

028 - CARACTERIZAÇÃO DE *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* DE UM SURTO DE MASTITE BOVINA**CHARACTERIZATION OF *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* FROM AN OUTBREAK OF BOVINE MASTITIS**

João Batista Ribeiro¹
Marcos Aurélio Souto Silva²
Carla Christine Lange^{1b}
Letícia Caldas Mendonça³
Hudson Nunes da Costa⁴
Juliana de Almeida Leite⁵
Maria Aparecida Vasconcelos Paiva Brito^{1c}

Introdução: *S. agalactiae* está frequentemente associado à mastite clínica e subclínica, redução da produção de leite e risco de disseminação para os outros animais do rebanho. O conhecimento das características biológicas das linhagens de *S. agalactiae* presentes nos rebanhos, bem como a discriminação dessas linhagens em nível subespecífico para a determinação de genótipos predominantes podem contribuir para o seu controle. Diversos métodos moleculares têm sido usados para a tipagem de *S. agalactiae*. O método de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), usado para separação de macrofragmentos de DNA genômico digerido por enzima de restrição, além de ser considerado “padrão ouro”, tem se destacado pelo alto poder discriminatório para *S. agalactiae*. Este trabalho teve como objetivo caracterizar, por PFGE, linhagens de *S. agalactiae* isoladas de um surto de mastite bovina.

Material e Métodos: As bactérias analisadas foram isoladas durante um surto de mastite causada por *S. agalactiae* em um rebanho no Estado de Minas Gerais. O isolamento e a identificação das bactérias foram realizados de acordo com o *National Mastitis Council* (1). A identificação das bactérias foi confirmada por amplificação de um fragmento de 120 pb do rDNA 16S por PCR (2). Noventa e cinco *S. agalactiae* foram escolhidos para a tipagem por PFGE dentre um total de 559 isolamentos. As bactérias foram isoladas de mastite clínica (MC), subclínica (SC), água de enxágue do equipamento de ordenha, tanque de refrigeração e de areia do *free stall*. A preparação de *plugs*, digestão enzimática e obtenção dos perfis eletroforéticos por PFGE foram realizadas conforme descrito por BENSON e FERRIERI (3) com modificações nas quantidades das enzimas e nos tempos de incubação. A análise dos perfis de restrição de *SmaI* foi realizada por meio de inspeção visual, como sugerido por TENOVER et al. (4).

Resultados e Discussão: Todos isolados identificados como *S. agalactiae* apresentaram resultado positivo nos testes de CAMP e hidrólise do hipurato, resultado negativo no teste de hidrólise da esculina, e presença do produto esperado, de 120 pb, nas reações de PCR. A análise por PFGE de 95 linhagens utilizando a enzima *SmaI* revelou a ocorrência de cinco

¹ Pesquisador, Embrapa Gado de Leite, Rua Eugênio do Nascimento, 610, Dom Bosco, CEP 36038-330, Juiz de Fora, MG, Brasil, Tel.: 55 32 33117400, fax: 55 32 33117401, E-mail: ^ajoao-batista.ribeiro@embrapa.br, ^bcarla.lange@embrapa.br, ^cmaria.brito@embrapa.br (autor para correspondência)

² Assistente em pesquisa, Embrapa Gado de Leite, marcos.souto@embrapa.br

³ Analista, Embrapa Gado de Leite, leticia.mendonca@embrapa.br

⁴ Professor Adjunto IV, Departamento de Medicina Veterinária, PUC-Minas, Betim-MG, e-mail: dacosta@pucminas.br

⁵ Professor Adjunto IV, Departamento de Medicina Veterinária, PUC-Minas, Betim-MG, e-mail: dacosta@pucminas.br

perfis eletroforéticos ou pulsotipos (Tabela 1). Todas as bactérias foram tipáveis com *SmaI* e apresentaram perfis eletroforéticos com mais de 10 bandas bem definidas, atendendo assim ao critério de TENOVER et al. (4). De acordo com esses critérios, 85 (89,5%) linhagens que não apresentaram diferença genética entre si foram consideradas indistinguíveis, e classificadas no pulsotipo A, que representou a linhagem principal do surto. Dois isolados (2,1%) apresentaram uma única diferença genética (provavelmente devido a uma inserção no genoma) e foram considerados intimamente relacionados ao pulsotipo A. Seis (6,4%) isolados foram também considerados possivelmente relacionados ao pulsotipo A, apresentando quatro diferenças genéticas. Considerando a elevada similaridade entre isolados desses dois últimos pulsotipos em relação aos do A, ambos foram considerados subtipos deste, e designados A1 e A2, respectivamente. Foram observadas duas outras linhagens com mais de seis diferenças genéticas entre si e quando comparadas às do pulsotipo A. Essas linhagens foram consideradas não relacionadas, o que sugere não fazerem parte do surto, sendo assim enquadradas nos pulsotipos B e C. A digestão enzimática do DNA genômico de 10 isolados do pulsotipo A com *SalI*, escolhidos aleatoriamente, mostrou que essas linhagens são indistinguíveis também com essa enzima.

Tabela 1. Classificação de *S. agalactiae* isolados de um surto de mastite em uma propriedade leiteira de Minas Gerais, com base nos perfis de macrofragmentos genômicos de restrição gerados pela enzima *SmaI*.

Origem dos isolados	Total de linhagens	Pulsotipos				
		A	A1	A2	B	C
Mastite clínica e subclínica	74	65	06	02	01	-
Água de enxágue de equipamento de ordenha	07	07	-	-	-	-
Areia do <i>free stall</i>	03	02	-	-	-	01
Leite do tanque de refrigeração	02	02	-	-	-	-
Suabe de teteiras	09	09	-	-	-	-
Total	95	85	06	02	01	01

Conclusões: Todos os 95 *S. agalactiae* analisados foram passíveis de tipagem por PFGE utilizando a enzima *SmaI*, sendo identificados 5 pulsotipos, A, A1, A2, B e C. O pulsotipo A foi o principal responsável pelo surto no rebanho, seguido dos subtipos A1 e A2. Os pulsotipos B e C foram representados por apenas um isolado, epidemiologicamente não relacionados aos do pulsotipo A e seus subtipos, segundo o critério de Tenover.

Referências:

1. NATIONAL MASTITIS COUNCIL. Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection and determination of milk quality. 4. ed. Verona: NMC, 2004. 47 p.
2. ABDULMAWJOOD, A.; LÄMMLER, C. Amplification of 16S ribosomal RNA gene sequences for identification of streptococci of serological group B. **Res. Vet. Sci.**, v. 67, p. 159-162, 1999.
3. BENSON, J. A.; FERRIERI, P. Rapid pulsed-field gel electrophoresis method for group B *Streptococcus* isolates. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, n. 8, p. 3006-3008, 2001.
4. TENOVER, F. C.; ARBEIT, R. D.; GOERING, R. V.; MICKELSEN, P. A.; MURRAY, B. E.; PERSING, D. H.; SWAMINATHAN, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, n. 9, p. 2233-2239, 1995.

Veterinária e Zootecnia

**Suplemento: Anais do V Congresso Brasileiro de Qualidade do
Leite do Conselho Brasileiro de Qualidade do Leite – CBQL
10 a 12 de Junho de 2013.**

**Vet e Zootec.
2013 junho; 20(2 Supl 1): 001-460
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
ISSN Impresso 0102 -5716
ISSN Eletrônico 2178-3764
Botucatu - SP – Brasil**

Veterinária e Zootecnia

ISSN Impresso 0102 -5716

ISSN Eletrônico 2178-3764

VETERINÁRIA E ZOOTECCIA
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
UNESP – Campus de Botucatu
18618-970 – Dist. Rubião Jr. – Botucatu – SP – Brasil
Portal: <http://www.fmvz.unesp.br/rvz>
E-mail: vetzootecnia@fmvz.unesp.br
Tel. 55 14 3880 2094

Publicação trimestral
Solicita-se permuta / *Exchange desired*
Biblioteca do Campus de Botucatu
18618-970 – Dist. Rubião Júnior – Botucatu – SP - Brasil

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Veterinária e Zootecnia / Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia. – Vol. 1, n. 1(1985)- . – Botucatu, SP : FMVZ, 1985

Trimestral
Texto em português/inglês/espanhol
Descrição baseada em: Vol. 20, n.1, mar. (2013)
ISSN Impresso 0102 -5716
ISSN Eletrônico 2178-3764

1. Medicina veterinária. 2. Zootecnia. I. Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia de Botucatu.

Os artigos publicados na *Revista VETERINÁRIA E ZOOTECCIA* são indexados por:
Lilacs, PERIÓDICA – Índice de Revistas Latinoamericanas en Ciencias, Cambridge
Scientific Abstracts, e CAB Abstracts.