

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**GENES ASSOCIADOS À VIRULÊNCIA E MULTIRRESISTÊNCIA AOS
ANTIMICROBIANOS EM LINHAGENS DE *Trueperella pyogenes*
ISOLADAS DE MASTITE E OUTRAS AFECÇÕES EM ANIMAIS
DOMÉSTICOS**

RAFAELA MASTRANGELO RISSETI

**Botucatu – SP
2015**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**GENES ASSOCIADOS À VIRULÊNCIA E MULTIRRESISTÊNCIA AOS
ANTIMICROBIANOS EM LINHAGENS DE *Trueperella pyogenes*
ISOLADAS DE MASTITE E OUTRAS AFECÇÕES EM ANIMAIS
DOMÉSTICOS**

RAFAELA MASTRANGELO RISSETI

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária para
obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Adj. Márcio Garcia Ribeiro

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Risseti, Rafaela Mastrangelo.

Genes associados à virulência e multirresistência aos antimicrobianos em linhagens de *Trueperella Pyogenes* isoladas de mastite e outras afecções em animais domésticos / Rafaela Mastrangelo Risseti. - Botucatu, 2015

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Márcio Garcia Ribeiro

Capes: 50502034

1. Virulência (Microbiologia). 2. Animais domésticos - Doenças. 3. Patogenicidade. 4. Mastite. 5. Bovino - Doenças. 6. Agentes anti-infecciosos.

Palavras-chave: *Arcanobacterium pyogenes*; animais de companhia; animais de produção; patogenicidade; resistência múltipla aos antimicrobianos.

Nome do autor: Rafaela Mastrangelo Risseti

Título: GENES ASSOCIADOS À VIRULÊNCIA E MULTIRRESISTÊNCIA DE
ANTIMICROBIANOS EM LINHAGENS *Trueperella pyogenes* ISOLADAS DE
MASTITE E OUTRAS AFECÇÕES EM ANIMAIS DOMÉSTICOS

BANCA EXAMINADORA

Prof. Adjunto Márcio Garcia Ribeiro

Presidente e Orientador

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública (DHVSP), Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) – UNESP/Botucatu, SP

Prof^a Liliane de Oliveira Dantas

Membro

Curso de Medicina Veterinária – UNIP, Bauru, SP
UNESP/Botucatu, SP

Prof. Adjunto Paulo Francisco Domingues

Membro

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública (DHVSP)
UNESP/Botucatu, SP

Data da Defesa: 28/04/2015

“Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, é porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra! Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não nos deixa só porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso.”

Charles Chaplin

DEDICATÓRIA

*Dedico aos meus amados pais, Marcia e Marcos, por
todo apoio à minha formação e amor incondicional.*

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Prof. Adj. Márcio Garcia Ribeiro, excelente orientador e pesquisador, agradeço por toda orientação, dedicação e paciência durante todo projeto.

AGRADECIMENTOS

À minha falecida avó, Aparecida Maria, pelo exemplo de mulher que sempre mostrou como ser forte em todas as situações da vida;

Ao meu irmão Vinícius, que sempre esteve ao meu lado, torcendo pelas conquistas. Você é essencial na minha vida. Obrigada;

À toda minha família, em especial minha avó, Maria Aparecida, por todos os momentos de carinho, atenção e apoio. Obrigada por tudo. Vocês foram peças fundamentais para meu crescimento.

À minha cunhada Ana Beatriz, por me presentear com minha sobrinha Manuela. Obrigada por permitir fazer parte da sensação maravilhosa de tia e madrinha. Ela me fez conhecer um mundo diferente, através da visão simples e ingênua de uma criança;

Aos pós-graduandos Ana Carolina, Carmen, Gustavo, Amanda e Carolina, pela amizade, companheirismo e momentos de muitas risadas e comidas.

Ao Fernando Listoni, muito obrigada, por todo o apoio ao desenvolvimento deste trabalho, pelo carinho e amizade ao longo destes dois anos.

À pós-graduanda, amiga-irmã, Amanda Keller Siqueira, obrigada por permitir fazer parte da sua vida. Você foi essencial para meu crescimento profissional e pessoal;

À minha melhor amiga Karen Caffaro, que sempre esteve do meu lado, me ajudando e fazendo acreditar que tudo na vida é uma questão de tempo para melhorar. Obrigada, você foi o maior presente que Botucatu me deu;

Aos meus amigos Michelle, Maria Luíza, Marco e Luiz Gustavo. Obrigada por todo momento de diversão e amizade. Obrigada por permitir dividir minha vida com vocês. Vocês vieram na hora que eu mais precisei me fazendo mais feliz. A vocês minha eterna gratidão.

À FAPESP (processo nº 2013/17293-0) pelo apoio financeiro.

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1.** Antimicrobianos pertencentes a dez grupamentos distintos, utilizados no teste “in vitro” de sensibilidade microbiana – método de difusão com discos - em linhagens de *Trueperella pyogenes* isoladas de animais. Botucatu, SP, 2012 – 2015.....26
- Quadro 2.** Primers e condições de ciclo para reação em cadeia pela polimerase visando à amplificação de fatores de virulência de *T. pyogenes* isolados de animais domésticos. Botucatu, 2015.....27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ocorrência de diferentes afecções por <i>Trueperella pyogenes</i> em ruminantes domésticos. Botucatu, SP, 2012 – 2015.....	29
Tabela 2. Perfil de sensibilidade microbiana “in vitro”, no teste de difusão com discos, em isolados de <i>Trueperella pyogenes</i> obtidos de animais domésticos. Botucatu, SP, 2012 – 2015.....	30
Tabela 3. Perfis de multirresistência aos antimicrobianos em linhagens de <i>Trueperella pyogenes</i> isoladas de ruminantes domésticos. Botucatu, SP, 2012 – 2015.....	31
Tabela 4. Genes associados a virulência em linhagens de <i>Trueperella pyogenes</i> isoladas de diferentes afecções em animais domésticos. Botucatu, SP, 2012 – 2015.....	32
Tabela 5. Ocorrência de diferentes afecções em animais domésticos segundo genes associados à virulência de <i>Trueperella pyogenes</i> . Botucatu, SP, 2012 – 2015.....	32

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUÇÃO	3
2. REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1 Etiologia e propriedades gerais	5
2.2 Epidemiologia	6
2.3 Patogenia e genes associados à virulência	9
2.4 Clínica	12
2.4.1 Mastite	12
2.4.2 Lesões cutâneas	13
2.4.3 Lesões em cavidade oral	14
2.4.4 Linfadenite	14
2.4.5 Abscessos	14
2.4.6 Lesões no trato genital	15
2.4.7 Outros sinais clínicos	15
2.4.8 Formas disseminadas	16
2.5. Diagnóstico	16
2.6. Tratamento	18
2.6.1 Índice de resistência múltipla aos antintimicrobianos	19
2.7. Controle	20
2.8. Saúde Pública	21
3. OBJETIVOS	23
3.1. Geral	23
3.2. Específicos	23
4. MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1. Animais e micro-organismos	24
4.2. Diagnóstico das mastites	24
4.3. Diagnóstico microbiológico	25
4.4. Teste de CAMP para identificação da piolisina	25
4.6. Perfil de sensibilidade microbiana “in vitro”	25

4.6.1 Método de difusão com discos modificado	25
4.7. Multirresistência dos isolados e Índice de Resistência Múltipla aos antimicrobianos	26
4.8. Diagnóstico molecular	27
4.9. Análise estatística	28
4.10. Comissão de Ética	28
5. RESULTADOS	29
5.1. Isolamento das linhagens	29
5.2. Características fenotípicas.....	29
5.3. Perfil de sensibilidade microbiana “in vitro”	30
5.4. Índice de Resistência Múltipla aos Antimicrobianos (IRMA).....	30
5.5 Diagnóstico Molecular	31
5.6 Análise estatística.....	33
6. DISCUSSÃO.....	34
7. CONCLUSÕES.....	41
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*	42

RISSETI, R.M. **Genes associados à virulência e multirresistência aos antimicrobianos em linhagens de *Trueperella pyogenes* isoladas de mastite e outras afecções em animais domésticos.** Botucatu, SP, 2015. 53p. Mestrado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Resumo

Trueperella pyogenes são bactérias oportunistas caracterizadas por infecções piogênicas em animais, em geral refratárias aos tratamentos com antimicrobianos convencionais. Recentemente, os genes que codificam a exotoxina piolisina (*plo*), e fatores relacionados à adesão de *T. pyogenes* às células do animal susceptível, como fímbrias (*fimA*, *fimC*, *fimE*, *fimG*), neuraminidases (*nanH*, *nanP*), e proteína ligada ao colágeno (*cbpA*) têm sido associados a virulência do patógeno. O presente estudo investigou a ocorrência de multirresistência dos isolados aos antimicrobianos e a presença dos genes *plo*, *fimA*, *fimC*, *fimE*, *fimG*, *nanH*, *nanP* e *cbpA* em 41 linhagens de *T. pyogenes* isoladas de diferentes afecções em bovinos, caprinos, ovinos, equino e cão. *T. pyogenes* foi identificado predominantemente em casos de mastite (46,3%), abscessos (19,5%), pneumonia (9,8%), metrite (9,8%), linfadenite (7,3%), seguidos em menor frequência por encefalite (4,9%) e orquite (2,4%). A maior sensibilidade dos isolados foi observada para florfenicol (97,6%), azitromicina (97,6%), tetraciclina (95,2%), ceftiofur (92,7%), penicilina (92,7%), ampicilina (92,7%), gentamicina (90,3%) e eritromicina (87,8%). Em contraste, alta frequência de resistência dos isolados foi observada para bacitracina (46,3%), neomicina (31,7%), lincomicina (31,7%) e sulfametoxazole/trimetoprim (24,3%). O índice de resistência múltipla aos antimicrobianos – IRMA ($\geq 0,3$) foi encontrado em 13 (31,7%) isolados, particularmente nos casos de mastite bovina. Dentre os isolados multirresistentes a três ou mais grupos de antimicrobianos, 12 (92,3%) foram identificados na espécie bovina, notadamente em infecções mamárias. Os genes mais frequentes detectados nos isolados foram: *plo* (40/41=97,6%), *fimA* (36/41=87,9%), *nanP* (34/41=82,9%), *fimE* (32/41=78,0%), *nanH* (28/41=62,3%), *fimC* (23/41=56,0%) e *cbpA* (5/41=12,2%). As principais associações de genes nos isolados foram observadas entre *plo*, *fimA*, *fimE*, *nanH* e *nanP* (10/41=24,4%) e *plo*, *fimA*, *fimE*, *fimC*, *nanH* e *nanP* (8/41=19,5%), principalmente nos casos de mastite bovina. Dentre a literatura consultada, refere-se pela primeira vez em animais domésticos, a detecção dos genes *plo*, *fimA*, *fimG*, *fimE*, *fimC*, *nanH*, *nanP* e/ou *cbpA* em casos de abscessos em bovinos, caprinos e cão, orquite em equino, pneumonia bovina, linfadenite caprina e encefalite bovina. Infere-se a grande diversidade de manifestações clínicas causadas por *T. pyogenes* em animais domésticos, com predomínio da mastite bovina. A ocorrência de isolados multirresistentes aos antimicrobianos reforça a importância de instituição do tratamento do patógeno com respaldo em testes “in vitro” de sensibilidade microbiana. *plo*, *fimA*, *fimC*, *fimE*, *nanH* e *nanP* são, aparentemente, os principais genes associados a virulência nas diferentes afecções piogênicas causadas por *T. pyogenes* em animais de produção.

Palavras chave: *Arcanobacterium pyogenes*, patogenicidade, resistência múltipla aos antimicrobianos, animais de produção, animais de companhia, manifestações clínicas.

RISSETI, R.M. **Genes associated to virulence and multidrug resistance in strains of *Trueperella pyogenes* isolated from bovine mastitis and other diseases of domestic animals.** Botucatu, SP, 2015. 53p. Master - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, SP, Universidade Estadual Paulista.

Abstract

Trueperella pyogenes are opportunistic bacterium characterized by suppurative infections in domestic animals, commonly refractory to conventional therapy. Recently, genes which encode exotoxin pyolysin (*plo*), and factors that promote adhesion of *T. pyogenes* to host cells, such as fimbriae (*fimA*, *fimC*, *fimE*, *fimG*), neuraminidases (*nanH*, *nanP*), and collagen-binding protein (*cbpA*) have been associated to virulence of pathogen. The aim of present study was investigate occurrence of multi-drug resistance of isolates, as well the presence of genes *plo*, *fimA*, *fimC*, *fimE*, *fimG*, *nanH*, *nanP*, and *cbpA* in 41 *T. pyogenes* strains obtained from bovine, goats, sheep, horses, and dog isolated among different clinical manifestations. *T. pyogenes* was identified predominantly in mastitis (46.3%), abscesses (19.5%), pneumonia (9.8%), metritis (9.8%), lymphadenitis (7.3%), followed by encephalitis (4.9%) and orchitis (2.4%). The strains showed major *in vitro* sensitivity to florfenicol (97.6%), azithromycin (97.6%), tetracycline (95.2%), ceftiofur (92.7%), penicillin (92.7%), ampicillin (92.7%), gentamicin (90.3%), and erythromycin (87.8%). In contrast, highest frequency of resistance among isolates was observed to bacitracin (46.3%), neomycin (31.7%), lincomycin (31.7%), and trimethopim/sulfamethoxazole (24.3%). Antimicrobial multiple resistance index – AMRI (≥ 0.3) was found in 13 (31.7%) isolates, particularly in bovine mastitis cases. Among multi-drug resistant isolates to 3 or more group of antimicrobials, 12 (92.3%) were identified in bovine, predominantly in mammary infections. The most common genes detected among isolates were: *plo* (40/41=97.6%), *fimA* (36/41=87.9%), *nanP* (34/41=82.9%), *fimE* (32/41=78.0%), *nanH* (28/41=62.3%), *fimC* (23/41=56.0%), and *cbpA* (5/41=12.2%). The major associations between genes of isolates were *plo*, *fimA*, *fimE*, *nanH*, and *nanP* (10/41=24.4%), and *plo*, *fimA*, *fimE*, *fimC*, *nanH*, and *nanP* (8/41=19.5%), mainly in bovine mastitis. To the best of our knowledge, the presence of genes *plo*, *fimA*, *fimG*, *fimE*, *fimC*, *nanH*, *nanP*, and/or *cbpA* are referred by first time in domestic animals, among bovine, goats and canine abscesses, bovine pneumonia, goat lymphadenitis, and bovine encephalitis. This study highlights the diversity of clinical manifestations caused by *T. pyogenes* infections in domestic animals, with predominance of bovine mastitis. The high occurrence of multi-drug resistance patterns among isolates reinforces that first-choice of antimicrobial treatment should be based on *in vitro* resistance profile. *plo*, *fimA*, *fimC*, *fimE*, *nanH*, and *nanP* are, apparently, the major genes associated to virulence in miscellaneous suppurative *T. pyogenes* infections in livestock.

Keywords: *Trueperella* (*Arcanobacterium*) *pyogenes*, pathogenicity, multidrug resistance to antimicrobials, livestock and companion animals, clinical manifestations.

1. INTRODUÇÃO

Em 1850, o médico veterinário Thiessen descreveu pela primeira vez micro-organismo pleomórfico no leite de vacas com mastite na Europa. Após a descrição em outras espécies e reclassificação taxonômica, desde 1997 o micro-organismo é denominado *Arcanobacterium pyogenes* (QUINN et al., 1994, 2005).

Em 2011, com base em estudos filogenéticos (gene 16S rRNA) e na composição de fosfolipídios, foi proposto novo gênero denominado *Trueperella* (YASSIN et al., 2011).

Trueperella pyogenes (*T. pyogenes*) são bactérias gram-positivas, pleomórficas oportunistas, pertencentes ao grupo dos actinomicetos, no qual se incluem vários micro-organismos de interesse veterinário como *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Corynebacterium bovis*, *Corynebacterium renale*, *Rhodococcus equi* e *Nocardia* spp. (QUINN et al., 1994, 2005, 2011; KIELSTEIN, 1998; MEYER e REBOLI, 2005).

A virulência de *T. pyogenes* tem sido atribuída principalmente à produção de piolisina, uma exotoxina ou citolisina (gene *plo*) que possui ação lítica para fagócitos e eritrócitos. A presença de neuraminidases (genes *nanH* e *nanP*), proteína ligada a colágeno (gene *cbpA*) e fímbrias (*fimA*, *fimC*, *fimE* e *fimG*) estão relacionadas com a adesão íntima da bactéria às células-alvo, principalmente do epitélio uterino e da glândula mamária. Outros fatores como proteases e formação de biofilme também estão associados à virulência (YASSIN et al., 2011; BICALHO et al., 2012). A patogenicidade de *T. pyogenes* está intimamente relacionada ao comportamento oportunista da bactéria e à formação de reações piogênicas em diferentes órgãos e tecidos dos animais (QUINN et al., 1994, 2005, 2011; JOST e BILLINGTON, 2005; YASSIN et al., 2011).

T. pyogenes é encontrado principalmente na microbiota da pele, orofaringe, trato genital e intestinal de animais, bem como contaminando utensílios (QUINN et al., 1994, 2005, 2011). Em vacas e novilhas o patógeno é

carreado por moscas, causando a “mastite de verão” (DOMINGUES et al., 2008; MOTTA et al., 2011).

A mastite em vacas e novilhas ocorre geralmente na forma clínica, na lactação ou no período seco, em casos isolados ou em surtos. Clinicamente caracteriza-se pela formação de nódulos ou abscessos, em uma ou mais mamas, com ou sem a presença de fístulas (COSTA et al., 1998, 2000). A mastite por *T. pyogenes* é de difícil resolução tecidual devido à formação de piogranulomas, que culmina, em geral, na recomendação da segregação dos animais, da secagem química dos tetos acometidos, ou mesmo do descarte do animal. *T. pyogenes* frequentemente é refratário aos tratamentos com antimastíticos convencionais (MOTTA et al., 2011), apesar da sensibilidade “in vitro” dos isolados aos antimicrobianos convencionais (RISSETI et al., 2013).

Tem sido motivo de preocupação crescente pelos profissionais de saúde o uso indevido ou não racional de antimicrobianos no tratamento da mastite bovina, sem o respaldo de testes “in vitro” de sensibilidade microbiana, fato que pode aumentar a pressão seletiva para linhagens de micro-organismos multirresistentes aos antimicrobianos convencionais (RIBEIRO, 2008a), incluindo *T. pyogenes* (ZASTEMPOWSKA e LASSA, 2012).

No Brasil, os estudos envolvendo *T. pyogenes* em mastite estão restritos aos relatos de caso (DOMINGUES et al., 2008) ou surtos (MOTTA et al., 2011). Assim, não existem investigações sistemáticas no país, contemplando grande número de linhagens, conduzidos na caracterização fenotípica dos isolados, tampouco dos genes recentemente associados à virulência do patógeno obtido de animais domésticos. Recentemente, BICALHO et al. (2012), nos EUA, e ZASTEMPOWSKA e LASSA (2012), na Polônia, determinaram a associação principalmente dos genes *fimA*, *plo* e *cbpA* em linhagens de *T. pyogenes* envolvidas, respectivamente, na piometra e mastites em vacas.

Com efeito, o presente estudo investigou o perfil de sensibilidade microbiana “in vitro”, propriedades fenotípicas e os principais genes associados à virulência em isolados de *T. pyogenes* obtidos de casos de mastite e de outras afecções em animais domésticos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Etiologia e propriedades gerais

Após a primeira descrição de micro-organismo pleomórfico causando mastite em vacas na Europa, pelo médico veterinário Thiessen, em 1850, Kitt, em 1880, investigou bactéria similar, gram-positiva, causando pneumonia abscedante em suínos. Lucet, entre 1883 e 1893, descreveu com mais detalhes a bactéria, enquanto Poels, em 1897, notificou micro-organismo semelhante causando artrite em bezerros que, na oportunidade, recebeu a denominação de *Bacillus polyarthritis*. Nos anos subsequentes, o micro-organismo foi renomeado *Bacillus pyogenes* e identificado causando manifestações clínicas diversas em suínos, vacas e outros animais domésticos. Em 1981, Eberson reclassificou a bactéria como *Corynebacterium pyogenes* (QUINN et al., 1994, 2005).

Desde 1997, o micro-organismo foi denominado *Arcanobacterium pyogenes* (JOST e BILLINGTON, 2005; MEYER e REBOLI, 2005). Em 2011, após estudos filogenéticos (gene 16S rRNA), da composição de fosfolipídeos e da presença de menaquinona (vitamina K₂), foi proposto novo gênero denominado *Trueperella*. Esse novo gênero agrupa cinco espécies, denominadas *T. abortus*, *T. bernardiae*, *T. bialowiezensis*, *T. bonasi* e *T. pyogenes* (YASSIN et al., 2011).

T. pyogenes são bactérias gram-positivas, pleomórficas, apresentando formas bacilares finas, “claviformes”, ou sob a forma de “letras Chinesas”, semelhantes a certos actinomicetos patogênicos para animais e humanos como *Rhodococcus equi*, *Nocardia* sp. e *Corynebacterium* sp. (QUINN et al., 1994, 2005, 2011). São bactérias com 1-4 µm de tamanho isoladas na rotina laboratorial em condições de microaerofilia (5–10% de CO₂), embora tolerem, também, aerobiose no isolamento primário. O isolamento microbiano é obtido em meios convencionais como o ágar acrescido de sangue ovino ou bovino (5%) desfibrinado, em ágar nutriente (QUINN et al., 1994, 2005, 2011), ou ágar Colúmbia sangue (ZATEMPOWSKA e LASSA, 2012). No meio de ágar sangue ovino ou bovino (5%), o micro-organismo forma colônias pequenas, com

aproximadamente 0,5 mm de diâmetro, branco-acinzentadas, circulares, entre 24-48 horas de incubação a 37°C, em aerofilia e, preferencialmente, microaerofilia. Após 48 horas de incubação, desenvolvem halo completo de hemólise ao redor das colônias (QUINN et al., 1994, 2005, 2011).

O micro-organismo é catalase negativo. Apresenta teste de CAMP positivo (formação de “ponta de seta”) na intersecção da semeadura com colônias hemolíticas de *Staphylococcus aureus* (ATCC), utilizando meio de ágar sangue ovino ou bovino. Os testes de CAMP e catalase permitem a diferenciação fenotípica na rotina laboratorial de *T. pyogenes* da maioria dos actinomicetos de interesse em animais domésticos. *T. pyogenes* são bactérias imóveis, não formadoras de esporos. Liquefazem a gelatina e são urease negativas. Não reduzem nitratos a nitrito e não fermentam a esculina (QUINN et al., 1994, 2005, 2011; MEYER e REBOLI, 2005).

Em anos recentes, a virulência da bactéria tem sido atribuída principalmente à produção de piolisina, exotoxina ou citolisina (gene *plo*), responsável pela ação lítica para fagócitos e outras células. A presença de neuraminidases (genes *nanH* e *nanP*), proteína ligada a colágeno (gene *cbpA*) e fímbrias (*fimA*, *fimC*, *fimE* e *fimG*) estão associadas a adesão íntima da bactéria às células-alvo, principalmente do epitélio uterino e da glândula mamária (YASSIN et al., 2011). Outros fatores como proteases e formação de biofilme também estão relacionados à virulência. A patogenicidade de *T. pyogenes* está associada ao comportamento oportunista da bactéria e à formação de reações piogênicas em diferentes órgãos e tecidos dos animais (JOST e BILLINGTON, 2005).

2.2 Epidemiologia

As infecções por *T. pyogenes*, em geral, são esporádicas em animais domésticos, silvestres e selvagens em todo o mundo. O micro-organismo pode ser encontrado na microbiota da mucosa bucal de ruminantes domésticos e suínos, na vagina e cérvix de vacas, no prepúcio e sêmen de touros, assim como nas fezes e pele dos animais. Pode ser isolado também a partir do solo, água parada e contaminando equipamentos e utensílios de uso geral nos animais (cordas, raspadeiras de crina, arreios, pinças de casco, agulhas,

instrumental cirúrgico, insufladores de ordenha e cânulas para tratamento intramamário). A infecção natural por *T. pyogenes* tem sido reportada em todos os animais domésticos, apesar do maior número de registros em bovinos e suínos (CORRÊA e CORRÊA, 1992; RADOSTITS et al., 2007). Em contraste, as infecções por *T. pyogenes* em animais de companhia (GREENE, 2012) e humanos são raras, provavelmente em razão do micro-organismo não pertencer a microbiota das mucosas e pele dessas espécies (KAVITHA et al., 2012).

A infecção por *T. pyogenes* ocorre independente de raça e sexo dos animais. Parece haver certo predomínio das manifestações clínicas em animais jovens, exceto nos casos de mastite. Nos períodos quentes e chuvosos se observa aumento dos casos de mastite, em razão da maior veiculação mecânica da bactéria por moscas, ou mesmo por picadas de insetos. Devido ao comportamento oportunista e da ampla possibilidade de localização da bactéria, várias portas de entrada e vias de transmissão são possíveis nas infecções por *T. pyogenes* (RADOSTITS et al., 2007).

A infecção mamária em vacas por *T. pyogenes* é de baixa frequência, com exceção em propriedades sem controle de moscas, ou com deficiências na higiene de ordenha, nas quais a mastite pode ocorrer em surtos (MOTTA et al., 2011). A infecção da glândula mamária ocorre pela veiculação do micro-organismo por moscas, via ascendente para o orifício dos tetos, por contaminação de cânulas no tratamento intramamário, ou por contaminação do equipamento de ordenha (insufladores). Ocorre, ainda, por contaminação das mamas a partir do próprio ambiente nos locais de pré e pós-ordenha, ou diretamente no tecido mamário por lesões no úbere e tetos causadas por objetos perfurocortantes (COSTA et al., 1998, 2000; RUEGG, 2010). Nos períodos quentes e chuvosos do ano - propícios a proliferação de moscas - ocorre aumento dos casos de mastite, popularmente conhecidos como “mastite de verão”. Os casos de mastite bovina por *T. pyogenes* são observados principalmente em criatórios com excesso de matéria orgânica no ambiente (lama, terra e dejetos), principalmente nos ambientes da pré e pós-ordenha (MOTTA et al., 2011).

T. pyogenes é reconhecido também como um dos principais agentes de mastite em novilhas (RUEGG, 2010). O hábito de as novilhas mamarem umas

nas outras é reconhecido como um modo de transmissão comum nesta categoria animal. Sugere-se que o micro-organismo seria veiculado da microbiota bucal das novilhas para o orifício do teto de outras fêmeas no ato de mamar (DOMINGUES et al., 2008).

A forma cutânea de infecção por *T. pyogenes* é relativamente comum em bezerros, potros e leitões, embora as lesões tegumentares possam ocorrer em qualquer faixa etária. Já a infecção umbilical ocorre particularmente em bezerros, potros, suínos, borregos e cabritos, visto que *T. pyogenes* é considerado um dos micro-organismos mais comuns na gênese das infecções umbilicais em animais de produção (RADOSTITS et al., 2007). Nas onfalopatias, o micro-organismo pode ser veiculado para o interior do conduto umbilical da própria microbiota da pele local, ou mesmo pela contaminação do umbigo a partir do ambiente contaminado, podendo evoluir, por vezes, para formas disseminadas em outros órgãos causando, particularmente, artrite e pneumonia (CORRÊA e CORRÊA, 1992; KIELSTEIN, 1998).

A infecção oral em bovinos está relacionada com o consumo de água contaminada ou pasto, forragens, alimentos fibrosos, grosseiros ou cortantes, que induzam a formação de lesões ou pequenas soluções de continuidade na cavidade bucal, em geral na gengiva e palato. A ingestão de corpos estranhos com o alimento pode determinar, também, lesões na cavidade bucal ou no trato intestinal, propiciando o estabelecimento do micro-organismo (CURCIO et al., 2002). Em bezerros, a infecção pediodontal por *T. pyogenes* ocorre principalmente no período de erupção dos dentes. Inflamações dentárias na troca ou queda de dentes também propiciam condições de estabelecimento do patógeno na cavidade bucal em ruminantes e suínos, posto que o micro-organismo é isolado da microbiota bucal nessas espécies. A disseminação sistêmica do micro-organismo a partir de infecções na cavidade bucal também possibilita a infecção em outros órgãos (RADOSTITS et al, 2007).

A infecção por via respiratória também é considerada na transmissão, principalmente em ruminantes domésticos, embora ocorra em baixa frequência. Nesses casos, a veiculação da bactéria provavelmente advém da inalação de aerossóis formados a partir do ambiente dos criatórios excessivamente contaminados (KIELSTEIN, 1998; CORRÊA e CORRÊA, 1992).

Infecções iatrogênicas estão relacionadas com procedimentos como castração, corte de cauda, abscessos após injeções com agulhas contaminadas, ou outros procedimentos cirúrgicos que utilizam instrumental contaminado. São comuns também as sinusites secundárias a contaminação de cirurgias de descorna em bovinos. A contaminação de feridas pós-cirúrgicas ocorre a partir do próprio ambiente, por contaminação do instrumental cirúrgico, ou veiculada por moscas (CORRÊA e CORRÊA, 1992; RADOSTITS et al., 2007). Infecções fetais, uterinas, orquite e de glândulas acessórias do aparelho reprodutor masculino (vesícula seminal) são observadas ocasionalmente em bovinos, equídeos, suídeos e bubalinos. *T. pyogenes* tem sido isolado de forma ocasional do sêmen de touros das espécies bovina e bubalina (QUINN et al., 2005, 2011).

Nos animais de companhia a doença é rara. A veiculação da bactéria por moscas ou do próprio ambiente dos criatórios propicia infecções de pele, do conduto auditivo e do trato geniturinário (BILLINGTON et al., 2002; GREENE, 2012).

A morbidade nas infecções por *T. pyogenes* é variável e a mortalidade é baixa, com exceção nos casos de disseminação ou septicêmicos. O micro-organismo apresenta relativa resistência no interior das secreções purulentas à exposição da luz solar direta, em condições de dessecação, e frente aos desinfetantes e antissépticos convencionais. É inativado pelos processos de pasteurização lenta (62-65°C / 30 minutos), rápida (72-75°C / 15-20 segundos), no leite ultrapasteurizado (140-145°C / 2-4 segundos) e fervura. Desinfetantes convencionais como iodo, amônio quaternário, fenol, cresol e hipoclorito de sódio inativam o micro-organismo, em concentrações que variam entre 2 a 5% (CORRÊA e CORRÊA, 1992; QUINN et al., 2005).

2.3 Patogenia e genes associados à virulência

JOST e BILLINGTON (2005) referiram que a patogenicidade de *T. pyogenes* está relacionada principalmente com a produção da piolisina (exotoxina ou citolisina), biofilme, proteases, neuroaminidases, proteína ligada ao colágeno e a presença de fímbrias.

A expressão da piolisina (gene *plo*) é referida como fator essencial para a patogenicidade da bactéria. A piolisina possui efeito tóxico para leucócitos (neutrófilos e macrófagos). Essas citotoxinas formam também poros na membrana das hemácias, que resultam na hemólise e liberação do íon ferro, necessário para o metabolismo bacteriano (BICALHO et al., 2012).

A fímbria tipo 1 ou pili tipo 1 é uma adesina frequentemente codificada por linhagens de *Escherichia coli* (*E. coli*) uropatogênicas (UPEC). Estruturalmente, apresentam-se como hastes helicoidais, constituídas por proteína de subunidade principal (*fimA*) e proteínas de subunidades menores (SUSSMAN, 1997). Nas infecções por *T. pyogenes* em animais domésticos, tem sido observado predomínio na detecção de *fimA*, seguido das subunidades *fimC*, *fimE* e *fimG*. As neuraminidases (genes *nanH* e *nanP*), assim como a proteína ligada ao colágeno (gene *cbpA*), estão relacionadas com a adesão bacteriana às células epiteliais do hospedeiro. O conjunto destes fatores de virulência está associado aos efeitos piogênico, dermonecrosante e de morte celular nos tecidos infectados por *T. pyogenes* (YASSIN et al., 2011).

Estudo realizado por ZASTEMPOWSKA e LASSA (2012), na Polônia, com 89 linhagens de *T. pyogenes* isoladas de mastite clínica bovina, detectou o gene *fimA* na totalidade dos isolados, seguido da presença de *fimE* (91%), *fimC* (88%) e, em menor proporção, *fimG*. No mesmo estudo, foram detectados ambos os genes *nanH* e *nanP* (produção de neuraminidases) em 31,5% das linhagens, com identificação isolada de *nanH* e *nanP* em, respectivamente, 20,2% e 12,4% dos isolados. No mesmo estudo, o gene *cbpA* de produção de colágeno também foi detectado em 21% dos isolados, evidenciando a influência desses fatores de virulência ligados à adesão de *T. pyogenes* às células mamárias de vacas.

Recentemente nos EUA, Bicalho et al. (2012) investigaram a inter-relação entre *E. coli*, *T. pyogenes* e *Fusobacterium necrophorum* (*F. necrophorum*) na patogenia da metrite pós-parto em vacas. Foram avaliadas 111 vacas nos períodos 1-3, 8-10 e 34-36 dias pós-parto. Foi observado que a infecção por linhagens de *E. coli* predominaram significativamente nos distúrbios uterinos entre 1-3 dias pós-parto, enquanto estirpes de *T. pyogenes* (detentoras de *fimA*) e *F. necrophorum* foram significativamente associadas aos distúrbios uterinos nos períodos de 8-10 e 34-36 dias pós-parto. Esses

resultados indicaram que *E. coli* coloniza primariamente o útero nos primeiros três dias pós-parto, produzindo mudanças no ambiente uterino que favorecem a infecção por anaeróbios estritos (*F. necrophorum*) ou anaeróbios facultativos oportunistas, como *T. pyogenes*.

As linhagens de *T. pyogenes* produzem também biofilme, que são agregados celulares (microcolônias bacterianas) distribuídas ao longo de matriz exopolissacarídica. Acredita-se que as linhagens de *T. pyogenes* com potencial de produção de biofilme apresentariam fator de virulência adicional, visto que o micro-organismo estaria protegido da ação de antimicrobianos convencionais, pela inativação dos fármacos no interior do biofilme (QUINN et al., 1994, 2005).

T. pyogenes pode manter-se viável no interior de células epiteliais e fagócitos, dificultando a resposta imune humoral. A viabilidade da bactéria no citoplasma de neutrófilos e macrófagos indica que a imunidade celular é mais efetiva na resolução das infecções pelo patógeno. As infecções são influenciadas pela espécie e idade do animal susceptível. O comportamento oportunista e a presença da bactéria na microbiota da pele e mucosas (em animais de produção), no ambiente dos criatórios e em utensílios de uso nos animais propiciam infecções por várias portas de entrada, principalmente em animais de produção (QUINN et al., 2005, 2011; RADOSTITS et al., 2007).

Após a invasão da pele, glândula mamária, cordão umbilical ou outros tecidos e órgãos, o micro-organismo induz grande quimiotaxia por neutrófilos, que resulta invariavelmente em lesões altamente piogênicas. A reação piogênica intensa induz a circunscrição da reação inflamatória por tecido conectivo (cápsula), visando limitar o processo infeccioso, resultando na formação de abscessos ou piogranulomas, de número e tamanhos variados, ocasionalmente confluentes (CORRÊA e CORRÊA, 1992). São encontrados também no interior das lesões, contingente variável de macrófagos, linfócitos e plasmócitos, além da bactéria livre ou no interior do citoplasma de fagócitos. Os linfonodos que drenam a região afetada podem estar aumentados. O micro-organismo causa a destruição do tecido, edema, necrose e/ou morte celular (KIELSTEIN, 1998, QUINN et al., 1994, 2005, 2011).

T. pyogenes pode ficar restrito ao sítio de infecção, ou disseminar-se via linfo-hemática para outros tecidos e órgãos, desenvolvendo a forma

disseminada ou septicêmica da doença. Vários órgãos podem ser acometidos após a disseminação, embora sejam mais frequentes as lesões articulares e pneumonia. Inflamações ou abscessos em órgãos são observados também em fígado, baço, peritônio, intestino, linfonodos, endocárdio, coluna vertebral (osteomielite) e encéfalo. Em casos septicêmicos, o curso da infecção comumente é fatal devido à toxemia resultante da disseminação e multiplicação sistêmica da bactéria, ou mesmo pelo comprometimento de órgãos vitais (CORRÊA e CORRÊA, 1992; QUINN et al., 2011).

A mastite em vacas e pequenos ruminantes caracteriza-se por formação de nódulos e abscessos com grande coleção purulenta, intenso infiltrado neutrofílico e substituição do tecido glandular mamário por conectivo (RUEGG, 2010; MOTTA et al., 2011).

2.4 Clínica

Diferentes manifestações clínicas são causadas por *T. pyogenes* em animais, apesar de certo predomínio de mastite, linfadenite, abscessos, artropatias, onfalopatias, pneumonia e infecções do trato genital (RADOSTITS et al, 2007, QUINN et al., 2011; RIBEIRO et al., 2015).

2.4.1 Mastite

As infecções mamárias por *T. pyogenes* são mais comuns em bovinos e, secundariamente, em caprinos e ovinos. Nos bovinos ocorrem principalmente em novilhas e vacas, tanto no período seco como na lactação (DOMINGUES et al., 2008). Nas vacas, são observadas principalmente nas primeiras semanas pós-parto. São caracterizadas pela apresentação clínica de mastite, em uma ou mais mamas (COSTA et al., 1998, 2000).

À palpação, a glândula mostra sinais de edema, abscessos e/ou nódulos firmes, que progridem para o surgimento de pontos flutuantes (abscessos), isolados ou múltiplos, fistulados ou não, que drenam pus espesso e fétido. Podem ocorrer isoladamente ou em vários animais sob a forma de surtos (RADOSTITS et al., 2007; MOTTA et al., 2011).

O leite mastítico apresenta conteúdo francamente purulento, de odor desagradável, com ou sem estrias de sangue, de coloração amarelada, positivo no teste de Tamis (MOTTA et al., 2011). São encontrados também, menos frequentemente, ruminantes domésticos com mastite subclínica diagnosticadas pelo “California Mastitis Test” (CMT) ou pela contagem de células somáticas (CCS). Ocasionalmente, são observados animais com sinais sistêmicos de mastite, manifestando febre, anorexia, emagrecimento e agalaxia (RADOSTITS et al., 2007; SANTOS e FONSECA, 2007).

Domingues et al. (2008) relataram caso de mastite clínica em novilha, infectada por *T. pyogenes*. O animal apresentava sinais de hipertermia, hiporexia, prostração, além da glândula mamária hiperêmica, edemaciada e firme à palpação. A secreção retirada da glândula mamária apresentava conteúdo purulento, denso e fétido.

Motta et al. (2011) descreveram surto de mastite por *T. pyogenes* em propriedade leiteira no interior do estado de São Paulo, acometendo 26 vacas. Os animais apresentavam nódulos ou abscessos na glândula, com e sem fístulas, além de alterações macroscópicas no leite. Dos 26 animais, dez foram diagnosticados com mastite clínica no teste de Tamis e 16 com mastite subclínica no CMT, com isolamento da bactéria no leite. Dos 10 animais com mastite clínica somente em três (30%) o tratamento com associação de cefalexina e neomicina surtiu o efeito.

2.4.2 Lesões cutâneas

Nas lesões cutâneas por *T. pyogenes* se observa a presença de abscessos isolados ou múltiplos, principalmente nas regiões cervical, abdominal e pélvica dorsal. Os casos cutâneos geralmente são associados à presença de miíases. Os abscessos supurados drenam conteúdo branco-amarelado, espesso, comumente de odor desagradável, fétido ou pútrido (KIELSTEIN, 1998). O pus não apresenta grânulos, diferentemente da actinomicose. As lesões complicadas podem evoluir para a formação de celulite (RADOSTITS et al., 2007).

2.4.3 Lesões em cavidade oral

Nas lesões da cavidade oral se observa aumento de volume local, em região mandibular ou maxilar. À palpação das lesões bucais se observa hiperemia e endurecimento da região, alternado com pontos flutuantes (abscessos), com e sem fistulização. Nesses casos, o micro-organismo pode se disseminar por contiguidade para o tecido ósseo adjacente, levando a osteomielite. Nos bovinos se observa aumento de volume principalmente em região de mandíbula, periodontite, perda dos dentes pré-molares, halitose e emaciação (KIELSTEIN, 1998; RADOSTITS et al., 2007).

Recentemente, CAFFARO et al. (2014) descreveram caso incomum de osteomielite mandibular deformante em bovino causada por *T. pyogenes*, localizado na face ventro-lateral da porção caudal do ramo direito da mandíbula. Com base no exame radiográfico pode-se observar acentuada reação periodontal na mandíbula direita, com predomínio de áreas líticas e destruição da cortical óssea.

2.4.4 Linfadenite

Em ovinos e caprinos *T. pyogenes* causa linfadenite caseosa. Esta lesão é indistinguível clinicamente da linfadenite causada por *Corynebacterium pseudotuberculosis*, com exceção do odor pútrido do pus nas infecções por *T. pyogenes*, comumente não encontrado nas infecções por *C. pseudotuberculosis* (RIBEIRO, et al., 2011).

Lara et al. (2011) isolaram *T. pyogenes* de linfonodos de suínos e javalis (*Sus scrofa*), com e sem lesões, em animais abatidos em frigorífico no interior do estado de São Paulo, mostrando lesões indistinguíveis macroscopicamente na linha de abate das causadas por outros micro-organismos mais frequentes na linfadenite em suídeos, como *Mycobacterium* spp. e *Rhodococcus equi*.

2.4.5 Abscessos

Em bovinos e suínos são observados casos de abscessos na coluna e, esporadicamente, no encéfalo. Os abscessos de coluna ocorrem devido à disseminação hemolinfática, ou são secundários à migração de parasitas na

região vertebral. Os casos encefálicos são secundários também a complicações de otite média ou interna. Nesses animais pode-se observar paresia, paralisia, deambulação e incoordenação motora (QUINN et al., 2005).

2.4.6 Lesões no trato genital

T. pyogenes tem sido relatado em casos de distúrbios uterinos em vacas, principalmente entre a primeira e quarta semanas pós-parto (BICALHO et al., 2012), e em casos de subfertilidade e infertilidade em ovelhas (QUINN et al., 2005, 2011). Bicalho et al. (2012), nos EUA, referiram que o isolamento de *T. pyogenes* de vacas no período pós-parto está intimamente relacionado com a ocorrência de endometrite, metrite, descargas vaginais purulentas, retenção de placenta, aumento do tempo do primeiro serviço, maior número de serviços para a concepção e aumento no número de vacas descartadas em razão da subfertilidade ou infertilidade.

Os abortamentos em vacas e, ocasionalmente, outras fêmeas de animais domésticos, ocorrem em qualquer fase gestacional. A infecção experimental por *T. pyogenes* em vacas no início e terço médio da gestação resultou no abortamento dos animais. A ocorrência dos abortamentos em vacas é baixa e, comumente, não supera 2% da casuística. Os fetos apresentam múltiplos abscessos em órgãos ou autólise (KIELSTEIN, 1998; RADOSTITS et al., 2007).

Gomes (2013) analisou 8.962 abortamentos a natimortos de vacas no período de dez anos. Desse total, 1.299 (14,49%) foram abortos ocasionados por bactérias, onde *Trueperella pyogenes* teve destaque como patógeno primário no total de 321 casos (4,22%), capaz de causar morte embrionária e abortos. Seguido de *Bacillus spp* (321/3,58%), *Listeria spp* (121/1,35%), *Escherichia coli* (98/1,09%) e *Leptospira interrogans* (79/0,88%)

2.4.7 Outros sinais clínicos

As lesões umbilicais em animais de produção são caracterizadas pelo aumento do volume e endurecimento da região, com presença de secreção purulenta local. Essas infecções são propensas a progredir para formas

disseminadas, causando lesões articulares (poliartrite) ou pneumonia (CORRÊA e CORRÊA, 1992; RADOSTITS et al., 2007). As artropatias por *T. pyogenes* acometem um ou mais membros de animais de produção, particularmente bezerros. As articulações estão doloridas e os animais relutam em caminhar. A pneumonia é uma manifestação clínica usualmente associada a casos disseminados. Os animais que apresentam pneumonia mostram sinais de tosse e secreção nasal, além de inapetência e emagrecimento progressivo (CORRÊA e CORRÊA, 1992).

2.4.8 Formas disseminadas

Em animais com disseminação da bactéria predominam infecções nos pulmões, articulações, fígado, intestino, peritônio, rins, endocárdio, baço, linfonodos mediastínicos e mesentéricos. As lesões disseminadas são menos frequentes em ossos (CURCIO et al., 2002), coluna vertebral (osteomielite) e encéfalo. O comportamento oportunista de *T. pyogenes* possibilita que o micro-organismo seja encontrado também causando infecções clínicas em outros locais, como bursite, tendinite, orquite, vesiculite seminal, pericardite, empiema e flegmão (CORRÊA e CORRÊA, 1992; QUINN et al., 1994, 2005; KIELSTEIN, 1998; MEYER e REBOLI, 2005; QUINN et al., 2005; RADOSTITS et al., 2007).

2.5. Diagnóstico

O diagnóstico das infecções por *T. pyogenes* é fundamentado no isolamento e identificação da bactéria, aliado aos achados epidemiológicos e sinais clínicos. Na prática, o cultivo microbiológico é considerado o método de rotina para o diagnóstico da bactéria. O leite, secreções purulentas ou outros espécimes clínicos colhidos de lesões cutâneas, umbilicais, líquido sinovial, lavado transtraqueal e fragmentos de órgãos, são submetidos ao cultivo microbiológico em meio de ágar suplementado com sangue ovino ou bovino (5%), preferencialmente em condições de microaerofilia (5–10% de CO₂). O isolamento de colônias pequenas, com 0,5 mm de diâmetro, esbranquiçadas, circulares, após 48 horas de incubação a 37°C, com halo hemolítico ao redor das colônias é sugestivo de *T. pyogenes*. A coloração de Gram revela bactérias

gram-positivas e pleomórficas. A reação de catalase negativa e CAMP positiva com *Staphylococcus aureus* são testes confirmatórios no diagnóstico de *T. pyogenes* (MEYER e REBOLI, 2005; QUINN et al., 1994, 2005, 2011).

A identificação microbiológica pode ser realizada também utilizando “kits” diagnósticos fenotípico como o API Coryne™ (bioMérieux, USA), que possibilita o diagnóstico de forma rápida, prática e acurada, submetendo os isolados a utilização de vários substratos.

A leucocitose por neutrofilia, discreta monocitose e anemia moderada são os principais achados hematológicos em animais de produção (CORRÊA e CORRÊA, 1992; RADOSTITS et al, 2007).

As infecções mamárias em vacas se caracterizam por processos clínicos piogênicos em um ou mais animais, com formação de abscessos (fistulados ou não) e presença de regiões nodulares nas mamas à palpação. O leite é positivo no teste da caneca telada de fundo escuro. Comumente apresenta cor alterada, odor fétido e presença de pus (RADOSTITS et al., 2007).

Exames radiológicos de tórax e abdômen podem revelar massas, nódulos ou abscessos em órgãos, ou grande coleção de líquidos em cavidades. Em estruturas ósseas, se observa lesões de aspecto esponjoso, em virtude da rarefação óssea provocada pelo processo inflamatório (CORRÊA e CORRÊA, 1992; RADOSTITS et al., 2007; CAFFARO et al., 2014).

YASSIN et al. (2011) utilizaram o diagnóstico molecular em linhagens de *T. pyogenes* com base na amplificação de 16S rRNA, contribuindo, inclusive, na reclassificação da bactéria. Os métodos moleculares tem se mostrado valiosos também no diagnóstico do micro-organismo em diferentes espécimes clínicos e na detecção de certos fatores de virulência. Apesar da alta especificidade, as técnicas moleculares têm sido utilizadas em situações específicas de pesquisa em isolados obtidos de animais, ou em infecções graves por *T. pyogenes* em humanos.

A semelhança das manifestações clínicas causadas por *T. pyogenes* em animais de produção, das infecções determinadas pelos gêneros *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Actinomyces* e *Actinobacillus* requerem o diagnóstico diferencial desses actinomicetos. Em bovinos, também deve-se proceder o diagnóstico diferencial para *Mycobacterium bovis* e outras micobacterias, particularmente nos abscessos em órgãos, linfadenite e

pneumonia, em virtude da similaridade das lesões causadas por estas bactérias (QUINN, 2011; LARA et al., 2011).

Exames histopatológicos em animais infectados por *T. pyogenes* são realizados utilizando usualmente a coloração de HE, e revelam processo inflamatório com intenso infiltrado de neutrófilos, secundariamente de macrófagos, além da presença de material purulento, debris celulares, micro-organismos pleomórficos livres ou no interior de fagócitos, circundado por cápsula fibrosa (RADOSTITS et al., 2007).

Os principais achados de necropsia incluem a presença de abscessos (isolados ou múltiplos), que drenam pus denso e fétido, principalmente na pele, região umbilical, pulmões, glândula mamária, rim, fígado, peritônio, linfonodos e baço. Em animais com artrite, observa-se aumento das articulações, com alteração do aspecto do líquido sinovial (turvo e espesso) e destruição da superfície articular (CORRÊA e CORRÊA, 1992; RADOSTITS et al., 2007).

2.6. Tratamento

O tratamento das infecções por *T. pyogenes* possui efetividade variável, tendo em vista a dificuldade dos antimicrobianos atingirem concentrações terapêuticas nos focos piogênicos, apesar da sensibilidade “in vitro” da bactéria aos fármacos convencionais (RIBEIRO et al., 2008b; RISSETI et al., 2013).

No Brasil, Giuffrida e Bignard (2011) investigaram o perfil de sensibilidade microbiana “in vitro” em 54 linhagens de *T. pyogenes* obtidas de diferentes manifestações clínicas em animais domésticos, isoladas na região de Presidente Prudente, SP, e observaram que os isolados foram sensíveis principalmente a ceftriaxona (83,33%), penicilina (79,63%), amoxicilina (74,07%), ampicilina (74,07%) e gentamicina (74,07%). Em contraste, os maiores índices de resistência dos isolados foram observados para sulfonamidas (62,96%), estreptomicina (50,0%), norfloxacin (35,19%), florfenicol (33,33%) e tetraciclina (31,48%).

Recentemente, Riseti et al. (2013) investigaram o perfil de sensibilidade “in vitro” de 62 linhagens de *T. pyogenes* isoladas de casos de mastite em vacas na região de Botucatu, SP. Os isolados foram sensíveis principalmente para cefoperazona (98%; 48/49), amoxicilina (98%; 48/49), florfenicol (97,7%; 42/43), cefalexina (93,7%; 44/47), gentamicina (92%; 57/62), ceftiofur (91%;

20/22), tetraciclina (89,8%; 44/49), penicilina (88%; 22/25), enrofloxacino (87,5%; 42/48), ampicilina (85,2%; 40/47) e sulfametoxazole/trimetoprim (65,4%; 17/26).

Apesar de vários antimicrobianos apresentarem efetividade “in vitro”, notadamente para o grupo das cefalosporinas, penicilinas e aminoglicosídeos, o tratamento “in vivo”, nas infecções por *T. pyogenes* usualmente é ineficaz, particularmente nos casos de mastite, em virtude da formação de piogranulomas, além da característica intracelular da bactéria, que dificultam a ação dos fármacos no interior do foco piogênico (RADOSTITS et al., 2007; RIBEIRO et al., 2008b).

Em virtude da refratariedade da bactéria aos tratamentos utilizando antimicrobianos convencionais, recomenda-se instituir a terapia com respaldo nos testes de sensibilidade microbiana “in vitro” (RADOSTITS et al., 2007; MOTTA et al., 2011). No entanto, o prognóstico das infecções por *T. pyogenes* em animais domésticos é desfavorável (CORRÊA e CORRÊA, 1992; QUINN et al., 2005). Particularmente nas infecções mamárias, por vezes recomenda-se a ablação (secagem) química dos quartos mamários afetados, ou mesmo o descarte do animal (RIBEIRO, 2008b).

A abordagem cirúrgica é indicada nos casos de abscessos cutâneos ou na formação de nódulos, promovendo a ruptura dos abscessos e a drenagem do conteúdo purulento. Após a drenagem recomenda-se a infusão de soluções anti-sépticas a base de iodo, iodo-povidine (1-5%), ou antimicrobianos tópicos. A retirada cirúrgica de abscessos em outros órgãos comumente não é bem sucedida (RADOSTITS et al., 2007).

2.6.1 Índice de resistência múltipla aos antimicrobianos

O IRMA é calculado pela razão entre o número de classe(s) de antimicrobiano(s) contra a(s) qual (is) cada linhagem é resistente e o número total de classes testadas. Em geral são testadas, no mínimo, dez classes e índices $\geq 0,3$ são considerados como fonte potencial de transmissão de genes de resistência pelos micro-organismos.

Nas últimas décadas, o IRMA tem sido utilizado também para outros micro-organismos. Neste contexto, recentemente no Brasil, foi observada alto

IRMA em 67 linhagens de *Rhodococcus equi* isoladas de equinos, humanos e do ambiente, particularmente para os isolados de origem animal (GIRARDINI et al., 2013).

2.7. Controle

A infecção em animais de produção acomete principalmente criatórios com deficiências nas medidas gerais de manejo e/ou de higiene (RADOSTITS et al., 2007).

Não existem medidas específicas para o controle e a profilaxia das infecções por *T. pyogenes*, em virtude do comportamento oportunista do patógeno, da presença na microbiota de oro-faringe, pele e mucosas dos animais de produção, e da ampla distribuição da bactéria no ambiente (CORRÊA e CORRÊA, 1992; RADOSTITS et al., 2007).

Recomenda-se realizar a antissepsia do umbigo dos animais recém-nascidos com solução a base de iodo (5%), até a secagem completa e descolamento do coto umbilical. Na alimentação, deve-se evitar o fornecimento de capim e forrageiras grosseiras, ressecadas ou pontiagudas, que possam favorecer traumatismos na cavidade bucal em animais de produção (KIELSTEIN, 1998; RADOSTITS et al., 2007).

Em criatórios de ruminantes de leite indica-se o controle de moscas e o tratamento de miíases. Nos casos de mastite recomenda-se a segregação dos animais acometidos, a ablação química (“secagem”) das mamas, ou mesmo o descarte do animal com acometimento de mais de uma mama (COSTA et al., 1998, 2000). Recomendam-se, também, ações de profilaxia e controle para micro-organismos ambientais, assim como para a profilaxia da mastite em novilhas (DOMINGUES et al., 2008). O leite de animais infectados não deve ser fornecido a outros animais (SANTOS e FONSECA, 2007).

Os animais infectados devem ser isolados e tratados em local separado dos demais do rebanho, ou mantidos no último lote da ordenha (SANTOS e FONSECA, 2007; RIBEIRO, 2008b). Qualquer tipo de secreção purulenta deve ser submetida à desinfecção ou incinerada (queimada) evitando o acesso de moscas. Deve-se realizar a desinfecção física e química periódica das instalações de animais de produção e de companhia, retirada diária de fezes e

dejetos do ambiente, além de higienização de utensílios e desinfecção de instrumental cirúrgico utilizado nos animais (CORRÊA e CORRÊA, 1992; RADOSTITS et al., 2007).

2.8. Saúde Pública

São raros os casos de acometimento de humanos por *T. pyogenes*. As infecções pelo micro-organismo são descritas predominantemente em indivíduos que tem contato estreito com animais domésticos ou ambiente rural, após infecções hospitalares, em pacientes com doenças debilitantes ou imunossupressivas, ou secundária à inoculação traumática da bactéria na pele por objetos perfurocortantes (LYNCH et al., 1998). Pneumonia, artrite, endocardite, lesões cutâneas, espondilite, abscessos na musculatura e em órgãos abdominais são as principais manifestações clínicas relatadas em humanos (MEYER e RIBOLI, 2005; PLAMONDON et al., 2007).

Evitar o contato manual com secreções piogênicas de animais, cuidados na desinfecção do ambiente e de instrumental cirúrgico em hospitais e não consumir leite sem fiscalização oficial (ou não submetido a tratamento térmico) são procedimentos recomendados como medidas gerais na prevenção das infecções por *T. pyogenes* em humanos (QUINN et al., 2005, 2011; RADOSTITS et al., 2007; SANTOS e FONSECA, 2007).

HIPÓTESES DE ESTUDO

Os estudos com afecções por *T. pyogenes* em animais, no Brasil, particularmente em mastite, estão restritos aos relatos de caso ou notificações de surtos. Não foram encontrados estudos sistematizados no país envolvendo a caracterização de genes de virulência em grande número de linhagens obtidas de casos de mastite em vacas, tampouco em outras manifestações clínicas em animais domésticos.

Acredita-se que o uso abusivo ou não racional de antimicrobianos no tratamento das infecções por *T. pyogenes* em animais de produção, sem o respaldo de testes “in vitro” de sensibilidade – principalmente nos casos de mastite – pode resultar em linhagens multirresistentes aos antimicrobianos, incluindo dentre os isolados do presente estudo.

Até o momento, os estudos envolvendo os genes de *T. pyogenes* associados à virulência (*plo*, *fimA*, *fimC*, *fimE*, *fimG*, *nanH*, *nanP* e *cbpA*) estão praticamente restritos a mastite e metrite bovina, em outros países. Não foram encontrados estudos em outros países, tampouco no Brasil, investigando a presença desses fatores de virulência em linhagens isoladas de outras afecções como pneumonia, abscessos, linfadenite, encefalite, entre outras, em equinos, pequenos ruminantes, suínos e animais de companhia. Assim, postula-se que dentre as linhagens do estudo ora proposto, serão detectados os genes supracitados associados a virulência da bactéria em isolados obtidos no Brasil, em diferentes manifestações clínicas, em animais de produção e de companhia.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

✓ Investigar o perfil de sensibilidade e multirresistência microbiana “in vitro” e os principais genes associados à virulência em linhagens de *Trueperella pyogenes* isoladas de casos de mastite e outras afecções de animais domésticos;

3.2. Específicos

3.2.1 Determinar a sensibilidade microbiana, o índice de resistência múltipla aos antimicrobianos e os perfis de resistência “in vitro” em isolados de *T. pyogenes* obtidos de animais domésticos pelo método de difusão como discos;

3.2.2 Comparar a ocorrência de genes associados à virulência (fímbrias, citotoxina, neuraminidases e proteínas ligadas ao colágeno) e a presença de diferentes manifestações clínicas por *T. pyogenes* em animais domésticos;

3.2.3 Avaliar as principais associações dos genes relacionados com a virulência em linhagens de *T. pyogenes* isolados de diferentes afecções em animais domésticos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais e micro-organismos

Foram utilizados no presente estudo 41 isolados de *T. pyogenes*, obtidos de casos de mastite em vacas e de outras afecções provenientes de espécies domésticas. As linhagens disponibilizadas para o estudo foram provenientes das bacteriotecas dos Laboratórios de Microbiologia da FMVZ-UNESP/Botucatu, SP, e da Universidade Federal de Santa Maria, RS (sob a responsabilidade da Profa. Dra. Agueda Castagna de Vargas), além de novas linhagens isoladas prospectivamente pelo serviço de diagnóstico dos laboratórios supracitados, ao longo do período do estudo.

Os testes fenotípicos (identificação, prova de CAMP e sensibilidade microbiana “in vitro”) foram realizados no Laboratório de Microbiologia da FMVZ-UNESP/Botucatu, SP.

Devido a labilidade da bactéria no estoque, todas as linhagens foram mantidas, simultaneamente, em tubos no meio de Lignieres (25°C) e congeladas (-20°C) em BHI (Brain Heart Infusion/Caldo Cérebro Coração) acrescido de glicerol (15%). Ainda, foram mantidas em meio de ágar acrescido de sangue ovino (5%) desfibrinado e ágar Colúmbia sangue, refrigeradas (4-8°C), com passagens quinzenais.

4.2. Diagnóstico das mastites

O diagnóstico da mastite clínica foi firmado com base nas alterações macroscópicas do leite na prova da caneca telada de fundo escuro (Tamis), na presença de sinais clínicos da inflamação na glândula mamária (grumos, pus, sangue ou dessora) e/ou sistêmicos nos animais (RADOSTITS et al., 2007). A mastite subclínica foi diagnosticada pelo teste clássico do “Califórnia Mastitis Test” (CMT), utilizando leite dos quartos mamários com escores de 1+ a 3+ (SCHALM et al., 1971). Devido à inconsistência das informações dessa classificação em alguns isolados das bacteriotecas, os casos clínicos e subclínicos foram agrupados como mastite.

4.3. Diagnóstico microbiológico

Todos os espécimes clínicos (leite, líquido, lavado transtraqueal, conteúdo de abscessos, fragmentos de órgãos) foram semeados no meio de ágar acrescido de sangue ovino (5%) desfibrinado, mantidos em condições de aero e microaerofilia (estufa de CO₂, Panasonic/Sanyo, MSO - 19AIC – UV), a 37°C, por 96 horas. Após 48 horas de incubação, a presença de colônias diminutas, com cerca de 0,5 mm de diâmetro, beta-hemolíticas, foi considerada sugestiva de *T. pyogenes*. As colônias foram submetidas à coloração de Gram, visando à observação de organismos pleomórficos, gram-positivos (QUINN et al., 1994, 2005, 2011).

4.4. Teste de CAMP para identificação da piolisina

O teste de CAMP foi realizado para a detecção de citotoxina e também para a confirmação fenotípica dos isolados como *T. pyogenes*. As colônias foram submetidas ao teste de CAMP frente à cepa ATCC 13565 de *Staphylococcus aureus*, visando a observação da formação de “ponta de seta”, visualizada na intersecção entre as sementeiras dos isolados de *T. pyogenes* e *S. aureus*, em virtude do efeito sinérgico da hemolisina de *S. aureus* e citotoxina de *T. pyogenes* (QUINN et al., 1994, 2005, 2011).

4.6. Perfil de sensibilidade microbiana “in vitro”

4.6.1 Método de difusão com discos modificado

Todos os isolados de *T. pyogenes* foram submetidos à prova de sensibilidade microbiana “in vitro” utilizando o método de difusão com discos com base no Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI (CLSI, 2013), modificado pela adição de Tween 80 (0,5%) e sangue ovino (5%) no ágar Muller-Hinton, conforme descrito por MARTÍNEZ-MARTÍNEZ (1995). A leitura dos halos de inibição (“breakpoint”) foi baseada no padrão para *Streptococcus pneumoniae* (CLSI, 2013), considerado também micro-organismo fastidioso. Foram utilizados como controles cepas de *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 e *T. pyogenes* ATCC 8104. Foram utilizados 18 antimicrobianos

pertencentes a dez grupamentos distintos de fármacos, disponíveis em medicina veterinária, recomendados no tratamento das infecções por *T. pyogenes* em animais domésticos (RADOSTITS et al., 2007), com ênfase na mastite bovina (SANTOS e FONSECA, 2007), e/ou que têm demonstrado efetividade “in vitro” em isolados da bactéria (GIGÈRE et al., 2010; GIUFFRIDA e BIGNARDE, 2011; MOTTA et al., 2011; ZASTEMPOWSKA e LASSA, 2012; RISSETI et al., 2013) [Quadro 1].

Quadro 1. Antimicrobianos pertencentes a dez grupamentos distintos, utilizados no teste “in vitro” de sensibilidade microbiana – método de difusão com discos - em linhagens de *Trueperella pyogenes* isoladas de animais. Botucatu, SP, 2012 - 2015.

1. **Cefalosporinas:** ceftiofur (30 µg), ceftriaxona (30 µg) e cefoperazona (30 µg);
2. **Penicilinas e outros derivados beta-lactâmicos:** penicilina (10 UI), ampicilina (10 µg) e oxacilina (1µg);
3. **Macrolídeos:** azitromicina (15 µg) e eritromicina (15 µg);
4. **Fluorquinolonas:** enrofloxacino (5 µg) e ciprofloxacino (5 µg);
5. **Aminoglicosídeos:** gentamicina (10 µg), amikacina (30 µg) e neomicina (30 µg);
6. **Lincosamina:** lincomicina (2 µg);
7. **Anfenicóis:** florfenicol (30 µg);
8. **Sulfonamidas:** sulfametoxazole–trimetoprim (25 µg);
9. **Tetraciclínas:** tetraciclina (30 µg);
10. **Polipeptídeo:** bacitracina (10 UI).

4.7. Multirresistência dos isolados e Índice de Resistência Múltipla aos antimicrobianos

O Índice de Resistência Múltipla aos Antimicrobianos (IRMA) foi calculado pela razão entre o número de classe(s) de antimicrobiano(s) na(s) qual(is) cada isolado é resistente e o número total de classes testadas (dez classes). Linhagens com índices $\geq 0,3$ foram consideradas como fonte potencial de transmissão de genes de resistência (KRUMPERMAN, 1983). Foram consideradas multirresistentes os isolados que apresentaram resistência simultânea a três ou mais grupamentos de antimicrobianos (SCHWARZ et al., 2010).

4.8. Diagnóstico molecular

Todas as linhagens de *T. pyogenes* foram submetidas à amplificação de genes específicos associados à virulência gene *plo*, fímbrias *fimA*, *fimC*, *fimE*, *fimG*, neuraminidases *nanH*, *nanP*, e proteína ligada a colágeno *cbpA*, utilizando a reação em cadeia pela polimerase (PCR) [ZASTEMPOWSCA e LASSA, 2012]. Os primers utilizados, condições de ciclos e produto esperado da amplificação (pares de bases) são descritos no Quadro 2. Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose (1,2%), corados com brometo de etídio (0,5µg/mL) e visualizados em sistema de imagem (Kodak GL 100). O diagnóstico molecular foi realizado sob a responsabilidade da Dra Ewa Zastempowska, da Faculty of Natural Science, Kazimierz Wielki University, da Polônia.

Quadro 2. Primers e condições de ciclo para reação em cadeia pela polimerase visando à amplificação de fatores de virulência de *T. pyogenes* isolados de animais domésticos. Botucatu, 2015.

Gene alvo		Sequência do primer (5' - 3')	Temperatura de anelamento	Tamanho do amplicon (pares de base)
Piolisina	<i>plo</i>	senso: TCATCAACAATCCACGAAGAG anti-senso: TTGCCTCCAGTTGACGCTTT	60 °C	270 pb
Proteína ligada a colágeno	<i>cbpA</i>	senso: GCAGGGTTGGTGAAAGAGTTTACT anti-senso: GCTTGATATAACCTTCAGAATTTGCA	60 °C	124 pb
Neuraminidases	<i>nanP</i>	senso: TTGAGCGTACGCAGCTCTTC anti-senso: CCACGAAATCGGCCTTATTG	57 °C	150 pb
	<i>nanH</i>	senso: CGCTAGTGCTGTAGCGTTGTTAAGT anti-senso: CCGAGGAGTTTTGACTGACTTTGT	60 °C	781 pb
Fímbrias	<i>fimA</i>	senso: CACTACGCTCACCATTCAACAAG anti-senso: GCTGTAATCCGCTTTGTCTGTG	57 °C	605 pb
	<i>fimC</i>	senso: TGTCGAAGGTGACGTTCTTCG anti-senso: CAAGGTCACCGAGACTGCTGG	60 °C	843 pb
	<i>fimE</i>	senso: GCCCAGGACCGAGAGCGAGGGC anti-senso: GCCTTCACAAATAACAGCAACC	57 °C	775 pb
	<i>fimG</i>	senso: ACGCTTCAGAAGGTCACCAGG anti-senso: ATCTTGATCTGCCCCCATGCG	60 °C	929 pb

4.9. Análise estatística

A associação entre as diferentes manifestações clínicas (particularmente das mastites), a ocorrência de multirresistência dos isolados e a presença dos genes associados à virulência foi realizada pelo teste de Qui-quadrado (TRIOLA, 2005) e exato de Fisher utilizando o programa EPI-INFO (versão 6.04), considerando significantes valores de $P < 0,05$.

4.10. Comissão de Ética

O estudo proposto foi aprovado pela Câmara de Ética e Experimentação Animal (CEEAA) da FMVZ – UNESP/Botucatu, SP, protocolo número 126/2013.

5. RESULTADOS

5.1. Isolamento das linhagens

Foram isoladas 41 linhagens de *T. pyogenes*, obtidas a partir da semeadura de diferentes espécimes clínicos em meio de ágar ovino (5%), mantido em condições de aero e microaerofilia, a 37°C, por 96 horas. Após 48 horas de incubação, todas as colônias compatíveis com a bactéria, acusaram micro-organismos pleomórficos, gram-positivos na coloração de Gram.

A maioria dos isolados do presente estudo foi proveniente de afecções em ruminantes domésticos. A maior ocorrência dos isolados foi obtida de casos mastite bovina (46%), abscessos (19,5%), metrite (9,8%), pneumonia (9,8%), linfadenite (7,3%), seguidos em menor frequência por encefalite (4,9%) e orquite (2,4%). A tabela 1 resume as afecções por *T. pyogenes* segundo as espécies animais amostradas.

Tabela 1. Ocorrência de diferentes afecções por *Trueperella pyogenes* em animais domésticos. Botucatu, SP, 2012 - 2015.

Afecção	Mastite	Abscesso	Trato Reprodutivo ¹	Pneumonia	Linfadenite	Encefalite	Total
Espécie Animal	nº isolados/ T isolados (%)	nº isolados/ T isolados (%)	nº isolados/ T isolados (%)	nº isolados/ T isolados (%)	nº isolados/ T isolados (%)	nº isolados/ T isolados (%)	
Bovina	18/19 (94,7)	6/8 (75)	4/5 (80)	4/4 (100)	-	2/2 (100)	34 (100)
Caprina	-	-	-	-	3/3 (100)	-	3 (100)
Ovina	1/19 (5,3)	1/8 (12,5)	-	-	-	-	2 (100)
Canina	-	1/8 (12,5)	-	-	-	-	1 (100)
Equina	-	-	1/5(20)				1 (100)
Total	19 (100)	8 (100)	5 (100)	4 (100)	3 (100)	2 (100)	41 (100%)

¹ Trato Reprodutivo: Endometrite e Orquite

T isolados: total de isolados

Nº: número

5.2. Características fenotípicas

Todas as linhagens isoladas apresentaram teste de catalase negativo e Camp positivo frente à cepa ATCC 13565 de *Staphylococcus aureus*, com aspecto de “ponta de seta”, visualizada na intersecção entre as semeaduras de *T. pyogenes* e *S. aureus*.

5.3. Perfil de sensibilidade microbiana “in vitro”

No teste de difusão com discos, os isolados mostraram maior sensibilidade “in vitro” frente ao florfenicol (97,6%), azitromicina (97,6%), tetraciclina (95,2%), ceftiofur (92,7%), penicilina (92,7%), ampicilina (92,7%), gentamicina (90,3%) e eritromicina (87,8%). Em contraste, a maior resistência das linhagens foi observada para bacitracina (46,3%), neomicina (31,7%), lincomicina (31,7%) e sulfametoxazole/trimetoprim (24,3%) [Tabela 2].

Tabela 2. Perfil de sensibilidade microbiana “in vitro”, no teste de difusão com discos, em isolados de *Trueperella pyogenes* obtidos de animais domésticos. Botucatu, SP, 2012 - 2015

Grupos	Antimicrobianos	Perfil de Sensibilidade		
		Parcialmente		
		<u>Sensível</u> N (%)	<u>Sensível</u> N (%)	<u>Resistente</u> N (%)
CEFALOSPORINAS	Ceftiofur	38 (92,7)	1 (2,4)	2 (4,9)
	Ceftriaxona	35 (85,4)	3 (7,3)	3 (7,3)
	Cefoperazona	35 (85,4)	6 (14,6)	-
PENICILINA / DERIVADOS BETA LACTAMICOS	Penicilina	38 (92,7)	2 (4,9)	1 (2,4)
	Ampicilina	38 (92,7)	1 (2,4)	2 (4,9)
	Oxacilina	36 (87,8)	2 (4,9)	3 (7,3)
MACROLÍDEOS	Azitromicina	40 (97,6)	-	1 (2,4)
	Eritromicina	36 (87,8)	2 (4,9)	3 (7,3)
FLUORQUINOLONAS	Enrofloxacino	30 (73,2)	6 (14,6)	5 (12,2)
	Ciprofloxacino	34 (83)	7 (17)	-
AMINOGLICOSÍDIOS	Gentamicina	37 (90,3)	1 (2,4)	3 (7,3)
	Amicacina	23 (56,1)	10 (24,3)	8 (19,6)
	Neomicina	22 (53,7)	6 (14,6)	13 (31,7)
LINCOMICINA	Lincomicina	27 (65,9)	1 (2,4)	13 (31,7)
ANFENICÓIS	Florfenicol	40 (97,6)	1 (2,4)	-
SULFONAMIDAS	Sulfa/tri*	31 (75,7)	-	10 (24,3)
TETRACICLINAS	Tetraciclina	39 (95,2)	1 (2,4)	1 (2,4)
POLIPEPTÍDEOS	Bacitracina	18 (44)	4 (9,7)	19 (46,3)

Nº = número de isolados

% = porcentagem

Sulfa = sulfametoxazole/trimetoprim

5.4. Índice de Resistência Múltipla aos Antimicrobianos (IRMA)

A ocorrência de multirresistência (IRMA $\geq 0,3$) foi observada em 13 (31,7%) das linhagens. O IRMA dos isolados variou entre 0,1 e 1. Dentre os isolados multirresistentes, a maior frequência foi encontrada em bovinos (n=12;

92,4%), particularmente em animais com mastite (n=4; 33,3%). Dentre os isolados com perfis de multirresistência, a maior ocorrência foi observada em bovinos (Tabela 3), com mastite.

Tabela 3. Perfis de multirresistência aos antimicrobianos em linhagens de *Trueperella pyogenes* isoladas de ruminantes domésticos. Botucatu, SP, 2012 – 2015.

Espécie Animal	Perfis de multirresistência aos antimicrobianos	Nº de isolados
Bovina	OXA/AZT/ERI/ENR/GEN/AMC/NEO/LIN/SUT	1
	CTX/PEN/AMP/ENR/AMC/NEO/SUT	1
	CFT/CEX/OXA/GEN/AMC/LIN/BAC	1
	ERI/ENR/LIN/BAC	2
	NEO/LIN/SUT/TET	1
	CTX/LIN/ SUT/ BAC	1
	AMC/NEO/LIN/BAC	1
	AMP/ENR/NEO	1
	NEO/LIN/BAC	1
	NEO/SUT/BAC	1
	LIN/SUT/BAC	1
Caprina	CFT/OXA/GEN/AMC/NEO/LIN/SUT	1

CFT = ceftiofur, CTX = ceftriaxona, CFP = cefoperazona, PEN = penicilina, AMP = ampicilina, OXA = oxacilina, AZT = azitromicina, ERI = eritromicina, ENR = enrofloxacino, CIP = ciprofloxacino, GEN = gentamicina, AMC = amicacina, NEO = neomicina, LIN = lincomicina, FLO = florfenicol, SUT = sulfazotrim, TET = tetraciclina, BAC = bacitracina
Nº = número de isolados

5.5 Diagnóstico Molecular

Dentre os oito genes investigados nas 41 linhagens, utilizando a reação em cadeia pela polimerase (PCR), 40 (97,6%) apresentaram gene *fimA* e 36 (87,9%) o gene *plo*. Os genes *fimE* e *fimC* foram detectados, respectivamente, em 32 (78,1%) e 23 (56,1%) isolados. *nanH* e *nanP*, assim como a proteína ligada ao colágeno (gene *cbpA*) foram encontrados, respectivamente, em 28 (68,3%), 34 (82,9%) e 5 (12,2%) isolados.

Dentre os genes relacionados com a virulência investigados, as associações mais frequentes foram *plo*, *fimA*, *fimE*, *nanH* e *nanP*; e *plo*, *fimA*, *fimE*, *fimC*, *nanH* e *nanP*, encontrados, respectivamente, em 24,4% e 19,5% dos isolados (Tabela 4). Essas associações de genes ocorreram principalmente em isolados obtidos de mastite bovina (n=9; 50%) e abscessos (n=2; 11,1%).

Tabela 4. Genes associados a virulência em linhagens de *Trueperella pyogenes* isoladas de diferentes afecções em animais domésticos. Botucatu, SP, 2012 - 2015

Genes	Isolados	
	Nº	%
<i>plo, fimA, fimG, fimE, nanH, cbpA</i>	5	12,2
<i>plo, fimA, fimE, fimC, nanH, nanP</i>	8	19,5
<i>fimA, fimE, fimC, nanH, nanP</i>	2	4,8
<i>plo, fimA, fimE, nanH, nanP</i>	10	24,4
<i>plo, fimA, fimE, fimC, nanP</i>	5	12,1
<i>plo, fimA, fimE, fimC, nanH</i>	1	2,5
<i>plo, fimA, fimE, nanP</i>	1	2,5
<i>plo, fimA, fimC, nanP</i>	4	9,7
<i>fimA, nanH, nanP</i>	2	4,8
<i>fimA, fimC, nanP</i>	1	2,5
<i>plo, fimA, fimC</i>	1	2,5
<i>plo, fimC, nanP</i>	1	2,5

Nº = número de isolados

% = porcentagem

Verificou-se no estudo que o gene *plo* foi mais frequentemente encontrado nos isolados, particularmente nas afecções mamárias em vacas, seguido de abscessos e pneumonia. *fimA* foi detectado em alta frequência em mastite e abscesso de bovinos, assim como em afecções do trato reprodutivo (Tabela 5).

Tabela 5. Ocorrência de diferentes afecções em animais domésticos segundo genes associados à virulência de *Trueperella pyogenes*. Botucatu, SP, 2012 - 2015

Afecção	Espécie Animal	<i>Plo</i> (%)	<i>fimA</i> (%)	<i>fimG</i> (%)	<i>fimE</i> (%)	<i>fimC</i> (%)	<i>nanH</i> (%)	<i>nanP</i> (%)	<i>cbpA</i> (%)
Mastite	Bovina	16/18 (88,9)	18/18 (100,0)	2/18 (11,1)	15/18 (83,3)	11/18 (61,1)	12/18 (66,7)	16/18 (88,9)	2/18 (11,1)
	Ovina	1/1 (100,0)	1/1 (100,0)	-	-	1/1 (100,0)	-	-	-
Abscesso	Bovino	4/6 (66,7)	6/6 (100,0)	-	5/6 (83,3)	4/6 (66,7)	5/6 (83,3)	5/6 (83,3)	-
	Caprino	1/1 (100,0)	1/1 (100,0)	-	1/1 (100,0)	1/1 (100,0)	-	1/1 (100,0)	-
	Canino	1/1 (100,0)	1/1 (100,0)	-	-	1/1 (100,0)	-	1/1 (100,0)	-
Trato Reprodutivo	Bovino*	3/4 (75,0)	4/4 (100,0)	1/4 (25,0)	3/4 (75,0)	-	4/4 (100,0)	3/4 (75,0)	1/4 (25,0)
	Equino**	1/1 (100,0)	1/1 (100,0)	-	-	1/1 (100,0)	-	1/1 (100,0)	-
Pneumonia	Bovino	4/4 (100,0)	3/4 (75,0)	1/4 (25,0)	3/4 (75,0)	2/4 (50,0)	2/4 (50,0)	3/4 (75,0)	1/4 (25,0)
Linfadenite	Caprino	3/3 (100,0)	3/3 (100,0)	1/3 (33,3)	3/3 (100,0)	-	3/3 (100,0)	2/3 (66,7)	1/3 (33,3)
Encefalite	Bovino	2/2 (100,0)	2/2 (100,0)	-	2/2 (100,0)	2/2 (100,0)	2/2 (100,0)	2/2 (100,0)	-

*metrite

**orquite

5.6 Análise estatística

Não foi observada associação estatisticamente significativa entre os principais genes investigados associados à virulência do patógeno e as diferentes afecções clínicas ($P=0,97$), particularmente nas mastites ($P=0,95$).

6. DISCUSSÃO

Nas últimas décadas, *T. pyogenes* tem sido descrito como agente causal de várias manifestações clínicas em animais domésticos (KIELSTEIN et al., 1998; GREENE, 2012; RADOSTITS et al., 2007), particularmente nos casos de mastite bovina (RUEGG, 2010). De fato, apesar da maior ocorrência de infecções ligadas a glândula mamária no presente estudo, grande número de outras afecções foram observadas como abscessos, afecções do trato reprodutivo, pneumonia, linfadenite e encefalite, principalmente nas espécies bovina, caprina e ovina. Esses resultados são condizentes com estudos descritos em outros países, que também têm referido as infecções por *T. pyogenes* predominantemente em bovinos, ovinos e caprinos, causando principalmente mastite, abscessos, pneumonia e linfadenite (RADOSTITS et al., 2007; QUINN et al., 2011; ZASTEMPOSKA e LASSA, 2012). Ainda, reforçam o comportamento oportunista do patógeno, provavelmente em razão da presença da bactéria no ambiente, contaminando utensílios e na microbiota de pele e mucosas de animais de produção podendo, potencialmente, infectar qualquer tecido ou órgão em animais susceptíveis (JOST e BILLINGTON, 2005; QUINN et al., 2011).

T. pyogenes é usualmente reportado em infecções abscedantes em bovinos e suínos, embora seja mais comumente identificado, em diferentes países, causando mastite bovina (RUEGG, 2010; ZASTEMPOWSKA e LASSA, 2012). Estudos realizados no Brasil também têm referido *T. pyogenes* em bovinos causando mastite bovina (DOMINGUES et al., 2008; MOTTA et al., 2011) e, secundariamente, linfadenite em caprinos e ovinos (RIBEIRO et al., 2011). Estudo retrospectivo de 145 casos de infecções por *T. pyogenes*, entre 2002 e 2012, na região de Botucatu, SP, revelou que 45,1% dos casos ocorreram em bovinos com mastite, seguido principalmente por linfadenite, pneumonia e abscessos em pequenos ruminantes e outras espécies (RIBEIRO et al., 2015). São conhecidos dois tipos de mastite severa por *T. pyogenes* em vacas denominados mastite piogênica e “mastite de verão”. A mastite piogênica ocorre ocasionalmente, em animais estabulados, enquanto a “mastite de verão” predomina nos meses quentes do ano – em virtude da alta proliferação de moscas - em animais a pasto (RUEGG, 2010), em casos isolados ou em

surtos. No Brasil, surto de mastite bovina foi descrito no interior do estado de São Paulo, de início súbito, após longo período de chuvas em mês quente do ano, caracterizando a “mastite de verão” (MOTTA et al., 2011). A maior ocorrência no presente estudo de casos de mastite, reforça infecções mamárias em vacas por *T. pyogenes* como, aparentemente, a principal afecção em animais domésticos pelo patógeno.

T. pyogenes também têm sido comumente isolado na linfadenite caseosa em ovinos e caprinos no Brasil, apesar da maior ocorrência de *Corynebacterium pseudotuberculosis* (DORNELES et al., 2014). No presente estudo três casos de linfadenite por *T. pyogenes* foram identificados em caprinos. Apesar da menor ocorrência de *T. pyogenes* em casos de linfadenite em pequenos ruminantes, a similaridade das colônias e do aspecto na coloração de Gram (“corineforme”), requer que *T. pyogenes* seja incluído no diagnóstico diferencial da linfadenite em ovinos e caprinos por *Corynebacterium pseudotuberculosis* (RIBEIRO et al., 2011).

Dentre as afecções da esfera reprodutiva observadas nos animais amostrados ocorreu predomínio na espécie bovina de metrite e um caso de orquite em equino, confirmando o estudo de BICALHO et al. (2012) nos EUA, que observaram a participação de *T. pyogenes* em problemas reprodutivos em vacas, principalmente entre a primeira e quarta semanas pós-parto.

Cefalosporinas, penicilinas, tetraciclinas, macrolídeos e derivados beta-lactâmicos são considerados os grupamentos de antimicrobianos de escolha no tratamento de infecção por *T. pyogenes* em animais de produção (RADOSTITS et al., 2007; QUINN et al., 2011). No presente estudo, as linhagens apresentaram maior sensibilidade para florfenicol, azitromicina, tetraciclina, ceftiofur, ampicilina, eritromicina e gentamicina reforçando a eficácia “in vitro” da penicilina e derivados, tetraciclinas e macrolídeos em linhagens de *T. pyogenes* obtidas de animais domésticos.

A elevada efetividade “in vitro” particularmente do florfenicol, pode ser creditada a introdução recente deste antimicrobiano para uso em medicina veterinária (GUIGERE et al., 2010). Em contraste, a maior resistência dos isolados foi observada para lincomicina, neomicina, bacitracina e sulfametoxazole/trimetoprim. Tal resultado poderia ser creditado ao uso à décadas destes fármacos no tratamento de infecções por *T. pyogenes* em

animais domésticos, via parenteral e/ou intramamária, notadamente na profilaxia da mastite da vaca seca, fato que poderia aumentar a pressão de seleção para isolados multirresistentes (RIBEIRO, 2008b).

Na Polônia, estudo recente identificou alta resistência dos isolados de *T. pyogenes* obtidos de mastite para eritromicina (9,1%), enquanto a maior sensibilidade foi observada para penicilina e cefalosporinas (ZASTEMPOWSKA e LASSA, 2012). No Brasil, particularmente na mastite, Giuffrida e Bignard (2011) investigaram o perfil de sensibilidade microbiana “in vitro” em 54 linhagens de *T. pyogenes* obtidas de diferentes afecções em animais domésticos, isoladas na região de Presidente Prudente, SP, com maior sensibilidade dos isolados para ampicilina e gentamicina, e resistência as sulfonamidas, resultado similar ao obtido no presente estudo. Riseti et al. (2013) avaliou, recentemente, o perfil de sensibilidade de 62 isolados de *T. pyogenes* obtidos de casos de mastite em vacas no Brasil. Os antimicrobianos que apresentaram maior efetividade frente às linhagens foram florfenicol, gentamicina, ceftiofur, tetraciclina e ampicilina, enquanto a maior resistência foi observada para sulfametoxaxole/trimetoprim e norfloxacino. O conjunto destes estudos mostra certa tendência de sensibilidade de *T. pyogenes* obtidas no Brasil ao florfenicol, cefalosporinas e aminoglicosídeos, que poderiam ser considerados grupamentos de eleição no tratamento de mastite. Em contraste, a discrepância observada entre a resistência dos isolados para determinados fármacos (ou grupos de antimicrobianos), sinaliza a necessidade da instituição dos tratamentos com o respaldo em testes de sensibilidade microbiana “in vitro”, a fim de aumentar as taxas de cura.

Apesar da sensibilidade “in vitro” de *T. pyogenes* a grande variedade de antimicrobianos, as infecções pelo patógeno usualmente são refratárias ao tratamento “in vivo”, tendo em vista a dificuldade dos fármacos atingirem concentrações terapêuticas nos focos piogênicos (piogranulomas), ou mesmo no interior das células infectadas e fagócitos, em razão da localização intracelular da bactéria, culminando com frequente insucesso nos tratamentos e prognósticos reservados nas diferentes afecções (RIBEIRO et al., 2008b; RISSETI et al., 2013).

A emergência de bactérias multirresistentes tem sido motivo de preocupação crescente, em nível mundial, pelos profissionais de saúde. Assim,

são imprescindíveis estudos continuados sobre o perfil de sensibilidade “in vitro” de bactérias isoladas de animais, visando aumentar as taxas de cura e manter a vigilância epidemiológica para linhagens multirresistentes aos antimicrobianos (GUIGÈRE et al., 2010).

O Índice de Resistência Múltipla aos Antimicrobianos (IRMA) foi idealizado para a avaliação da multirresistência em *Escherichia coli* (KRUPERMAN, 1983). No entanto, posteriormente, tem sido utilizado em outros gêneros bacterianos, incluindo gram-positivos (GIRARDINI et al., 2013). IRMA $\geq 0,3$ são considerados como fonte potencial de transmissão de genes de resistência por certas espécies bacterianas (KRUMPERMAN, 1983). Consideram-se multirresistentes os isolados que apresentem resistência simultânea a três ou mais grupamentos diferentes de antimicrobianos (GIGUÈRE et al., 2010; SCHWARZ et al., 2010). No presente estudo, 13 (31,7%) linhagens de *T. pyogenes* apresentaram IRMA $\geq 0,3$, notadamente isolados obtidos de casos de mastite bovina. A elevada ocorrência de multirresistência nos isolados poderia encontrar justificativa no uso não racional de antimicrobianos no tratamento de afecções em animais pelo patógeno (GUIGUERE, 2010). Particularmente nos casos de mastite, o uso profilático de antimicrobianos na vaca seca poderia contribuir para o aumento da pressão de seleção para linhagens multirresistentes de *T. pyogenes*.

Avaliando os perfis de resistência, os antimicrobianos menos eficazes nos isolados de *T. pyogenes* foram bacitracina, neomicina, lincomicina e sulfametoxazole/trimetoprim. Curiosamente, esses fármacos compõem, à décadas, formulações de anti-mastíticos comercializados no Brasil para o tratamento intramamário da mastite em vacas. Assim, o uso abusivo ou sem o respaldo de testes de sensibilidade microbiana “in vitro” para o tratamento da mastite bovina pode contribuir para a pressão de seleção de bactérias envolvidas na mastite (RIBEIRO, 2008b), incluindo *T. pyogenes*.

Somente duas linhagens de *T. pyogenes* no presente estudo apresentam o mesmo perfil de resistência aos fármacos (eritromicina, enrofloxacino, lincomicina e bacitracina), que poderiam sugerir a transmissão e manutenção de linhagens resistente em mesmo plantel ou região. No entanto, essa hipótese foi descartada devido à origem diferente dos isolados.

A multirresistência nos 41 isolados de *T. pyogenes* a certos antimicrobianos, mostrou certa discrepância entre a resistência dos isolados observada em estudos similares (GIUFRIDA e BIGNARD, 2011; ZASTEMPOWSKA e LASSA, 2012; RISSETI et al., 2013). Esse resultado indica que, idealmente, a escolha dos antimicrobianos para o tratamento do patógeno deveria ser respaldada em testes de sensibilidade microbiana “in vitro”. De fato, o uso responsável dos antimicrobianos para os animais é uma preocupação emergente no conceito de “One Health”, a fim de salvaguardar o uso desses fármacos para abordagens terapêuticas racionais em animais e em humanos (RIBEIRO et al., 2015).

Recentemente, o uso de técnicas moleculares tem possibilitado a detecção de genes associados a virulência de *T. pyogenes* em isolados obtidos de mastite bovina (ZASTEMPOWSKA & LASSA, 2012), metrite bovina (BICALHO et al., 2012) e no sequenciamento da bactéria (MACHADO e BICALHO, 2014),

fimA (97,6%), *plo* (87,9%), *nanP* (82,9%), *fimE* (78,0%), *nanH* (62,3%) e *fimC* (56,0%), foram os genes detectados com mais frequência nos isolados de *T. pyogenes* do presente estudo. Dentre esses genes, as principais associações encontradas foram: *plo*, *fimA*, *fimE*, *nanH* e *nanP* (24,4%) e *plo*, *fimA*, *fimE*, *fimC*, *nanH* e *nanP* (19,5%), particularmente nos isolados obtidos de mastite.

Zastempowska e Lassa (2012), na Polônia, também encontraram maior frequência dos genes *fimA* (100%), *plo* (100%), *fimE* (91%) e *fimC* (88%) em 89 *T. pyogenes* isoladas de mastite bovina, seguido em menor frequência dos genes *nanH* (20,2%), *cbpA* (21%), *nanP* (12,4%) e *fimG* (18%). No mesmo estudo, as principais associações de genes foram encontradas entre *plo*, *fimA*, *fimC* e *fimE* (24,7%) e entre *plo*, *nanH*, *nanP*, *fimA*, *fimC* e *fimE* (13,5%). Esses achados indicam que, aparentemente, a piolisina (*plo*) e os fatores de colonização mediados por fímbrias (*fimA*, *fimC*, *fimE*) e, secundariamente, por neuraminidases (*nanP* e *nanH*), parecem representar os principais fatores associados a virulência de *T. pyogenes* nas infecções da glândula mamária em bovinos.

As fímbrias G e/ou as proteínas ligadas ao colágeno (*cbpA*) foram identificadas em baixa frequência nos animais amostrados e em estudos

similares (ZASTEMPOWSKA e LASSA, 2012; BICALHO et al., 2012) e parecem exercer pouca influência na virulência de *T. pyogenes*, notadamente nos casos de mastite.

Bicalho et al. (2012), nos EUA, identificaram os genes *plo* e *fimA* como mais prevalentes em isolados de *T. pyogenes* obtidos de vacas com metrite entre 1 e 3, 8 e 10 e 34 e 36 dias pós-parto, embora não tenham avaliado as outras fímbrias e neuraminidases investigadas no presente estudo. Nas 41 linhagens do presente estudo, *plo*, *fimA*, *nanH*, *fimE* e *nanP* foram os genes mais prevalentes de *T. pyogenes* nos animais de produção (vacas e égua) com problemas de trato reprodutivo. Tal achado sinaliza que a piolisina (*plo*), a *fimA* e os fatores de colonização ligados às neuraminidases (*nanH* e *nanP*) estejam intimamente relacionados com a metrite em vacas.

Nos abscessos por *T. pyogenes* em bovinos e caprino, orquite em equino, pneumonia em bovinos, linfadenite em caprinos e encefalite em bovinos os principais genes encontrados no presente estudo foram *plo*, *fimA*, *fimC*, *fimE*, *nanH* e *nanP*, seguidos de baixa ocorrência de *fimG* e *cbpA*. Não foram encontrados na literatura consultada, estudos que investigassem esses genes associados a virulência de *T. pyogenes* nas afecções e espécies supracitadas, que possibilitassem confrontar os resultados do presente estudo. No entanto, em linhas gerais, os genes supracitados foram descritos recentemente na mastite e metrite bovina (BICALHO et al., 2012; ZASTEMPOWSKA e LASSA, 2012), indicando a participação também desses genes na patogenicidade de outras afecções piogênicas em animais domésticos.

Ao contrário dos animais de produção, as infecções por *T. pyogenes* são consideradas raras em animais de companhia (BILLINGTON et al., 2002; GREENE, 2012). Recentemente, um caso de encefalite e outro de pneumonia em cães por *T. pyogenes* foram relatados em estudo retrospectivo no Brasil (RIBEIRO et al., 2015). No presente estudo, foram detectados os genes *plo*, *fimA*, *fimC* e *nanP* em um isolado de *T. pyogenes* obtido de abscesso de cão. No entanto, até o momento, os relatos de infecções por *T. pyogenes* em cães e gatos não têm investigado os principais genes associados à virulência do patógeno, limitando confrontar o impacto desses genes na virulência do patógeno descrito no presente estudo, apesar da similaridade da participação

desses genes na mastite e metrite bovina (BICALHO et al., 2012; ZASTEMPOWSKA e LASSA, 2012).

Dentre a literatura consultada, a detecção dos genes *plo*, *fimA*, *fimG*, *fimE*, *fimC*, *nanH*, *nanP* e/ou *cbpA* em abscessos em bovinos, caprino e cão; na orquite equina; pneumonia bovina; linfadenite caprina e encefalite bovina foi descrita pela primeira vez, e poderia ser justificada pelo uso ainda recente das técnicas de biologia molecular na identificação de genes associados a virulência do patógeno em diferentes afecções nos animais domésticos.

7. CONCLUSÕES

- ✓ A maior ocorrência de mastite bovina nos animais amostrados confirma o predomínio das infecções mamárias por *T. pyogenes* na espécie bovina;
- ✓ O isolamento do agente em casos de linfadenite, abscessos, pneumonia, encefalite, endometrite e orquite em bovinos, ovinos, caprinos, equino e cão ratifica o comportamento oportunista de *T. pyogenes* em infecções nos animais domésticos;
- ✓ A alta sensibilidade “in vitro” dos isolados para florfenicol, azitromicina, tetraciclina, ceftiofur, ampicilina, eritromicina e gentamicina indica a eficácia desses antimicrobianos que poderiam ser indicados no tratamento de infecções pelo patógeno;
- ✓ A ocorrência de multirresistência dos isolados, particularmente para lincomicina, bacitracina e sulfametoxazole/trimetoprim, reforça a necessidade da instituição do tratamento nas infecções por *T. pyogenes* com respaldo de testes “in vitro” de sensibilidade, bem como para o uso racional dos antimicrobianos em animais domésticos.
- ✓ A maior ocorrência e associações dos genes *plo*, *fimA*, *fimC*, *fimE*, *nanH* e *nanP*, nos isolados de *T. pyogenes* obtidos de diferentes afecções indicam a participação desses genes na virulência do patógeno, particularmente nos casos de mastite.

8. Referências Bibliográficas*

BICALHO, M.L.S.; MACHADO, V.S.; OIKONOMOU, G.; GILBERT, R.O.; BICALHO, R.C. Association between virulence factors of *Escherichia coli*, *Fusobacterium necrophorum*, and *Arcanobacterium pyogenes* and uterine diseases of dairy cows. *Veterinary Microbiology*, vol. 157, p.125-131, 2012.

BILLINGTON SJ, POST KW, JOST BH. *Isolation of Arcanobacterium (Actinomyces) pyogenes from cases of feline otitis externa and canine cystitis*. *J Vet Diagn Invest*. 14:159162, 2002.

BRAUN, V.; BRAUN, M. Iron transport and signaling in *Escherichia coli*. *FEBS Letters*, v.529, p.78–85, 2002.

CAFFARO, K.A., HUSSINI, A.C., RISSETI, R.M., FRANÇA, D.Q., FRANCO, M.M.J., MACHADO, V.M.V., BELOTTA, A.F., PAES, A.C., LARA, G.H.B., MORAIS, A.B.C., LISTONI, F.J.P., RIBEIRO, M.G. *Deforming mandibular osteomyelitis in a cow caused by Trueperella pyogenes*. *Ciência Rural*, vol. 44, n.11, 2014.

CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute (NCCLS). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. Fifteenth Informational Supplement. CLSI/NCCLS document M100-S15 [ISBN 1-56238-556-9]. 2013.

CORRÊA, W.M.; CORRÊA, C.N.M. *Enfermidades Infeciosas dos Mamíferos Domésticos*. 2.ed. Rio de Janeiro: Medsi. 1992. p.139-142.

COSTA, E.O.; RIBEIRO, A.R.; WATANABE, E.T.; MELVILLE, P.A. Infectious bovine mastitis caused by environmental organisms. *J Vet Med*, vol. 45, p.65-71, 1998.

COSTA, E.O.; RIBEIRO, A.R.; WATANABE, E.T.; SILVA, J.A.B. Mastite por *Arcanobacterium pyogenes*: surto em rebanho de gado de corte. *Revista NAPGAMA*, vol. 1, p. 08-12, 2000.

CURCIO, B.R., GOMES, F.R., MELO, D.M., RAFFI, M.B., RIET-CORREA, F., LADEIRA, S.R. et al. *Isolamento de Arcanobacterium pyogenes de granuloma actinomicóide em bovino*. *Ciencia Rural*, v.32, n.5, p.885-889, 2002.

DOMINGUES, P.F; FERREIRA, B.L.S; GALDINO, M.C.; CARNEIRO, D.M.V.F. Mastite em bezerra por *Arcanobacterium pyogenes* - Relato de Caso. *Vet e Zootec*, vol. 15, n.2, p. 257-262, 2008.

DORNELES, E. M. et al. *Evaluation of ERIC-PCR as Genotyping Method for Corynebacterium pseudotuberculosis Isolates*. *PloS one*, v. 9, n. 6, p. e98758, 2014.

GIUFFRIDA, R.; BIGNARDE, P.C. Perfil de sensibilidade microbiana *in vitro* de linhagens de *Arcanobacterium pyogenes* isoladas de diferentes afecções em bovinos. *Vet e Zootec*, vol.18, n.2, p.222-225, 2011.

GIGUÉRE, S.; PRESCOTT, J.F.; BAGGOT, J.D.; WALKER, R.D.; DOWLING, P.M. *Terapia Antimicrobiana*. São Paulo: Roca LTDA, 2010. p.683.

*Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023: Informação e Documentação (referências). Rio de Janeiro, 2002. 22p.

GIRARDINI L.K.; GRESSLER L.T.; COSTA M.M.; BOTTON S.A.; PELLEGRINI, D.C.P.; VARGAS, A.C. Perfil de suscetibilidade antimicrobiana e presença do gene *vapA* em *Rhodococcus equi* de origem humana, ambiental e equina. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.33, n.6, p.735-740, 2013.

GREENE CE. *Infectious diseases of the dog and cat*. St. Louis: Elsevier; p. 484-485, 2012.

GRIFFITHS, E. Iron and the virulence of *Escherichia coli*. In: SUSSMAN, M. *Escherichia coli: mechanisms of virulence*. United Kingdom: Cambridge University Press, 1997. p.331–371.

JOST, B.H., BILLINGTON, S.J. *Arcanobacterium pyogenes*: molecular pathogenesis of an animal opportunist. *Antonie Van Leeuwenhoek*, vol. 88, n.2, p.87-102, 2005.

KAVITHA K, LATHA R, UDAYASHANKAR C, JAYANTHI K, OUDEACOMAR P. *Three cases of arcanobacterium pyogenes associated soft tissue infection*. *Journal medicine microbiologic*. 59: 736739, 2012.

KIELSTEIN, P. Infecções por *Corynebacterium* sp. In: BEER, J. *Doenças Infecciosas em Animais Domésticos*. São Paulo: Roca. v.2. 1998. p.34-47.

KRUMPERMAN, P.H., 1983. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. *Applied Environ. Microbiol.*, 46: 165-170.

KRUMPERMAN, P.H. *Multiple antibiotic resistance indexing of escherichia coli to identify high-risk sources of fecal contamination of foods*. *Applied environ. Microbiol.*, 46: 165-170, 1983.

LARA GH, RIBEIRO MG, LEITE CQ, PAES AC, GUAZZELLI A, DA SILVA AV, SANTOS AC, LISTONI FJ. *Occurrence of Mycobacterium spp. And other pathogens in lymph nodes of slaughtered Swine and wild boars (sus scrofa)*. *RES VET SCI*. 90:185188, 2011.

LYNCH, M.; O'LEARY, J.; MURNAGHAN, D.; CRYAN, B. *Actinomyces pyogenes* septic arthritis in a diabetic farmer. *J Infect*, vol. 37, n.1, p.71-3, 1998.

MACHADO, V.S., BICALHO, R.C. *Complete genome sequence of Trueperella pyogenes, an important opportunistic pathogen of livestock*. *Journal genome A*, vol. 2, n.2. 2014.

MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.M.C. ORTEGA, and A.I.SUÁREZ. *Comparison of the E-test with broth microdilution for susceptibility testing of coryneform bacteria*. *Journal of Clinical Microbiology*, vol.33, n.5, p.1318-1321, 1995.

MEYER, D.K.; REBOLI, A.C. Other coryneform bacteria and *Rhodococcus*. In: MANDELL, G.L.; BENNETT, J.E.; DOLIN, R. *Principles and Practices of Infectious Diseases*. 6.ed. Philadelphia: Elsevier, 2005. p.2470-2471.

MOTTA, R.G.; RIBEIRO, M.G.; PERROTTI, I.B.M.; DOMINGUES, P.F.; LUCAS, T.M.; ZAMPROGNA, T.O.; LISTONI, F.J.P. Surto de mastite bovina causada por *Arcanobacterium pyogenes*. *Arq Bras Med Vet Zootec*, vol. 63, n.3, p.736-740, 2011.

PLAMONDON, M.; MARTINEZ, G.; RAYNAL, L.; TOUCHETTE, M.; VALIQUETTE, L. A fatal case of *Arcanobacterium pyogenes* endocarditis in a man with no identified animal contact: case report and review of the literature. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, vol. 26, n.9, p.663-666, 2007.

QUINN PJ, MARKEY BK, LEONARD FC, FITZPATRICK ES, FANNING S, HARTIGAN PJ. 2011. *Veterinary microbiology and microbial disease*. UK: Wiley-Blackwell; p. 245257.

QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, F.C. Actinomicetos. In: QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, F.C. *Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas*. Porto Alegre: Artmed, 2005. p.74-82.

QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.; CARTER, G.R. *The Actinomycetes*. In: QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.; CARTER, G.R. *Clinical Veterinary Microbiology*. London: Wolfe, 1994. p.144-155.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; HINCHCLIFF, K.W.; CONSTABLE, P.D. Diseases associated with *Corynebacterium*, *Actinobaculum*, and *Arcanobacterium* species. *Veterinary medicine – A Textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats*. 10.ed. Philadelphia: Saunders, 2007. p.787-788.

RIBEIRO, M.G., RISSETI, R.M., BOLÂNOS, C.A.D., CAFFARO, K.A., MORAIS, A.C.B., LARA, G.H.B., ZAMPROGNA, T.O., PAES, A.C., LISTONI, F.J.P., FRANCO, M.M.J. *Trueprella pyogenes* multispecies infections in domestic animals: a retrospective study of 144 cases (2022 to 2012). *Veterinary Quarterly*, 2015. <http://dx.doi.org/10.1080/01652176.2015.1022667>

RIBEIRO, M.G., BELOTTA, A.F., FERNANDES, M.C., GUENA, R., NARDI JUNIOR, G., LARA, G.H.B., GIUFFRIDA, R., ZAMPROGNA, T.O. *Citologia aspirativa no diagnóstico da linfadenite em ovinos*. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.31, n.10, p.839-843, 2011

RIBEIRO, M.G. Princípios terapêuticos na mastite em animais de produção e de companhia. In: ANDRADE, S.F. (Eds). *Manual de Terapêutica Veterinária*. 3.ed. Roca: São Paulo, 2008b. p.759-771.

RIBEIRO, M.G. *Fatores de virulência em linhagens de Rhodococcus equi isoladas de equinos, suínos e humanos*. Tese (Livre Docência). Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP. 2008a. 66p.

RISSETI, R.M.; LARA, G.H.B.; FRANCO, M.M.J; MORAES, A.B.C.; ZAMPROGNA, T.O; BOLANOS, C.A.D; PAES, A.C.; RIBEIRO, M.G.; LISTONI, F.J.P. Perfil de sensibilidade microbiana “in vitro” em linhagens de *Trueperella (Arcanobacterium) pyogenes* isoladas de mastite em vacas. V Congres. Bras. De Qualidade do Leite, Águas de Lindóia – SP, 2013.

RUEGG PL. *Mastitis in large animals*. In: Kahn CM, editor. The Merck Veterinary Manual. Duluth, GA: Meck & Co., Inc; p. 12481257, 2010.

SCHALM, O.W.; CARROL, E.; JAIN, N.C. *Bovine mastitis*. Philadelphia: Lea e Febiger, 1971. 360 p.

SANTOS, M.V. e FONSECA, I.F.I. Estratégias de controle de mastite e melhoria da qualidade do leite. Barueri, SP: Manole; Pirassununga, SP: Ed. Dos Autores, 2007.

SCHWARZ, S.; SILLEY, P.; SIMJEE, S.; WOODFORD, N.; VAN DUIJKEREN, E.; JOHNSON, A.P.; GAASTRA, W. *Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals*. Veterinary Microbiology, vol. 141, p1-4, 2010.

SUSSMAN, M. *Escherichia coli: Mechanisms of virulence*. United Kingdom: Cambridge University Press, 1997. 639p.

TRIOLA, M.F. *Introdução à Estatística*. 9.ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005. 682p.

YASSIN, A.F.; HUPFER, H.; SIERING, C.; SCHUMANN, P. Comparative chemotaxonomic and phylogenetic studies on the genus *Arcanobacterium* Collins *et al.* 1982 emend. Lehn *et al.* 2006: proposal for *Trueperella* gen. nov. and emended description of the genus *Arcanobacterium*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 61, p.1265-1274, 2011.

ZASTEMPOWSKA, E.; LASSA, H. Genotypic characterization and evaluation of an antibiotic resistance of *Trueperella pyogenes* (*Arcanobacterium pyogenes*) isolated from milk of dairy cows with clinical mastitis. *Veterinary Microbiology*, 2012 (in press).