	10 (18,5)	0 (0)	3 (5,6)
Gentamicina	51	8 (15,7)	23 (45,1)	13 (25,5)	6 (11,7)	1 (2)

967

968

969

970

971

972 5 Conclusão

973

974 *S. agalactiae* está presente em praticamente todas as propriedades estudadas,
975 persistindo nas fazendas leiteiras mesmo com intervalo de 20 meses entre a primeira
976 e quarta coletas. Cento e quarenta e um isolados de *S. agalactiae* foram utilizadas
977 neste estudo, a partir disso, foram encontrados sorotipos Ia, II e III, sendo o sorotipo
978 II foi o mais frequente entre as linhagens de *S. agalactiae* geneticamente distintos
979 provenientes de rebanhos bovinos leiteiros na região da Zona da Mata Mineira e
980 Campos das Vertentes, linhagens entre os anos de 2009 e 2011. Além disso, a análise
981 do perfil fenotípico de suscetibilidade antimicrobiana demonstrou que mais de 40%
982 das linhagens analisadas apresentam resistência à tetraciclina, gentamicina,
983 clindamicina e eritromicina. E com a análise dos genes de resistência relacionados a
984 resistência à tetraciclina, eritromicina e gentamicina, foi possível observar que a
985 resistência a esses antimicrobianos nas linhagens analisados está relacionada à
986 presença dos genes *tetO* e *tetM*, *ermB* e *aacA-aphD*, elucidando sobre os
987 mecanismos de resistência prevalentes na região e no período de estudo realizado.
988 Em tempo, foi possível observar linhagens resistentes aos beta-lactâmicos, grupo de
989 antimicrobianos de primeira escolha no tratamento da mastite causada por *S.*
990 *agalactiae*. No entanto, as análises realizadas também sugerem que outros genes e
991 mecanismos de resistência, além dos analisados no presente estudo, podem estar
992 envolvidos nos fenótipos de resistência estudados, uma vez que em algumas
993 linhagens com fenótipo de resistência não foi encontrado nenhum dos genes
994 analisados. Nosso trabalho destaca a importância de novos estudos epidemiológicos
995 abrangentes, incluindo análise do sorotipo, e análises fenotípicas e genotípicas de
996 resistência antimicrobiana, incluindo outros antimicrobianos e outros genes, a fim de
997 desenvolver estratégias de prevenção e tratamento mais eficazes em rebanhos
998 bovinos leiteiros.

999

1000

1001

1002

1003

1004

1005 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1006

1007 Abdul Mawjood, A; Lammler, C. Amplification of 16S ribosomal RNA gene sequences
1008 for the identification of streptococci of Lancefield group B. **Research in Veterinary**
1009 **Science**, v. 67, n. 2, p. 159–162, 1999.

1010

1011 Acosta, A. C. et al. Mastitis in ruminants in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.
1012 36, n. 7, p. 565–573, 2016.

1013

1014 Associação Brasileira de Criadores de Suíno (ABCS). **O uso prudente e eficaz de**
1015 **antibióticos na suinocultura**. 2022. Disponível em:< [https://abcs.org.br/wp-](https://abcs.org.br/wp-content/uploads/2022/06/Livro-ABCS-WEB-1-1_compressed.pdf)
1016 [content/uploads/2022/06/Livro-ABCS-WEB-1-1_compressed.pdf](https://abcs.org.br/wp-content/uploads/2022/06/Livro-ABCS-WEB-1-1_compressed.pdf)>. Acesso em: 12 de
1017 Janeiro de 2024.

1018

1019 Akhtar, M. S.; Krishnan, M. Y.; Bhakuni, V. Insights into the mechanism of action of
1020 hyaluronate lyase: Role of C-terminal domain and Ca²⁺ in the functional regulation of
1021 enzyme. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 38, p. 28336–28344, 2006.

1022

1023 Almeida, P. A. A. **Desenvolvimento e avaliação de método molecular baseado em**
1024 **PCR multiplex para detecção de genes de resistência a antimicrobianos**
1025 **relevantes para o controle da mastite bovina**. 2018. 82f. Dissertação (Mestrado
1026 Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados) - Faculdade de Farmácia,
1027 Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF, Juiz de Fora, Disponível em
1028 <<https://repositorio.ufjf.br/jspui/browse?type=author&value=Almeida%2C+Paula+Ap+recida+Azevedo>>. Acesso em 23 de outubro de 2023. 2018.

1030

1031 Ashraf, A.; Imran, M. Diagnosis of bovine mastitis: from laboratory to farm. **Tropical**
1032 **Animal Health and Production**, v. 50, n. 6, p. 1193–1202, 2018.

1033

1034 Ashraf, A.; Imran, M. Causes, types, etiological agents, prevalence, diagnosis,
1035 treatment, prevention, effects on human health and future aspects of bovine mastitis.
1036 **Animal health research reviews**, v. 21, n. 1, p. 36-49, 2020.

1037

1038 Barrocas, E. N. Machado, J. C; Figueira, A. R.; Souza, R. M.; Ishida, A. K. N.; Zacaroni,
1039 A. B.; Rocha, H. S. Uso de técnicas moleculares para diagnose de patógenos em
1040 sementes. **Informe Agropecuário**, v. 30, n. 253, p. 24-32, nov./dez., 2009.

1041

1042 Barros, R. R. Antimicrobial Resistance among Beta-Hemolytic *Streptococcus* in Brazil:
1043 An Overview. **Antibiotics (Basel)**. v. 12; n. 10(8); p. 973. doi:
1044 10.3390/antibiotics10080973. PMID: 34439023; PMCID: PMC8388994.2021.

1045

1046 Benson, J. A.; Ferrieri, P. Rapid pulsed-field gel electrophoresis method for group B
1047 streptococcus isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 8, p. 3006–3008,
1048 2001.

1049

1050 Brasil. Ministério da Saúde. Saúde Única. 2023. Disponível em:
1051 <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/s/saude-unica> Acesso
1052 16/01/2024.

1053

- 1054 Brito, J. R. F.; Brito, M. A. V. P.; Arcuri, E. F. **Como (re)conhecer e controlar a**
1055 **mastite em rebanhos bovinos**. Informe Técnico. 2002. Disponível em
1056 <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/594822/1/CT70Comoreconhe>
1057 [cerecontrolaramastite.pdf](https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/594822/1/CT70Comoreconhe)>. Acesso em 16 jan 2024.
1058
- 1059 Brito, M. A. V.P.; Brito, J. R. F.; Mendonça, L. C. Mastite e Qualidade do leite. Informe
1060 Técnico. 2012. Disponível em
1061 <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/942831/1/Mastite-e->
1062 [qualidade-do-leite.pdf](https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/942831/1/Mastite-e-). Acesso em 08 março 2024.
1063
- 1064 Burtet, J. V. **Genotipagem de isolados de Streptococcus agalactiae em pacientes**
1065 **atendidos no Hospital Universitário de Santa Catarina**. 2019. 39f. Trabalho de
1066 Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Centro de Ciências da Saúde da
1067 Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, Santa Catarina, Disponível em:
1068 <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/199224/Jo%c3%a3o%20Vitor>
1069 [%20Burtet.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/199224/Jo%c3%a3o%20Vitor) Acesso em: 10/01/2024.
1070
- 1071 Cadona, Jimena Soledad et al. Draft genome sequence of *Streptococcus agalactiae*
1072 TA B490, a multidrug-resistant strain isolated from bovine mastitis in Argentina.
1073 **Microbiology Resource Announcements**, v. 10, n. 5, p. 10.1128/mra. 01429-20,
1074 2021.
1075
- 1076 Carvalho-Castro, G. A.; Silva, J. R.; Paiva, L. V.; Custódio, D. A. C.; Moreira, R.O.;
1077 Mian, G. F.; Prado, I. A.; Chalfun-Junior, A.; Costa, G. M. Molecular epidemiology of
1078 *Streptococcus agalactiae* isolated from mastitis in Brazilian dairy herds. **Braz J**
1079 **Microbiol.** 2017 Jul-Sep;48(3):551-559. doi: 10.1016/j.bjm.2017.02.004. Epub 2017
1080 Feb 16. PMID: 28256391; PMCID: PMC5498452.
1081
- 1082 Carra, E.; Russo, S.; Micheli, A.; Garbarino, C.; Ricchi, M.; Bergamini, F. et al.
1083 Evidence of Common Isolates of *Streptococcus agalactiae* in Bovines and Humans in
1084 Emilia Romagna Region (Northern Italy). **Front Microbiol.** 2021;12:673126.
1085 pmid:34177854.
1086
- 1087 Castro, T. et al. Distribution of serotypes and evaluation of antimicrobial susceptibility
1088 among Original article Distribution of serotypes and evaluation of antimicrobial
1089 susceptibility among human and bovine *Streptococcus agalactiae* strains isolated in
1090 Brazil between 1980 and 2006. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 2,
1091 p. 131–136, 2013.
1092
- 1093 Cheng, W. N.; Han, S. G. Bovine mastitis: risk factors, therapeutic strategies, and
1094 alternative treatments — A review. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**,
1095 v. 33, n. 11, p. 1699–1713, 2020.
1096
- 1097 Chopra, I.; Roberts, M. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications,
1098 Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. **Microbiology and**
1099 **Molecular Biology Reviews**, June 2001, p. 232–260.
1100
- 1101 Choi J, Rieke EL, Moorman TB, Soupir ML, Allen HK, Smith SD, Howe A. Practical
1102 implications of erythromycin resistance gene diversity on surveillance and monitoring
1103 of resistance. **FEMS Microbiol Ecol.** 2018 Apr 1;94(4):fyy006. doi:

- 1104 10.1093/femsec/fiy006. PMID: 29346541; PMCID: PMC5939627.
1105
- 1106 Cobirka, M.; Tancin, V.; Slama, P. Epidemiology and classification of mastitis.
1107 **Animals**, v. 10, n. 12, p. 1–17, 2020.
1108
- 1109 Colautti, A.; Arnoldi, M.; Comi, G.; Iacumim, L. Antibiotic resistance and virulence
1110 factors in lactobacilli: something to carefully consider. **Food Microbiology**, v. 103, May
1111 2022.
- 1112 Corrêa, A. B. A. et al. Virulence characteristics of genetically related isolates of group
1113 B streptococci from bovines and humans. **Veterinary Microbiology**, v. 143, n. 2–4, p.
1114 429–433, 2010.
1115
- 1116 Corrêa, A. B. A.; Silva, L.G.; Pinto, T. C. A.; Oliveira, I. C. M.; Fernandes, F. G.; Costa,
1117 N. S.; Mattos, M. C.; Fracalanza, S. E. L.; Benchetrit, L. C. The genetic diversity and
1118 phenotypic characterisation of *Streptococcus agalactiae* isolates from Rio de Janeiro,
1119 Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol. 106(8): 1002-1006, December
1120 2011.
1121
- 1122 Crestani, C.; Forde, T. L.; Lycett, S. J.; Holmes, M. A.; Fath, C.; Persson-Waller, K.;
1123 Zadoks, R. N. The fall and rise of group B *Streptococcus* in dairy cattle: reintroduction
1124 due to human-to-cattle host jumps? **Microbial Genomics**, v. 7, n. 9, 2021.
1125
- 1126 Barbosa, T. D. F.; Lima, L. F.; Souto, R. C. F. Doença Neonatal Associada Ao
1127 *Estreptococo Do Grupo B*. **Saúde.com**, v. 13, n. 4, p. 1027–1033, 2017.
1128
- 1129 Degraives, E. W. Mastitis therapy and pharmacology. **Veterinary Clinics of North
1130 America: food animal practice**, v. 19, n. 1, p. 109–138, 2003.
1131
- 1132 Demil, E.; Teshome, L.; Kerie, Y.; Habtamu, A.; Kumulachew, W.; Andualem, T.;
1133 Mekonnen, S. A. Prevalence of subclinical mastitis, associated risk factors and
1134 antimicrobial susceptibility of the pathogens isolated from milk samples of dairy cows
1135 in Northwest Ethiopia. **Prev Vet Med.** v. 205:105680. doi:
1136 10.1016/j.prevetmed.2022.105680. Epub 2022 May 26. PMID: 35691136. 2022.
1137
- 1138 Denamiel, G.; Llorente, P.; Carabella, M., Rebuelto, M.; Gentilini, I E. Anti-microbial
1139 susceptibility of *Streptococcus* sp. isolated from bovine mastitis in Argentina. **J. Vet.
1140 Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health.** v. 52 (15876224), p. 125-128. 2005.
1141
- 1142 Di Pilato, V.; Papa-Ezdra, R.; Chiarelli, A.; García-Fulgueiras, V.; Pallecchi, L.; Vignoli,
1143 R. Characterization of the first *bla*CTX-M-14/*erm*B-carrying IncI1 plasmid from Latin
1144 America. **Plasmid**, v. 102, March 2019, p. 1-5.
1145
- 1146 Dogan, B. et al. Distribution of Serotypes and Antimicrobial Resistance Genes among
1147 *Streptococcus agalactiae* Isolates from Bovine and Human Hosts. **J Clin Microbiol.** v.
1148 43, n. 12, p. 5899–5906, 2005.
1149
- 1150 Doran, K. S. et al. Blood-brain barrier invasion by group B *Streptococcus* depends
1151 upon proper cell-surface anchoring of lipoteichoic acid. **Journal of Clinical
1152 Investigation**, v. 115, n. 9, p. 2499–2507, 2005.

- 1153 Doran, K. S.; Nizet, V. Molecular pathogenesis of neonatal group B streptococcal
1154 infection: No longer in its infancy. **Molecular Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 23–31, 2004.
1155
- 1156 Doumith, M. et al. Genomic sequences of *Streptococcus agalactiae* with high-level
1157 gentamicin resistance, collected in the BSAC bacteraemia surveillance. **J Antimicrob**
1158 **Chemother.** 2017;72(10):2704–7.
1159
- 1160 Dramsi, S.; Trieu-Cout, P.; Bierne, H. Shorting sortases: a nomenclature proposal for
1161 the various sortases of gram-positive bacteria. **Research in Microbiology**, v. 156, n.
1162 3^a, p. 289–297, 2005.
1163
- 1164 Duarte, R. S. et al. Phenotypic and molecular characteristics of *Streptococcus*
1165 *agalactiae* isolates recovered from milk of dairy cows in Brazil. **Journal of Clinical**
1166 **Microbiology**, v. 42, n. 9, p. 4214–4222, 2004.
1167
- 1168 Duarte, R. S. et al. Distribution of antimicrobial resistance and virulence-related genes
1169 among Brazilian group B streptococci recovered from bovine and human sources.
1170 **Antimicrob Agents Chemother.** v. 49; n. 1; p. 97-103. doi: 10.1128/AAC.49.1.97-
1171 103.2005. PMID: 15616281; PMCID: PMC538850. 2005.
1172
- 1173 Dutra, V. G. et al. *Streptococcus agalactiae* in Brazil: serotype distribution, virulence
1174 determinants and antimicrobial susceptibility. **BMC Infectious Diseases**, 14:323,
1175 2014.
1176
- 1177 Elias, A. O. et al. Molecular detection of *Streptococcus agalactiae* in bovine raw milk
1178 samples obtained directly from bulk tanks. **Research in Veterinary Science**, v. 93, n.
1179 1, p. 34–38, 2012.
1180
- 1181 Farnsworth. R.; Stewart. S. Reid. D. Dealing with *Streptococcus agalactiae* Mastitis.
1182 QUALITY COUNT\$ Seminars and Workshops. 2003. Disponível em:
1183 <qualitycounts.umn.edu/sites/qualitycounts.umn.edu/files/2022-01/f-mc-2.pdf>.
1184 Acesso em 25 nov. 2022.
1185
- 1186 Fonseca, M. E. B.; Mourão, A. M.; Chagas, J. D. R.; Ávila, L. M.; Marques, T. L. P.;
1187 Baêta, B. A.; Moraes, R. F. F.; Roier, E. C. R. Mastite Bovina: Revisão. **Pubvet**, v.15,
1188 n.02, a743, p.1-18, fev., 2021.
1189
- 1190 Gandra, E. Á. et al. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos.
1191 **Acta Sci. Technol.** v. 30, n. 1, p. 109-118, 2008.
1192
- 1193 Gao, J.; Yu, F.Q.; Luo, L.P.; He, J.Z.; Hou, R.G.; Zhang, H.Q.; Li, S.M.; Su, J.L.; Han,
1194 B. Antibiotic resistance of *Streptococcus agalactiae* from cows with mastitis. **Vet. J.** v.
1195 194 (22627045); p. 423-424. 2012.
1196
- 1197 Gibson, Ronald; Nizet, Victor; Rubens, C. Group B Streptococcal Beta-hemolysin
1198 promotes injury of lung microvascular endothelial cells. **Pediatric Reserach**, v. 45, p.
1199 626–634, 1999.
1200
- 1201 Goering, R. V. Pulsed field gel electrophoresis: A review of application and
1202 interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. **Infection, genetics**

- 1203 **and evolution**, Amsterdam, v. 10, n. 7, p. 866-875, Oct. 2010.
- 1204
- 1205 Gomes, F.; Henriques, M. Control of Bovine Mastitis: Old and Recent Therapeutic
- 1206 Approaches. **Current Microbiology**, v. 72, n. 4, p. 377–382, 2016.
- 1207 Gomes, F.; Saavedra, M. J.; Henriques, M. Doença da mastite bovina/patogenicidade:
- 1208 evidência do papel potencial de biofilmes microbianos. **Patógenos e Doenças**, V. 74,
- 1209 Edição 3, abril de 2016.
- 1210
- 1211 Guérin-Faublée, V. et al. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus* species isolated
- 1212 from clinical mastitis in dairy cows. **International Journal of Antimicrobial Agents**,
- 1213 v. 19, n. 3, p. 219–226, 2002.
- 1214
- 1215 Hacker, SS. **Polissacarídeo capsular do *Streptococcus agalactiae* como antígeno**
- 1216 **vacinal: desenvolvimento de um modelo vacinal para mucosas com**
- 1217 **Nanopartícula de quitosana**. 2019. 133f. Tese (Programa de Pós-Graduação em
- 1218 Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica - Área de Tecnologia de Fermentações) -
- 1219 Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo. Disponível em
- 1220 <[https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9134/tde-28012019-](https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9134/tde-28012019-104318/publico/Sibylle_Sophie_Hacker_DO_Corrigida.pdf)
- 1221 [104318/publico/Sibylle_Sophie_Hacker_DO_Corrigida.pdf](https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9134/tde-28012019-104318/publico/Sibylle_Sophie_Hacker_DO_Corrigida.pdf)>. Acesso em 16 jan 2024.
- 1222 2019
- 1223
- 1224 Han, Guangli et al. Molecular typing and prevalence of antibiotic resistance and
- 1225 virulence genes in *Streptococcus agalactiae* isolated from Chinese dairy cows with
- 1226 clinical mastitis. **Plos one**, v. 17, n. 5, p. e0268262, 2022.
- 1227
- 1228 Hanna, M.; Noor, A. **Estreptococo Do Grupo B Etiologia**. P. 1–10, 2021.
- 1229
- 1230 Hernandez, L.; Bottini, E.; Cadona, J.; Cacciato, C.; Monteavaro, C.; Bustamante, A.;
- 1231 Sanso, A. M. Multidrug Resistance and Molecular Characterization of streptococcus
- 1232 agalactiae isolates from dairy cattle with mastitis, **Frontiers in Cellular and Infection**
- 1233 **Microbiology**, v. 11, April 2021.
- 1234
- 1235 Horaud, T.; Céspèdes, G.; Trieu-Cuot, P. Chromosomal gentamicin resistance
- 1236 transposon Tn3706 in *Streptococcus agalactiae* B128. **Antimicrob Agents**
- 1237 **Chemother.** 1996 May;40(5):1085-90. doi: 10.1128/AAC.40.5.1085. PMID: 8723445;
- 1238 PMID: PMC163270.
- 1239
- 1240 Hu, Y.; Kan, Y.; Zhang, Z.; Lu, Z.; Li, Y.; Leng, C.; Ji, J.; Song, S.; Shi, H. New
- 1241 Mutations of Penicillin-Binding Proteins in *Streptococcus agalactiae* Isolates from
- 1242 Cattle with Decreased Susceptibility to Penicillin. **Microb Drug Resist.** 2018
- 1243 Oct;24(8):1236-1241. doi: 10.1089/mdr.2017.0223. Epub 2018 Feb 23. PMID:
- 1244 29473792.
- 1245
- 1246 Imperi, M. Et al. A multiplex PCR assay for the direct identification of the capsular type
- 1247 (Ia to IX) of *Streptococcus agalactiae*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 80, n.
- 1248 2, p. 212-214, 2010.
- 1249
- 1250 Jacobsson, K. A novel family of fibrinogen-binding proteins in *Streptococcus*
- 1251 *agalactiae*. **Veterinary Microbiology**, v. 96, n. 1, p. 103–113, 2003.
- 1252

- 1253 Jonsson, I. M. Et al. Role of fibrinogen-binding adhesin expression in septic arthritis
1254 and septicemia caused by *Streptococcus agalactiae*. **Journal of Infectious Diseases**,
1255 v. 192, n. 8, p. 1456–1464, 2005.
1256
- 1257 Jürgens, D.; Sterzik, B.; Fehrenbach, F. J. Unspecific binding of group B streptococcal
1258 cocytolysin (camp factor) to immunoglobulins and its possible role in pathogenicity.
1259 **Journal of Experimental Medicine**, v. 165, n. 3, p. 720–732, 1987.
1260
- 1261 Kaczorek, E.; Małaczewska, J.; Wójcik, R.; Rękawek, W.; Siwicki, A. K. Phenotypic
1262 and genotypic antimicrobial susceptibility pattern of *Streptococcus* spp. isolated from
1263 cases of clinical mastitis in dairy cattle in Poland. **Journal of Dairy Science** Vol. 100
1264 No. 8, 2017
1265
- 1266 Karbelitz, T.; Aubry, E.; Van Vorst, K.; Amon, T.; Fulde, M. The Role of *Streptococcus*
1267 spp. in Bovine Mastitis. **Microorganisms** 2021, 9, 1497. [https://doi.org/10.3390/](https://doi.org/10.3390/microorganisms9071497)
1268 [microorganisms9071497](https://doi.org/10.3390/microorganisms9071497)
1269
- 1270 Keefe, G. Update on control of staphylococcus aureus and streptococcus agalactiae
1271 for management of mastitis. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal**
1272 **Practice**, v. 28, n. 2, p. 203–216, 2012.
1273
- 1274 Keefe, G. P.; Dohoo, I. R.; Spangler, E. Herd prevalence and incidence of
1275 *Streptococcus agalactiae* in the dairy industry of Prince Edward Island. **Journal of**
1276 **dairy science**. v. 80. n. 3. p. 464-470. 1997.
1277
- 1278 Kishk, R. M.; Anani, M. M.; Nemr, N. A.; Soliman, N. M.; Fouad, M. M. Inducible
1279 clindamycin resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* in Suez Canal
1280 University Hospital, Ismailia, Egypt. **The Journal of Infection in developing**
1281 **countries**, 14(11):1281-1287, 2020.
1282
- 1283 Klaas, I. C.; Zadoks, R. N. An update on environmental mastitis: Challenging
1284 perceptions. **Transboundary and emerging diseases**, v. 65, p. 166-185, 2018.
1285
- 1286 Krömker, V.; Leimbach, S. Mastitis treatment—Reduction in antibiotic usage in dairy
1287 cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, p. 21–29, 2017.
1288
- 1289 Lachenauer CS, Kasper DL, Shimada J, Ichiman Y, Ohtsuka H, Kaku M, Paoletti LC,
1290 Ferrieri P, Madoff LC. Serotypes VI and VIII predominate among group B streptococci
1291 isolated from pregnant Japanese women. **J Infect Dis**. 1999 Apr;179(4):1030-3. doi:
1292 10.1086/314666. PMID: 10068604.
1293
- 1294 Lang, S.; Palmer, M. Characterization of *Streptococcus agalactiae* CAMP factor as a
1295 pore-forming toxin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 40, p. 38167–38173,
1296 2003.
1297
- 1298 Langoni, H.; Salina, A.; Oliveira, G. C.; Junqueira, N. B.; Menozzi, B. D.; Joaquim, S.
1299 F. Considerações sobre o tratamento das mastites. **Pesq. Vet. Bras.** 37 (11): 1261-
1300 1269, 2017.
1301
- 1302 Leclercq, R., Dutka-Malen, S.; Brisson-Noel, A.; Molinas, C.; Derlot, E.; Arthur, M.;

- 1303 Duval, J.; Courvalin, P..1992. Resistance of enterococci to aminoglycosides and
1304 glycopeptides. **Clin. Infect. Dis.**15:495–501
1305
- 1306 Leghari, A.; Lakho, S. A.; khand, F. M.; Bhutto, K. R.; Lone, S. Q.; Aleem, M.T.;Bano,
1307 I.; Chandio, M. A.; Shah, J. M.; LIN H. X.; Fan, H. J. Molecular epidemiology,
1308 characterization of virulence factors and antibiotic resistance profile of *Streptococcus*
1309 *agalactiae* isolated from dairy farms in China and Pakistan. **Journal of Integrative**
1310 **Agriculture** 2023, 22(5): 1514–1528
1311
- 1312 Li, S.; Jedrzejewski, M. J. Hyaluronan Binding and Degradation by *Streptococcus*
1313 *agalactiae* Hyaluronate Lyase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 44, p.
1314 41407–41416, 2001.
1315
- 1316 Lin, L.; Huang, X.; Yang, H. Y.; He, Y.; He, X.; Huang, J.; Li, S.; Wang, X.; Tang, S.;
1317 Liu, G.; Pan, Z. Molecular epidemiology, antimicrobial activity, and virulence gene
1318 clustering of *Streptococcus agalactiae* isolated from dairy cattle with mastitis in China.
1319 **Journal of Dairy Science**, Vol. 104 No. 4, 2021
1320
- 1321 Lima, L. M. Conceitos Básicos de Técnicas de Biologia Molecular, **Documentos 191**,
1322 EMBRAPA, setembro, 2008.
1323
- 1324 Kummer, R. M. Manejo da ordem e prevenção da mastite bovina. **Trabalho de**
1325 **conclusão de graduação**. (2019). Disponível em
1326 <<http://hdl.handle.net/10183/199513>>. Acesso em 29 dez 2023.
1327
- 1328 Loureiro, R. J; Roque, F; Rodrigues, A. T.; Herdeiro, M T.; Ramalheira, E. O uso de
1329 antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Revista**
1330 **Portuguesa de Saúde Pública**, v. 34, n. 1, p. 77–84, 2016.
1331
- 1332 Luna, V. A. et al. A variety of Gram-positive bacteria carry mobile *mef* genes. **Journal**
1333 **of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 44, n. 1, p. 19–25, 1999.
1334
- 1335 Maisey, H. C. et al. Group B streptococcal pilus proteins contribute to adherence to
1336 and invasion of brain microvascular endothelial cells. **Journal of Bacteriology**, v. 189,
1337 n. 4, p. 1464–1467, 2007.
1338
- 1339 Maisey, H. C. et al. Resistance and systemic virulence. **The FASEB Journal**, v. 22, n.
1340 6, p. 1715–1724, 2009.
1341
- 1342 Maresco, Anthony W; Schneewind, O. Sortase as a target of anti-infective therapy.
1343 **Pharmacological Reviews**, v. 1, p. 128–141, 2008.
1344
- 1345 Martin, P. et al. Symposium review: Novel strategies to genetically improve mastitis
1346 resistance in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 3, p. 2724–2736, 2018.
1347 Martinez, J. L. et al. A global view of antibiotic resistance. **FEMS Microbiology**
1348 **Reviews**, v. 33, n. 1, p. 44–65, 2009.
1349
- 1350 Massiero, M. ; Furquim da Cruz, A. ; Abreu, B. A. C. ; Gileno, M. C. Avaliação das
1351 funções dos neutrófilos sob o efeito da penicilina e na presença do *Streptococcus*
1352 *agalactiae*. **Revista Brasileira Multidisciplinar**, [S. l.], v. 26, n. 2, p. 25-39, 2023. DOI:

- 1353 10.25061/2527-2675/ReBraM/2023.v26i2.1427. Disponível em:
1354 <https://www.revistarebram.com/index.php/revistauniara/article/view/1427>. Acesso em:
1355 29 dez. 2023.
- 1356
1357 McDougall S, Penry J, Dymock D. Antimicrobial susceptibilities in dairy herds that differ
1358 in dry cow therapy usage. **J Dairy Sci.** v. 104; n. 8; p. 9142-9163. doi:
1359 10.3168/jds.2020-19925. Epub 2021 May 15. PMID: 34001359. 2021.
- 1360
1361 Merl, K. et al. Determination of epidemiological relationships of *Streptococcus*
1362 *agalactiae* isolated from bovine mastitis. **FEMS Microbiol Lett.** v. 226, p. 87–92, 2003.
- 1363
1364 Metcalf, B.J.; Chochua, S.; Gertz Jr. R.E.; Hawkins, P.A.; Ricaldi, J.; Li, Z.; Walker,
1365 H.; Tran, T.; Rivers, J.; Mathis, S.; Jackson, D.; Glennen, A.; Lynfield, R.; McGee, L.;
1366 Beall, B. Short-read whole genome sequencing for determination of antimicrobial
1367 resistance mechanisms and capsular serotypes of current invasive *Streptococcus*
1368 *agalactiae* recovered in the USA. **Clinical Microbiology and Infection** 23 (2017)
1369 574.e7e574.e14
- 1370
1371 Mesquita, A. A.; Rocha, C. M. B.M.; Bruhn, F. R. P.; Custódio, D. A. C.; Braz, M. S.;
1372 Pinto, S. M.; Silva, D. B.; Costa, G. M. *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus*
1373 *agalactiae*: prevalence, resistance to antimicrobials, and their relationship with quality
1374 of dairy cattle herds in Minas Gerais state, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary**
1375 **Research**, 39(5): 308-316, May, 2019.
- 1376
1377 Mesquita, A. A.; Ferrari, M. H. Impacto, prevalência e etiologia da mastite bovina
1378 causada por *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*. **Nutri.time**, v. 17,
1379 2020.
- 1380
1381 Miles, A. M.; Huson, H. J. Graduate Student Literature Review: Understanding the
1382 genetic mechanisms underlying mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 1, p.
1383 1183–1191, 2021.
- 1384
1385 Minst, K. et al. Short communication: *Streptococcus species* isolated from mastitis milk
1386 samples in Germany and their resistance to antimicrobial agents. **Journal of Dairy**
1387 **Science**, v. 95, n. 12, p. 6957–6962, 2012.
- 1388
1389 Myllys, V. et al. Association of Changes in the Bacterial Ecology of Bovine Mastitis with
1390 Changes in the use of Milking Machines and Antibacterial Drugs. **Acta Veterinaria**
1391 **Scandinavica**, v. 35, n. 4, p. 363–369, 1994.
- 1392
1393 Nakib, M. A. et al. Comparison of the Diversilab® system with multi-locus sequence
1394 typing and pulsed-field gel electrophoresis for the characterization of *Streptococcus*
1395 *agalactiae* invasive strains. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 85,
1396 p. 137–142, 2011.
- 1397
1398 Neto, F. P.; Zappa, V. Mastite Em Vacas Leiteiras- Revisão De Literatura. **Revista**
1399 **Científica Eletrônica De Medicina Veterinária**, v. 16, p. 1679–7353, 2011.
- 1400 Nsofor, C. A. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): principles and applications in
1401 molecular epidemiology: a review. **International Journal of Current Research in**
1402 **Medical Sciences**, v. 2, n. 2, p. 38-51, 2016.

- 1403
1404 Oliveira, R. P.; Bezerra, B. A.; Melo, R. P. B.; Silva, D. M. S.; Carvalho, R. G.; Juliano,
1405 M. A.; Farias, M. P. O.; Lira, N. S. C.; Mota, R. A. Mastite bovina no Nordeste do
1406 Brasil: Ocorrência de bactérias emergentes e seu perfil fenotípico e genotípico de
1407 resistência antimicrobiana. **Imunologia Comparada, Microbiologia e Doenças**
1408 **Infeciosas**, v. 85, junho de 2022.
1409
- 1410 OMS. Organização Mundial da Saúde. Antimicrobianos criticamente importantes para
1411 a medicina humana: 6ª revisão. 2019. Disponível em:
1412 [https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/312266/9789241515528-](https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/312266/9789241515528-eng.pdf?sequence=1)
1413 [eng.pdf?sequence=1](https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/312266/9789241515528-eng.pdf?sequence=1). Acesso em: 04 jan 2024.
1414
- 1415 Palmeiro, J.K. et al. Phenotypic and genotypic characterization of group B
1416 streptococcal isolates in southern Brazil. **J Clin Microbiol**. 2010 Dec;48(12):4397-403.
1417 doi: 10.1128/JCM.00419-10. Epub 2010 Sep 29. PMID: 20881175; PMCID:
1418 PMC3008495.
1419
- 1420 Patterson, Hayley; Saralahti, Anni; Parikka, Mataleena; Dramsi, Shaynoor; Trieu-Cuot,
1421 P. Adult zebrafish model of bacterial meningitis in *Streptococcus agalactiae* infection.
1422 **Developmental & Comparative Immunology**, p. 447–455, 2012.
1423
- 1424 Pedroso, R.P.; Martin, I.R.; Dos Santos, K. F. & Amoretty, P. R. **A mastite bovina e**
1425 **sua associação com a bactéria *Streptococcus agalactiae***. (2023). Congresso
1426 Brasileiro de Ciências e Saberes Multidisciplinares, (2). Disponível em
1427 <https://conferencias.unifoa.edu.br/tc/article/view/1045>. Acesso em 29 dez 2023.
1428
- 1429 Pereira, U. P. et al. Genotyping of *Streptococcus agalactiae* strains isolated from fish,
1430 human and cattle and their virulence potential in Nile tilapia. **Veterinary Microbiology**,
1431 v. 140, n. 1–2, p. 186–192, 2010.
1432
- 1433 Pezzicoli, A. et al. Pilus backbone contributes to group B Streptococcus paracellular
1434 translocation through epithelial cells. **Journal of Infectious Diseases**, v. 198, n. 6, p.
1435 890–898, 2008.
1436
- 1437 Pinto, T. C.; Costa, N.S.; Corrêa, A. B.; De Oliveira, I.C.; De Mattos, M. C.; Rosado, A.
1438 S.; Benchetrit, L. C. Conjugative transfer of resistance determinants among human
1439 and bovine *Streptococcus agalactiae*. **Braz J Microbiol**. 2014 Oct 9;45(3):785-9. doi:
1440 10.1590/s1517-83822014000300004. PMID: 25477908; PMCID: PMC4204959.
1441
- 1442 Pinto, T. C. A.; Costa, N. S.; Souza, A. R. V.; Silva, L. G.; Corrêa, A. B. A.; Fernandes,
1443 F. G.; Oliveira, I. C.; Mattos, M. C.; Rosado, A. S.; Benchetrit, L. C. Distribution of
1444 serotypes and evaluation of antimicrobial susceptibility among human and bovine
1445 *Streptococcus agalactiae* strains isolated in Brazil between 1980 and 2006. **The**
1446 **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 17, e. 2, março-abril de 2013 , páginas
1447 131-136
1448
- 1449 Poyart-Salmeron, C. et al. Transferable plasmid-mediated antibiotic resistance in
1450 *Listeria monocytogenes*. **The Lancet**, v. 335, n. 8703, p. 1422–1426, 1990.
1451
- 1452 Poyart C., Jardy L., Quesne G., Berche P., Trieu-Cuot P. Genetic basis of antibiotic

- 1453 resistance in *Streptococcus agalactiae* strains isolated in a French hospital.
1454 Antimicrob. **Agents Chemother.** v. 47 (12543695); p. 794-797. 2003.
1455
- 1456 Poyart, C. et al. Multiplex PCR assay for rapid and accurate capsular typing of group
1457 B streptococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 6, p. 1985–1988, 2007.
1458
- 1459 Poyart, C.; Celli, J.; Trieu-Cuot, P. Conjugative Transposition of Tn 916 -Related
1460 Elements from *Enterococcus faecalis* to *Escherichia coli* and *Pseudomonas*
1461 *fluorescens*. v. 39, n. 2, p. 500–506, 1995.
1462
- 1463 Puresa, T. S.; Carvalho, F. L. Os efeitos do uso irracional dos antibióticos. **Revista**
1464 **Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação (REASE)**, v. 9, n. 11,
1465 2023.
1466
- 1467 Raabe, V. N.; Shane, A. L. Group B *Streptococcus* (*Streptococcus agalactiae*).
1468 **Microbiology Spectrum**, v. 7, n. 2, 2019.
1469
- 1470 Rajagopal, L. Understanding the regulation of group B Streptococcal virulence factors.
1471 **Future Microbiology**, v. 2, p. 201–221, 2009.
1472
- 1473 Rato, M. G.; Bexiga, R.; Florindo, C.; Cavaco, L. M.; Vilela, C. L.; Santos-Sanches, I.
1474 Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of streptococci from bovine
1475 mastitis. **Vet Microbiol.** v. 25; n. 161(3-4), p. 286-94. doi:
1476 10.1016/j.vetmic.2012.07.043. Epub 2012 Aug 3. PMID: 22964008. 2013.
1477
- 1478 Ribeiro, J.B., et al. Caracterização de *Streptococcus agalactiae* de um surto de mastite
1479 bovina. **Vet. e Zootec.** 2013 jun.; 20(2 Supl 1): 78-79
1480
- 1481 Riekerink, R. G. M. O.; Barkema, H. W.; Veenstra, S.; Poole, D. E.; Dingwell, R. T.;
1482 Keefe, G. P. Prevalence of contagious mastitis pathogens in bulk tank milk in Prince
1483 Edward Island. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 47, June 2006.
1484
- 1485 Rocha, L. Pesquisadora fala sobre a resistência causada pelo uso indiscriminado de
1486 antibióticos. 2015. Disponível em: [https://portal.fiocruz.br/noticia/pesquisadora-fala-](https://portal.fiocruz.br/noticia/pesquisadora-fala-sobre-resistencia-causada-pelo-uso-indiscriminado-de-antibioticos)
1487 [sobre-resistencia-causada-pelo-uso-indiscriminado-de-antibioticos](https://portal.fiocruz.br/noticia/pesquisadora-fala-sobre-resistencia-causada-pelo-uso-indiscriminado-de-antibioticos). Acesso em:
1488 12/01/2024.
1489
- 1490 Rossi, R. S.; Amarante, A. F., Guerra, S. T.; Latosinski. G. S.; Rossi, B. F.; Rall, V. L.
1491 M.; Pantoja, J. C. F. Efficacy of cefquinome and a combination of cloxacillin and
1492 ampicillin for treatment of dairy cows with *Streptococcus agalactiae* subclinical
1493 mastitis. **PLoS One.** 2019 Apr 25;14(4):e0216091. doi:
1494 10.1371/journal.pone.0216091. PMID: 31022270; PMCID: PMC6483254.
1495
- 1496 Rozman, V. et al. Characterization of antimicrobial resistance in lactobacilli and
1497 bifidobacteria used as probiotic or starter cultures based on integration of phenotypic
1498 and *in silico* data. **International Journal of Food Microbiology**, v. 314, p. 108388,
1499 2020.
1500
- 1501 Ruegg, P. L. A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention.
1502 **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 12, p. 10381–10397, 1 dez. 2017.

- 1503
1504 Ruegg, P. L.; Oliveira, L., Jin W., Okwumabua, O. Phenotypic antimicrobial
1505 susceptibility and occurrence of selected resistance genes in gram-positive mastitis
1506 pathogens isolated from Wisconsin dairy cows. **J. Dairy Sci.** v. 98 (25912858); p.
1507 4521-4534. 2015.
- 1508
1509 Sá, J. P. N.; Figueiredo, C. H. A.; Neto, O. L. S.; Roberto, S. B. A.; Gadelha, H. S.;
1510 Alencar, M. C. B. Os principais microorganismos causadores da mastite bovina e suas
1511 consequências na cadeia produtiva de leite. **Revista Brasileira de Gestão Ambiental**
1512 (Pombal - PB - Brasil) v. 12, n.1, p.01- 13, jan-mar, 2018.
- 1513
1514 Santos, E. M. P. Dos et al. Streptococcus e gêneros relacionados como agentes
1515 etiológicos de mastite bovina. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, n. 1, p. 17, 2018.
- 1516
1517 Schubert, A. et al. The fibrinogen receptor FbsA promotes adherence of *Streptococcus*
1518 *agalactiae* to human epithelial cells. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 11, p. 6197–
1519 6205, 2004.
- 1520
1521 Santos, M.Q. **A resistência a antibióticos e a microbiota intestinal: uma visão**
1522 **global entre a dieta, produção alimentar e saúde humana.** 2020. no. f. Trabalho de
1523 Conclusão de Curso de Farmácia-Bioquímica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas
1524 – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020. Disponível em:
1525 [https://repositorio.usp.br/directbitstream/a7d5430d-eee9-4fa1-9ed2-](https://repositorio.usp.br/directbitstream/a7d5430d-eee9-4fa1-9ed2-ed7d99b9993f/3059443.pdf)
1526 [ed7d99b9993f/3059443.pdf](https://repositorio.usp.br/directbitstream/a7d5430d-eee9-4fa1-9ed2-ed7d99b9993f/3059443.pdf) Acesso em: 12/01/2024.
- 1527
1528 Sejas, LM; Silbert, S; Reis, AO; Sader, HS. Avaliação da qualidade dos discos com
1529 antimicrobianos para testes de disco-difusão disponíveis comercialmente no Brasil.
1530 Medicina Laboratorial, **J. Bras. Patol. Med. Lab.** n. 39, v. 1. 2003.
- 1531
1532 Seppa, H. A Novel Erythromycin Resistance Methylase Gene (*ermTR*) in
1533 *Streptococcus pyogenes*. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 42, n. 2, p. 257–262,
1534 1998.
- 1535
1536 Shabayek, S. Colonização Estreptocócica do Grupo B, Características Moleculares e
1537 Epidemiologia Abstrato Introdução. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.** v. 5861770, p. 1–26,
1538 2021.
- 1539
1540 Sharma-Kuinkel, B. K.; Rude, T. H.; Fowler Jr, V. G. Eletroforese em gel de campo de
1541 pulso. **Métodos de Biologia Molecular**, 1373: 117–130, 2016.
- 1542
1543 Silva, J. R.; Castro, G. A. C.; Gonçalves, M. S.; Custódio, D. A. C.; Mian, G. F.; Costa,
1544 G. M. In vitro antimicrobial susceptibility and genetic resistance determinants of
1545 *Streptococcus agalactiae* isolated from mastitic cows in Brazilian dairy herds. **Semina:**
1546 **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 38, n. 4, suplemento 1, p. 2581-2594, 2017.
- 1547
1548 Singh, A.; Goering, R. V.; Simjee, S.; Foley, S. L.; Zervos, M. J. Application of
1549 molecular techniques to the study of hospital infection. **Clin Microbiol Rev.**
1550 2006;19(3):512-30.
- 1551
1552 Soares, L.A.P. **Implicações no diagnóstico da mastite subclínica bovina de vacas**

- 1553 em lactação coinfectadas por "***Streptococcus agalactiae***" e "***Staphylococcus***
1554 ***aureus***". Dissertação (Mestrado Medicina Veterinária (Clínica e Reprodução Animal)
1555 - Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2021. Disponível em
1556 <<https://app.uff.br/riuff/handle/1/23394>>. Acesso em 29 dez 2023.
1557
- 1558 Strommenger, B.; Kettlitz, C.; Werner, G.; Witte, W. Multiplex PCR Assay For
1559 Simultaneous Detection of Nine Clinically Relevant Antibiotic Resistance Genes in
1560 *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Microbiol.**, Wernigerode, Germany, v. 41, n. 9, 4089–
1561 4094, set. 2003.
1562
- 1563 Sutcliffe, J. et al. Detection of Erythromycin-Resistant Determinants by PCR.
1564 **Antimicrob Agents Chemother.** v. 40, n. 11, p. 2562–2566, 1996.
1565
- 1566 Tenover, F. C. et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by
1567 pulsed- field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical**
1568 **Microbiology**, v. 33, n. 9, p. 2233–2239, 1995.
1569
- 1570 Teuber, M. Veterinary use and antibiotic resistance. **Current Opinion in**
1571 **Microbiology**, v. 4, n. 5, p. 493–499, 2001.
1572
- 1573 Tian X, Zhen T, Yu Z, Sun P, Wang J, Han R, et al. Study on Streptococcus Resistant
1574 Phenotypes and Resistance Genes in Dairy Cow Mastitis in Four Provinces in North
1575 China. Heilongjiang **Animal Science and Veterinary Medicine**. 2019(01):1–7.
1576
- 1577 Tiedje, J.M.; Fu, Y; Mei, Z.; Schäffer, A; Dou, Q; Amelung, W; Elsner, M; Adu-Gyamfi,
1578 J; Heng, L; Virta, M; Jiang, X; Smidt, H; Topp, E; Wang, F. Antibiotic resistance genes
1579 in food production systems support One Health opinions. **Current Opinion in**
1580 **Environmental Science & Health**, V. 34. 100492, ISSN 2468-5844,
1581 <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2023.100492>.
1582 (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2468584423000521>). 2023.
1583
- 1584 Tomazi, T; Ferreira, GC; Orsi, AM; Gonçalves, JL; Ospina, PA; Nydam, DV; Moroni,
1585 P; dos Santos, MV. Association of herd-level risk factors and incidence rate of clinical
1586 mastitis in 20 Brazilian dairy herds, **Preventive Veterinary Medicine**, v. 161, pp 9-18,
1587 2018.
1588
- 1589 Tomazi, T. **Perfil etiológico e molecular de patógenos causadores de mastite**
1590 **clínica e uso de antimicrobianos em rebanhos leiteiros**. Tese de Doutorado,
1591 Universidade de São Paulo. 2017. Disponível em:
1592 <[http://www.teses.usp.br/index.php?](http://www.teses.usp.br/index.php?option=com_jumi&fileid=12&Itemid=77&lang=em)
1593 [option=com_jumi&fileid=12&Itemid=77&lang=em](http://www.teses.usp.br/index.php?option=com_jumi&fileid=12&Itemid=77&lang=em)> Acessado em: 28 de dez. de 2023.
1594
- 1595 Trabulsi, L.R; Alterthum, F. **Microbiologia**. 5 edições ed. [s.l: s.n.].
1596
- 1597 Trzcinski, K., Cooper, B. S.; Hryniewicz, W.; Dowson, C.G. Expressão da resistência
1598 às tetraciclina em cepas de *Staphylococcus aureus* resistente à metilina. **J.**
1599 **Antimicrob. Chemother.** 45: 763 -770, 2000.
1600
- 1601 Udo, E. E.; Dashti, A. A. .2000. Detection of genes encoding aminoglycoside-
1602 modifying enzymes in staphylococci by polymerase chain reaction and dot blot

- 1603 hybridization. *Int. J. Antimicrob. Agents* 13:273–279.
1604
- 1605 Vakulenko, S. B.; Mobashery, S. **Versatility of aminoglycosides and prospects for**
1606 **their future**. *Clinical microbiology reviews*, v. 16, n. 3, p. 430-450, 2003.
1607
- 1608 Vecina, J.; Patricio, R., Ciarlini, P. C. Importância do fibrinogênio plasmático na
1609 identificação de processos inflamatórios de cães. **Ciência Veterinária Tropical**, v. 9,
1610 p. 31–35, 2006.
1611
- 1612 Werner, G., Hildebrandt, B.; Witte, W. Aminoglycoside-strepto-thricin resistance gene
1613 cluster *aadE-sat4-aphA-3* disseminated among multi-resistant isolates of *Enterococcus*
1614 *faecium*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 45:3267–3269, 2001.
1615
- 1616 Wintersdorff, C. J. H. Von; Penders, J.; Niekerk, J. M. Van. Dissemination of
1617 Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer.
1618 **Front. Microbiol.** v. 7, n. February, p. 1–10, 2016.
1619
- 1620 Witte, W. Ecological impact of antibiotic use in animals on different complex microflora:
1621 environment. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 14, n. 4, p. 321–325,
1622 2000.
1623
- 1624 World Health Organization. Antimicrobial Resistance. Global Report on Surveillance.
1625 World Health Organization, Geneva (2014) Disponível em <
1626 <http://www.who.int/iris/handle/10665/112642>>. Acesso em: 05 de Janeiro de 2024.
1627
- 1628 Yang Y, Liu Y, Ding Y, Yi L, Ma Z, Fan H, Lu C. Molecular characterization of
1629 *Streptococcus agalactiae* isolated from bovine mastitis in Eastern China. **PLoS One**.
1630 v. 8, n. 7. 2013.
1631
- 1632 Yao, K. et al. Capsular gene typing of *Streptococcus agalactiae* compared to
1633 serotyping by latex agglutination. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 2, p.
1634 503–507, 2013.
1635
- 1636 Zadoks, R. N. et al. Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and
1637 comparative relevance to humans. **Journal of Mammary Gland Biology and**
1638 **Neoplasia**, v. 16, n. 4, p. 357–372, 2011.