

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE FARMÁCIA E BIOQUÍMICA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DO LEITE E DERIVADOS**

Thais Cristina de Assis Oliveira

**IDENTIFICAÇÃO DE PATÓGENOS ISOLADOS DE MASTITE BOVINA POR
TESTES BIOQUÍMICOS E MALDI-TOF MS**

Juiz de Fora

2020

Thais Cristina de Assis Oliveira

**IDENTIFICAÇÃO DE PATÓGENOS ISOLADOS DE MASTITE BOVINA POR
TESTES BIOQUÍMICOS E MALDI-TOF MS**

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

Orientadora: Dra. Carla Christine Lange

Juiz de Fora

2020

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

Oliveira, Thais Cristina de Assis.

Identificação de patógenos isolados de mastite bovina por testes bioquímicos e MALDI-TOF MS / Thais Cristina de Assis Oliveira. -- 2020.

80 f. : il.

Orientadora: Carla Christine Lange

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, 2020.

1. Staphylococcus. 2. Streptococcus. 3. Gram-negativas. 4. Mastite bovina. 5. Espectrometria de massa. I. Lange, Carla Christine, orient. II. Título.

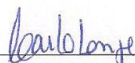
Thais Cristina de Assis Oliveira

**IDENTIFICAÇÃO DE PATÓGENOS ISOLADOS DE MASTITE BOVINA POR
TESTES BIOQUÍMICOS E MALDI-TOF MS**

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

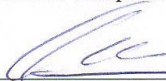
Aprovada em 18 de fevereiro de 2020.

BANCA EXAMINADORA



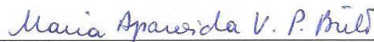
Dra. Carla Christine Lange - Orientadora

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa



Dra. Márcia Giambiagi de Marval

Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ



Dra. Maria Aparecida Vasconcelos Paiva Brito

Pesquisadora aposentada da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa



Dra. Nívea Maria Vicentini

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa

Ao meu pai Marcos (*in memoriam*), por
todo carinho e esforço dedicados a mim.
À minha mãe Marta, meu porto seguro.

AGRADECIMENTO

Primeiramente, agradeço a Deus pelo dom da vida, por me conceder a oportunidade de adquirir o título de Mestre, e à Virgem Maria, por guiar meus caminhos e passar à frente de todos os obstáculos e dificuldades.

À minha mãe Marta, meu agradecimento por todo auxílio e cuidado; meu pai Marcos, por toda preocupação em doar o melhor para nós. Cris, irmã querida, na qual busco exemplo, orientações e confiança; sobrinha Clara, por alegrar nossas vidas com seu sorriso e carinho; Edney, por todo companheirismo e amor; prima Lucilene, pelo carinho; vó Dalmira e madrinha Lúcia, pelas orações.

Agradeço imensamente à orientadora Carla Lange, não somente pelas orientações neste trabalho, mas por todo aprendizado, amizade, carinho, atenção, preocupação e auxílio nos trabalhos executados nos finais de semana e nas viagens realizadas para UFRJ. Saiba que você se tornou uma grande amiga e quero levar essa amizade para toda vida.

Agradeço à Embrapa Gado de Leite, principalmente à equipe do Laboratório de Microbiologia do Leite (Marcos, Cláudia e estagiários), pelos ensinamentos e convivência diária. Às pesquisadoras Dr^a. Maria Aparecida e Dr^a. Carla Lange, pela bolsa de Iniciação Científica, que possibilitou aprendizados incalculáveis em minha caminhada acadêmica e profissional.

À professora Dr^a. Márcia Giambiagi de Marval, pela parceria e acolhimento no Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica para a identificação das amostras por MALDI-TOF MS e também às servidoras Larissa e Amanda, pela assistência e atenção nas análises.

Deixo meus agradecimentos ao Programa de Pós-Graduação pela bolsa concedida nesta reta final do curso, aos professores da Universidade Federal de Juiz de Fora, Embrapa e Epamig, pelos ensinamentos e amigos construídos ao longo desta caminhada.

“Entregue suas obras aos cuidados de Javé, e seus projetos se realizarão”.
(A BÍBLIA, Provérbios 16:3)

RESUMO

A mastite é um processo inflamatório que ocorre na glândula mamária do animal, apresenta caráter etiológico complexo e multifatorial e acarreta grandes prejuízos para a cadeia produtiva do leite. A identificação rotineira de patógenos dela é baseada na avaliação morfológica do microrganismo, seu crescimento em diferentes meios de cultivo e em características bioquímicas do mesmo, que são procedimentos trabalhosos, demorados, e que, em alguns casos, não o diferencia em espécies. Nos últimos anos, houve um grande aumento no uso da técnica de MALDI-TOF MS (Ionização por dessorção a laser assistida por matriz seguida por analisador tipo tempo de voo) em laboratórios de microbiologia. A rapidez dos resultados, a precisão e os baixos custos operacionais de um sistema MALDI-TOF MS permitem análises em uma escala que não era possível até recentemente. O objetivo deste estudo foi avaliar a utilização da técnica de MALDI-TOF MS na identificação de bactérias isoladas de mastite bovina e compará-la aos testes bioquímicos e ao sequenciamento do gene 16S rRNA. Para isso, 380 estirpes bacterianas isoladas de leite de vacas com ou sem sinais de mastite, mantidas na coleção de Microrganismos de Interesse da Agroindústria e Pecuária da Embrapa, foram identificadas pela técnica de MALDI-TOF MS, e os resultados comparados à identificação morfológica e bioquímica ou aos do sequenciamento do gene 16S rRNA. A taxa de identificação por MALDI-TOF MS foi de 99,2%, 95,5% em nível de espécie e de 3,7% de gênero. Ao todo, foram identificados 12 gêneros e 37 espécies de patógenos de mastite bovina por MALDI-TOF MS: 13 espécies do gênero *Staphylococcus*, oito de *Streptococcus*, quatro espécies de *Enterococcus*, duas de *Lactococcus*, uma espécie de *Aerococcus* e nove de bactérias Gram-negativas. Os testes morfológicos e bioquímicos utilizados neste estudo foram apropriados para a identificação em nível de espécie de *Streptococcus agalactiae* e, de gênero, de bactérias Gram-negativas. Os mesmos testes não foram, entretanto, suficientes ou acurados para a identificação de cocos Gram-positivos catalase negativos diferentes de *Streptococcus agalactiae*, nem para a diferenciação entre os gêneros *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Aerococcus* e *Lactococcus*. Os resultados da identificação obtida por MALDI-TOF MS de 193 estirpes de *Staphylococcus* foram comparados com a identificação pelo sequenciamento do gene 16S rRNA, realizada em estudo anterior, e a concordância entre as duas técnicas foi de 93,2%. A técnica

de MALDI-TOF MS mostrou-se adequada para o reconhecimento rápido de um grande número de microrganismos isolados de leite de vacas com mastite, e ideal para ser utilizada na identificação de estirpes depositadas em coleções biológicas.

Palavras-chave: *Staphylococcus*. *Streptococcus*. Bactérias. Gram-negativas. Mastite bovina. Espectrometria de massa.

ABSTRACT

Mastitis is an inflammatory process that occurs in the mammary gland of the animal, has a complex and multifactorial etiological character and causes great damage to the milk production chain. The routine identification of mastitis pathogens is based on the morphological evaluation of the microorganism, its growth on different culture media and its biochemical characteristics, which is laborious, time-consuming, and in some cases do not differentiate microorganisms in species. In recent years there has been a great increase in the use of the MALDI-TOF MS technique (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry) in microbiology laboratories. The speed of the results, the precision and the low operating costs of a MALDI-TOF MS system allow analysis on a scale that was not possible until recently. The aim of this study was to evaluate the use of MALDI-TOF MS in the identification of bacteria isolated from bovine mastitis and to compare it to biochemical tests and 16S rRNA gene sequencing. For this, 380 bacterial strains isolated from milk of cows with or without signs of mastitis, kept into Embrapa's Collection of Microorganisms of Interest to Agroindustry and Livestock, were identified by MALDI-TOF MS and the results compared with them obtained by morphological and biochemical identification and by 16S rRNA sequencing. The identification rate by MALDI-TOF MS was 99.2%, 95.5% at the species level and 3.7% at the gender level. Altogether 12 genera and 37 species of bovine mastitis pathogens were identified by MALDI-TOF MS: 13 species of the genus *Staphylococcus*, eight species of the genus *Streptococcus*, four species of *Enterococcus*, two species of *Lactococcus*, one species of *Aerococcus* and nine species of Gram-negative bacteria. The morphological and biochemical tests used in this study were appropriate for the identification at the species level of *Streptococcus agalactiae* and identification at the genus level of Gram-negative bacteria. The same tests were not, however, sufficient or accurate for the identification of Gram-positive catalase negative cocci other than *Streptococcus agalactiae*, nor for the differentiation between *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Aerococcus* and *Lactococcus* genera. The results of the identification obtained by MALDI-TOF MS from 193 *Staphylococcus* strains were compared with the identification by 16S rRNA gene sequencing, carried out in a previous study, and the agreement between the two techniques was from 93.2%. MALDI-TOF MS proved to be suitable for the rapid

identification of a large number of microorganisms isolated from milk of cows with mastitis, and ideal for use in the identification of strains deposited in biological collections.

Key-words: *Staphylococcus*. *Streptococcus*. Gram-negative. Bacteria. Bovine mastitis. Mass espectrumetry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Princípios da técnica de espectrometria de massa (MALDI-TOF MS).....	32
Quadro 1- Cepas-padrão utilizadas como controles nos testes bioquímicos e na identificação por MALDI-TOF MS.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Comparação dos resultados de identificação de 203 <i>Staphylococcus</i> spp. por sequenciamento do gene 16S rRNA e MALDI-TOF MS	50
Tabela 2- Comparação dos resultados de identificação de 156 cocos Gram-positivos catalase negativos por meio de testes bioquímicos e MALDI-TOF MS.....	54
Tabela 3- Características bioquímicas de 50 estirpes identificadas como <i>S. agalactiae</i> por MALDI-TOF MS.	55
Tabela 4- Características bioquímicas de 17 estirpes identificadas como <i>S. dysgalactiae</i> por MALDI-TOF MS.....	57
Tabela 5- Características bioquímicas de 43 estirpes identificadas como <i>S. uberis</i> e uma estirpe identificada como <i>S. parauberis</i> por MALDI-TOF MS.....	59
Tabela 6- Características bioquímicas de três estirpes identificadas como <i>S. equinus</i> e uma estirpe identificada com <i>S. gallolyticus</i> por MALDI-TOF MS	61
Tabela 7- Características bioquímicas de quatro estirpes identificadas como <i>S. pluranimalium</i> e uma estirpe identificada como <i>S. oralis</i> por MALDI-TOF MS.....	62
Tabela 8- Características bioquímicas de 34 estirpes identificadas nos gêneros <i>Enterococcus</i> , <i>Lactococcus</i> e <i>Aerococcus</i> por MALDI-TOF MS	64
Tabela 9- Resultados da identificação bioquímica e por MALDI-TOF MS de 21 bactérias Gram-negativas isoladas de mastite bovina	67

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AF	Ácido Ferúlico
AS	Ácido Sinápico
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> (Coleção de Culturas Americana)
BHI	Brain Heart Infusion (Infusão de Cérebro e Coração)
°C	Grau Celsius
CAMP	Christie Atkins e Munch-Peterson
CCS	Contagem de Células Somáticas
CHCA	Ácido α Ciano 4 Hidroxicinâmico
CMT	<i>California Mastitis Test</i> (Teste de Mastite da Califórnia)
CTB	Contagem Total de Bactérias
DHB	Ácido 2,5 Dihidroxibenzóico
Da	Daltons
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FTIR	Espectrometria no Infravermelho por Transformada de Fourier
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
H ₂ S	Sulfeto de Hidrogênio
Km	Kilômetro
KOH	Hidróxido de Potássio
Kv	Kilovolt
LIMM	Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica
MALDI-TOF MS	(Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry) Espectrometria de massa com fonte de ionização e dessorção a laser assistida por matriz e analisador de massa do tipo tempo-de-voo.
mL	Mililitro
m/z	Massa/carga
MIN	Minutos
NaCl	Cloreto de Sódio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> (Centro Nacional de Informação biotecnológica)
NMC	<i>National Mastitis Council</i> (Conselho Nacional de Mastite)
O/F	Oxidação/fermentação

Pb	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
SCN	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa
SCP	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva
SEG	Segundos
TOF	Analisador do tempo de Voo
TSI	Tríplice Açúcar-Ferro
VM	Vermelho de Metila
VP	Voges-Proskauer
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromêtro
x g	Força centrífuga

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GERAL.....	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
3 REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1 MASTITE BOVINA.....	19
3.2 PRINCIPAIS PATÓGENOS CAUSADORES DE MASTITE BOVINA.....	21
3.2.1 Gênero <i>Staphylococcus</i>	21
3.2.2 Gênero <i>Streptococcus</i> , Gêneros <i>Enterococcus</i> , <i>Lactococcus</i> e <i>Aerococcus</i>	23
3.2.3 Gêneros <i>Corynebacterium</i> , <i>Trueperella</i> e <i>Mycoplasma</i> spp.....	26
3.2.4 Bactérias Gram-negativas.....	27
3.2.5 Fungos, algas e leveduras.....	29
3.3 IDENTIFICAÇÃO DOS PATÓGENOS DE MASTITE.....	30
3.3.1 Identificação bioquímica.....	30
3.3.2 Identificação por MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry) Espectrometria de massa com fonte de ionização e dessorção a laser assistida por matriz e analisador de massa do tipo tempo-de-voe.....	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 ESTIRPES BACTERIANAS E ESTOQUES DE TRABALHO.....	33
4.2 IDENTIFICAÇÃO DAS ESTIRPES POR TESTES BIOQUÍMICOS.....	36
4.2.1 <i>Staphylococcus</i> spp.....	36
4.2.1.1 Teste da Catalase.....	36
4.2.1.2 Teste da Coagulase em Tubo.....	37
4.2.1.3 Teste de Voges-Proskauer (VP).....	37
4.2.2 <i>Streptococcus</i> spp. e <i>Enterococcus</i> spp.....	37
4.2.2.1 Tipo de Hemólise e Teste de CAMP (Christie, Atkins e Munch-Peterson).....	38
4.2.2.2 Crescimento em Ágar Bile Esculina, Tolerância a 6,5% de NaCl e Hidrólise da Esculina.....	38
4.2.2.3 Hidrólise do Hipurato de Sódio.....	39

4.2.2.4 Utilização de Inulina e Trealose.....	40
4.2.3 Bactérias Gram-negativas.....	40
4.2.3.1 Crescimento em Ágar MacConkey.....	40
4.2.3.2 Teste do Ágar Tríplice Açúcar-Ferro (TSI) e Utilização de Citrato.....	41
4.2.3.3 Teste do Vermelho de Metila (VM) e Teste de Voges-Proskauer (VP).....	42
4.2.3.4 Teste de Oxidação-Fermentação da glicose (O/F).....	42
4.2.3.5 Teste de Motilidade, Teste de Produção de Sulfeto de Hidrogênio e Produção de Indol.....	43
4.3 IDENTIFICAÇÃO DAS ESTIRPES DE <i>STAPHYLOCOCCUS</i> PELO SEQUENCIAMENTO PARCIAL DO GENE 16S Rrna	44
4.4 IDENTIFICAÇÃO DAS ESTIRPES PELA TÉCNICA DE MALDI-TOF MS.....	45
4.4.1 Preparação das amostras bacterianas.....	45
4.4.2 Obtenção dos dados espectrais e interpretação dos resultados.....	46
4.4.3 Procedimento de extração de proteínas com ácido fórmico.....	46
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
5.1 CEPAS-PADRÃO	47
5.2 GÊNERO <i>STAPHYLOCOCCUS</i>	48
5.3 COCOS GRAM-POSITIVOS CATALASE NEGATIVOS.....	52
5.3.1 <i>Streptococcus agalactiae</i> e <i>Streptococcus dysgalactiae</i>.....	55
5.3.2 <i>Streptococcus Uberis</i>.....	57
5.3.3 <i>Streptococcus equinus</i> e <i>Streptococcus gallolyticus</i>.....	60
5.3.4 <i>Streptococcus pluranimalium</i> e <i>Streptococcus oralis</i>.....	61
5.3.5 Gêneros <i>Enterococcus</i>, <i>Lactococcus</i> e <i>Aerococcus</i>.....	63
5.4 BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS	66
5.5 CONSIDERAÇÕES SOBRE OS RESULTADOS DOS TESTES BIOQUÍMICOS E DA TÉCNICA DE MALDI-TOF MS.....	69
6 CONCLUSÃO.....	72
REFERÊNCIAS.....	73

1 INTRODUÇÃO

A mastite é um processo inflamatório que ocorre na glândula mamária do animal, apresenta caráter etiológico complexo e multifatorial que envolve a ação de diversos microrganismos e, uma vez instalada no rebanho, pode trazer sérios prejuízos à produção de leite. Para eliminar os microrganismos do rebanho, é necessário primeiramente identificá-los para posteriormente tomar as medidas de controle ou erradicação. Para isso, existe a identificação rotineira em laboratórios, que é baseada na avaliação morfológica do microrganismo, seu crescimento em diferentes meios de cultivo e em suas características bioquímicas. Porém, esses procedimentos são trabalhosos, demorados e, em alguns casos, não diferenciam os microrganismos em nível de espécies e subespécies.

Para identificar e caracterizar microrganismos de forma mais acurada, existem técnicas de biologia molecular, tais como reação em cadeia da polimerase (PCR) e o sequenciamento do gene do 16S rRNA, que é usado com finalidade taxonômica e filogenética. Embora sejam sensíveis e específicas, e muitas vezes utilizadas como padrão-ouro na identificação de microrganismos, essas técnicas são difíceis de serem adaptadas em laboratórios de diagnóstico, devido ao alto custo dos reagentes e equipamentos e à necessidade de pessoal amplamente qualificado, fazendo com que a aplicação rotineira delas torne-se inviável.

Nos últimos anos, novas técnicas de identificação e classificação de microrganismos têm surgido, com o objetivo de atender aos requisitos de rapidez, baixo custo de reagentes e uma identificação mais detalhada, o que é mais difícil de ser atingido com testes bioquímicos. Novos métodos têm sido pesquisados e utilizados na identificação de microrganismos, tais como a espectroscopia do infravermelho, a espectroscopia Raman e a espectrometria de massas. Artigos científicos recentes descrevem essa última como promissora para a identificação precisa e de baixo custo de microrganismos isolados de diferentes origens.

A espectrometria de massas consiste na ionização de átomos ou moléculas de uma amostra, separação deles em função da sua relação massa/carga (m/z), seguida de identificação e quantificação. A técnica de MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry / Ionização por dessorção a laser assistida por matriz seguida por analisador tipo tempo de voo)

tem sido muito utilizada em laboratórios de microbiologia, no diagnóstico de rotina em laboratórios clínicos, veterinários, farmacêuticos e de análise de alimentos. A rapidez dos resultados, a precisão e os baixos custos operacionais de um sistema MALDI-TOF MS permitem análises em uma escala que não era possível até recentemente.

Assim, o presente trabalho tem como objetivo identificar diferentes patógenos isolados de mastite bovina, utilizando testes bioquímicos tradicionais e a técnica de MALDI-TOF MS, e comparar os resultados obtidos pelas duas técnicas e com o sequenciamento do gene 16S rRNA para o gênero *Staphylococcus*. Os resultados da identificação obtida pela técnica de MALDI-TOF MS serão inseridos em banco de dados da Embrapa e as informações poderão ser utilizadas em estudos posteriores.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho apresenta objetivos geral e específicos, os quais serão descritos a seguir:

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a utilização da técnica de MALDI-TOF MS na identificação de bactérias isoladas de mastite bovina, comparando-a aos testes bioquímicos e ao sequenciamento do gene 16S rRNA.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Identificar espécies de *Staphylococcus* por testes bioquímicos e MALDI-TOF MS e comparar os resultados aos obtidos pelo sequenciamento do gene 16S rRNA.

- ✓ Identificar cocos Gram-positivos catalase negativos e bactérias Gram-negativas por testes bioquímicos e MALDI-TOF MS e comparar os resultados obtidos às duas técnicas.

3 REVISÃO DE LITERATURA

Este trabalho realizou uma revisão de literatura na abordagem da Mastite Bovina; Principais Patógenos Causadores de Mastite Bovina (em Gêneros, Bactérias Gram-Negativas, Fungos, algas e leveduras) e Identificação dos Patógenos de Mastite, descritos a seguir:

3.1 MASTITE BOVINA

Mastite é a inflamação da glândula mamária, cujos principais causadores são os microrganismos, tais como bactérias, consideradas os agentes mais importantes, fungos, leveduras e algas. A resposta inflamatória da glândula mamária tem como objetivo a eliminação do microrganismo causador, a neutralização de toxinas e a regeneração dos tecidos danificados (SANTOS; FONSECA, 2019).

Ao atravessar o canal do teto e colonizar a glândula mamária, os microrganismos se multiplicam no interior dos tecidos, liberando toxinas que são capazes de danificar o tecido glandular e provocar traumatismo físico e químico. Com a permeabilidade vascular alterada, haverá migração de leucócitos do sangue para o leite, para que o agente possa ser eliminado e, dessa forma, os sinais de inflamação evidenciados (ACOSTA *et al.*, 2016; SANTOS; FONSECA, 2019).

A mastite pode ser classificada em dois tipos, de acordo com sua manifestação. A primeira pode ocorrer de forma clínica, em que os sinais de inflamação no úbere são perceptíveis a olho nu, havendo presença de grumos no leite, os quais podem ser detectados por meio do teste da caneca de fundo preto, além de rubor, edema, endurecimento da glândula mamária, dentre outros. Já na manifestação subclínica não é possível visualizar alterações do processo inflamatório. Testes de campo, como o *California Mastitis Test* (CMT), ou laboratorial, como a contagem de células somáticas (CCS), são necessários para identificar a mastite subclínica. Neste tipo de mastite, há aumento de CCS, de proteínas séricas e não existem sinais evidentes da doença, apenas diminuição da produção de proteínas (caseína), lactose e sólidos não gordurosos do leite (ACOSTA *et al.*, 2016).

Além das formas de manifestação clínica e subclínica, a mastite bovina também pode ser classificada em contagiosa ou ambiental, sendo essa primeira ocasionada por microrganismos que colonizam o úbere, se multiplicam na glândula mamária infectada e é transmitida de animal para animal. Já a segunda, causada por microrganismos que se encontram no ambiente onde vivem os animais, capazes de invadir a glândula mamária e gerar respostas inflamatórias (SANTOS; FONSECA, 2019).

Segundo Arcanjo e colaboradores (2017), a mastite contagiosa tem como principal consequência perdas econômicas, uma vez que há diminuição na quantidade e qualidade do leite produzido, necessidade de uso de antibióticos e descarte de animais. Os principais agentes causadores são *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*, que ao colonizar o epitélio elevam a CCS. A apresentação da mastite se dá de forma subclínica, com longa duração e alguns casos clínicos isolados.

A transmissão pode ocorrer entre vacas, entre quartos mamários durante a ordenha, ou ainda pela manipulação do ordenhador, através de equipamentos, panos ou esponja utilizados durante a ordenha. Com isso, melhorias nas práticas de ordenhamento e sanidade do úbere devem ser aplicadas, como fazer uso de desinfetantes de teto antes e após a ordenha (pré e pós-*dipping*); tratar os casos clínicos durante a lactação; utilizar antibioticoterapia na secagem do animal; higienizar e manter adequadamente o funcionamento de equipamentos de ordenha; identificar e descartar animais cronicamente afetados, além de manter um ambiente limpo e seco para os animais (ARCANJO *et al.*, 2017).

Em relação à mastite ambiental, o principal prejuízo em termos econômicos está ligado à ocorrência de casos clínicos, redução na produção leiteira, descarte de leite com resíduos de antibióticos e aos gastos com medicação. Os microrganismos ambientais são *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, leveduras, algas e fungos (LANGONI *et al.*, 2017), que colonizam ambientes com esterco, barro, camas orgânicas e o trato gastrointestinal das vacas. Os casos são de incidência clínica, com curta duração e as manifestações agudas ocorrem, principalmente, nos períodos de pré e pós-parto.

A propagação dos patógenos ocorre no período entre as ordenhas ou quando há problemas em equipamentos. Sendo assim, controlar a exposição dos agentes no meio ambiente e aumentar a resistência do animal por meio de vacinação, alimentação e utilização de antibioticoterapia, contribuem para redução da mastite ambiental nos rebanhos leiteiros (SANTOS; FONSECA, 2019).

3.2 PRINCIPAIS PATÓGENOS CAUSADORES DE MASTITE BOVINA

Os Gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*; *Enterococcus*, *Lactococcus* e *Aerococcus*; *Corynebacterium* e *Trueperella*; *Mycoplasma* spp; Bactérias Gram-negativas; Fungos, algas e leveduras foram identificados como principais patógenos causadores de mastite bovina e serão detalhadamente descritos:

3.2.1 Gênero *Staphylococcus*

As bactérias pertencentes ao gênero *Staphylococcus* são divididas em *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP) e *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN). *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius* e algumas estirpes de *Staphylococcus hyicus* são classificadas como coagulase positivos (NMC, 2004). *Staphylococcus agnetis* é uma espécie coagulase variável isolada de mastite bovina (TAPONEN *et al.*, 2012).

Staphylococcus são cocos Gram-positivos catalase positivos. As colônias de *S. aureus* em ágar sangue são cremosas, branco-acinzentadas ou amarelo douradas, com zona típica de hemólise completa ou incompleta. Os SCN dão origem a colônias grandes, lisas, de cor branca, acinzentada ou amarela. Algumas podem ser rugosas e de aparência irregular, e a maioria não apresenta hemólise (NMC, 2004).

S. aureus é um dos principais agentes responsáveis pela mastite contagiosa. A bactéria está presente na pele do úbere e pode colonizar e se multiplicar rapidamente no canal do teto. Uma vez instalado no quarto mamário, pode acarretar processo inflamatório crônico, com altas contagens de células somáticas no leite, além de infecções subclínicas e casos clínicos, dependendo da patogenicidade. A área lesionada pode se transformar em tecido fibrosado e levar à ineficácia do

tratamento, visto que a fibrose impede a distribuição dos antimicrobianos aplicados, bem como a ação sobre os microrganismos, resultando em sua permanência no animal e no rebanho (NERO; MOREIRA, 2015).

S. aureus também pode provocar mastite gangrenosa, pois é capaz de produzir toxinas que destroem os vasos sanguíneos, o que compromete a irrigação local e resulta em necrose e gangrena do tecido. Esse patógeno também representa risco aos consumidores de leite e derivados, pois pode produzir enterotoxinas que são termoestáveis e se mantêm viáveis após o processamento térmico (NERO; MOREIRA, 2015).

Para diferenciar SCP de SCN, utiliza-se o teste da coagulase em tubo, que consiste na capacidade da coagulase estafilocócica extracelular de coagular o plasma, por meio da transformação do fibrinogênio em fibrina (SANTOS *et al.*, 2016).

Os SCN são classificados como agentes oportunistas da mastite, os quais habitam a pele do teto e, conseqüentemente, podem invadir a glândula mamária e ocasionar infecções. São patógenos secundários, que causam infecções subclínicas e a transmissão entre animais é considerada rara (SANTOS; FONSECA, 2019).

O gênero *Staphylococcus* inclui 54 espécies e 28 subespécies descritas (LPSN, 2020), e grande parte dessas espécies são coagulase negativas. De Visscher *et al.* (2014) sugerem a existência de espécies de SCN associadas ao hospedeiro e de outras ao ambiente. Em estudo conduzido por esses autores em rebanhos leiteiros da Bélgica, *S. chromogenes*, *S. simulans* e *S. xylosus* foram as espécies mais prevalentes isoladas das glândulas mamárias dos animais, enquanto *S. haemolyticus*, *S. sciuri*, *S. cohnii*, *S. fleurettii* e *S. equorum* as mais presentes em amostras do ambiente.

Dentre os SCN, *S. chromogenes* é a espécie que provoca maiores incidências de casos relacionados à mastite bovina nos rebanhos leiteiros, a qual não é hemolítica, está associada a infecções persistentes, altas CCS no leite, pode produzir biofilme e alguns isolados podem coagular o plasma (ISRAEL *et al.*, 2018). A capacidade que algumas estirpes de *S. chromogenes* apresentam de coagular o plasma *in vitro* foi demonstrada em estudo realizado por Santos *et al.* (2016), com estirpes isoladas de rebanhos bubalinos de Minas Gerais.

As espécies *S. epidermidis* e *S. simulans* também são encontradas com maior frequência nas amostras de leite, causam alta CCS no leite, reduzem a produção de leite e ocasionam mastite clínica e subclínica, que pode estar relacionada à falta de higiene no momento da ordenha ou das mãos do manipulador (CHAGAS *et al.*, 2012).

3.2.2 Gênero *Streptococcus*, Gêneros *Enterococcus*, *Lactococcus* e *Aerococcus*

Espécies do gênero *Streptococcus* são cocos Gram-positivos, catalase negativos e anaeróbios facultativos, as quais colonizam a pele e as mucosas e podem ser isolados do trato respiratório, gastrointestinal e genital de várias espécies animais. As *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* e *Streptococcus uberis* estão predominantemente relacionadas a agentes causadores da mastite bovina (NMC, 2004; SANTOS *et al.*, 2007).

Diagnosticar e diferenciar as espécies de *Streptococcus* nos rebanhos leiteiros é importante e necessário, principalmente *S. agalactiae*, pois uma vez diagnosticado, o animal pode ser tratado e o microrganismo erradicado do rebanho. *S. agalactiae* causa mastite contagiosa e está localizado principalmente no interior da glândula mamária. Infecta inicialmente a cisterna e o sistema de ductos da glândula e em alguns casos pode haver a substituição do tecido secretor por fibroso (SANTOS; FONSECA, 2019).

Por apresentar maiores casos de mastite subclínica em que não há sinais clínicos evidentes, as infecções por *S. agalactiae* podem se tornar crônicas, com aumento da CCS, bem como da contagem total de bactérias (CTB) no leite. A disseminação ocorre de forma rápida, facilitada por meio da ordenha, do ambiente e de utensílios e, se diagnosticada rapidamente, perdas de quartos mamários e do próprio animal podem ser evitadas (SANTOS; FONSECA, 2019).

A identificação de *S. agalactiae* por meio de testes bioquímicos se baseia nas características das colônias em ágar sangue; na hemólise; na reação positiva do teste de CAMP (Christie, Atkins e Munch-Peterson) e no resultado negativo da hidrólise da esculina. Aproximadamente 3% das amostras de *S. agalactiae* beta-hemolíticas podem apresentar resultado negativo no teste de CAMP. Nesse caso,

testes sorológicos devem ser realizados para verificar se pertencem ao grupo B de Lancefield e posteriormente classificá-las como *S. agalactiae* (BRITO; BRITO, 1999).

A espécie *Streptococcus dysgalactiae* foi dividida em duas subespécies, *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* e *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*. A primeira se comporta como agente ambiental e contagioso, apresenta efetividade por longo período no local, é responsável por infecções intramamárias, está presente no úbere infectado, no ambiente e também é capaz de sobreviver na boca, vagina e pele de animais saudáveis, em camas e pastagens. Além disso, a presença do patógeno no úbere pode ocasionar mastite persistente, sem especificidade de sinais, somente alterações no leite, febre e inflamação do úbere por alguns animais (LANGONI *et al.*, 2017).

Quanto *S. dysgalactiae* subsp. *Equisimilis*, infecta suínos e equinos, pode ocasionar mastite em bovinos, porém com menor frequência e faz parte dos grupos A, C e G de Lancefield e é beta-hemolítico (SANTOS *et al.*, 2007).

A identificação da espécie *S. dysgalactiae* se dá por meio da reação negativa no teste de CAMP, se enquadram no grupo C ou L de Lancefield, podem ser alfa-hemolíticos ou não hemolíticos e não hidrolisam esculina e hipurato de sódio.

Outro grupo de *Streptococcus* presente no ambiente possui a capacidade de hidrolisar a esculina e, com isso, são classificados como estreptococos esculina positivos e incluem: *S. uberis*, *S. equinus*, *S. saccharolyticus* e o gênero *Enterococcus* (BRITO; BRITO, 1999; SANTOS *et al.*, 2007).

Classificado como agente ambiental e contagioso, *S. uberis* está presente no solo, esterco, pele, glândula mamária e área genital e oral de vacas leiteiras. A transmissão pode ocorrer de um animal para outro, bem como durante a ordenha, por meio de utensílios e manipulação do ordenhador. Os casos podem ocorrer na forma clínica ou subclínica, o agente pode ser isolado de vacas lactantes ou não e, pelo fato de apresentar dupla via de transmissão, a infecção pode perdurar, levando a perdas econômicas e árdua eliminação do rebanho (LANGONI *et al.*, 2017).

Streptococcus equinus é uma das espécies pertencentes ao grupo *Streptococcus bovis*. A taxonomia desse grupo sofreu diversas modificações nas últimas duas décadas, devido ao advento de métodos de identificação com maior poder de discriminação, e o sistema de classificação atual não é universalmente adotado pela comunidade científica. Assim, atualmente inclui-se sete divisões no

grupo de *Streptococcus* D: *S. equinus*, *S. infantarius* subsp. *coli* (biotipo II/1 ou *S. lutetiensis*), *S. infantarius* subsp. *infantarius* (biotipo II/1), *S. alactolyticus*, *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (biotipo I), *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* (biotipo II/2) e *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus* (SPELLERBERG; BRANDT, 2011; DEKKER; LAU, 2016). Neste trabalho, será utilizada a nomenclatura *S. equinus*, adotada pelo *National Mastitis Council* (NMC, 2004).

Considerado como um recente integrante do gênero *Streptococcus*, *Streptococcus pluranimalium* pode ser isolado de múltiplos hospedeiros. Em animais, tem poder de causar mastite subclínica e doenças reprodutivas em bovinos, tais como aborto, vulvite, vaginite e metrite. Essa espécie também pode ocasionar endocardite valvar e septicemia em animais, além de endocardite infecciosa humana e abscesso cerebral. Entretanto, as propriedades biológicas e os mecanismos utilizados por esse patógeno ainda são desconhecidos (PAN *et al.*, 2018).

Enterococcus são cocos Gram-positivos, catalase negativos e anaeróbios facultativos, cuja origem se deu a partir da reclassificação de *Streptococcus faecalis* e *Streptococcus faecium* e que são microrganismos comensais e oportunistas que podem causar infecções no homem. Eles estão presentes no solo, água, plantas, alimentos, animais e insetos, uma vez que suas características intrínsecas permitem seu crescimento e sobrevivência em ambientes desfavoráveis, além disso, produzem hemolisinas e citotoxinas, que podem lisar eritrócitos do homem, coelhos e cavalos. A disseminação do patógeno entre os animais pode ocorrer através da contaminação da glândula mamária no intervalo entre as ordenhas ou durante o período seco. Esses patógenos também apresentam maior resistência aos antimicrobianos se comparados às espécies do gênero *Streptococcus* (SANTOS *et al.*, 2007).

Espécies de *Lactococcus* são cocos Gram-positivos catalase-negativos. Doenças oportunistas relacionadas ao gênero *Lactococcus* eram pouco reportadas, mas atualmente, *L. garvieae* e *L. lactis* são considerados patógenos emergentes que causam mastite bovina, infecções em humanos, peixes e aves. Estudos anteriores isolaram algumas espécies de *L. garvieae*, *L. lactis* subsp. *lactis* e *L. raffinolactis* de amostras de vacas que apresentavam alta CCS. Estirpes de *L. lactis* têm sido utilizadas como fermento na indústria de fabricação de queijos e leites fermentados (SANTOS *et al.*, 2007; PLUMED-FERRER *et al.*, 2013).

Espécies do gênero *Aerococcus* também são cocos Gram-positivos, catalase negativos, podem se apresentar isolados ou em grupos, são anaeróbios facultativos e habitam o trato urinário do ser humano. Inicialmente, foi descrita a espécie *A. viridans*, mais tarde, quatro novas espécies foram identificadas: *A. urinae*, *A. christensenii*, *A. sanguicola* e *A. urinaehominis*.

A. viridans já foi isolado de leite de vacas com mastite subclínica, porém estudos ainda não comprovaram sua implicação na mastite bovina, na alteração da contagem de células somáticas (CCS) e na composição do leite (SUN *et al.*, 2017).

3.2.3 Gêneros *Corynebacterium*, *Trueperella* e *Mycoplasma spp.*

Os microrganismos que pertencem ao gênero *Corynebacterium* são classificados em aeróbios ou anaeróbios facultativos, Gram-positivos e apresentam formas irregulares. O *Corynebacterium bovis* é frequentemente encontrado no leite de vacas com infecção intramamária, é considerado um causador de mastite contagiosa, promove o aumento moderado da CCS e diminuição na produção de leite. Embora altamente contagioso, é de baixa patogenicidade, e os casos são quase sempre subclínicos e leves, o que determina a sua classificação como patógeno secundário. Outras espécies de *Corynebacterium* como *C. amycolatum*, *C. minutissimum*, *C. pseudotuberculosis* e *C. ulcerans* podem ser isoladas de vacas com mastite clínica e subclínica (NMC, 2004; SANTOS; FONSECA, 2019).

A bactéria *Trueperella pyogenes*, há alguns anos denominada de *Arcanobacterium pyogenes*, apresenta forma de bastonete, é Gram-positiva e coloniza a superfície mucosa da cavidade oral, nasofaringe, sistema urogenital e trato gastrointestinal dos animais. Quando presente em bovinos, caprinos e ovinos pode causar mastite crônica ou aguda, pneumonia supurativa, abscessos nos tecidos, infecções umbilicais e em ferimentos (GARINO JR *et al.*, 2012).

A mastite bovina ocasionada por *T. pyogenes* ocorre principalmente no período seco e em menor frequência nas vacas em lactação. É classificada como mastite de verão, pois as moscas são veículos de transmissão para as vacas nos períodos do ano em que as temperaturas e a pluviosidade estão altas. A disseminação do microrganismo ocorre por meio de moscas que pousam em tetos e úberes feridos, além de objetos perfurocortantes e equipamentos de ordenha

contaminados. A manifestação da infecção por *T. pyogenes* se dá por meio de edemas, formação de nódulos, abscessos nas mamas, presença de pus no leite e, em casos mais severos, febre, agalaxia e anorexia também podem ocorrer (MOTTA *et al.*, 2011).

Mycoplasma spp. é um patógeno altamente contagioso que pode causar mastite, pneumonia, artrite e é resistente a antibióticos. Apresenta rápida transmissão entre os rebanhos, queda na produção de leite e são raros os sinais sistêmicos de infecção originados pelo patógeno. Há duas espécies mais conhecidas que causam mastite bovina, são elas: *Mycoplasma bovis* e *Mycoplasma californicum*, sendo *M. bovis* causador de mastite em todo o mundo. Animais contaminados por esse patógeno, inicialmente desenvolvem mastite clínica, que se não tratada pode evoluir para sua forma crônica. A transmissão da bactéria ocorre principalmente durante a ordenha, em ambientes sem higiene adequada e através do contato entre animais. Como controle da doença, a entrada de animais no rebanho deve ser limitada e aqueles com resultados positivos para o patógeno, separados e descartados do rebanho. Todavia, no Brasil ainda se sabe pouco sobre a prevalência de casos da doença, com isso é relevante que mais estudos sejam realizados (MANZI *et al.*, 2018; SÁ *et al.*, 2018).

3.2.4 Bactérias Gram-negativas

As bactérias Gram-negativas podem causar mastite bovina ambiental, apresentam morfologia de bastonetes ou coco-bacilos e formam colônias lisas e bem desenvolvidas em ágar sangue. Os coliformes são representados pelas espécies *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter aerogenes*. Outras bactérias Gram-negativas que causam mastite incluem os gêneros *Serratia*, *Pseudomonas*, *Proteus* e *Pasteurella* (BRITO; BRITO, 1999; NMC, 2004).

Os coliformes são agentes oportunistas, pertencem ao grupo das bactérias causadoras de mastite ambiental, causam sinais clínicos de mastite, principalmente no período seco ou nas duas primeiras semanas que antecedem a lactação (SANTOS; FONSECA, 2019).

As bactérias Gram-negativas têm lipopolissacarídeos na camada externa da parede celular, que, também denominados endotoxinas, quando são liberadas

provocam mudanças na permeabilidade vascular e causam sinais clínicos de mastite (RIBEIRO *et al.*, 2008). O animal infectado pode apresentar febre, perda de peso, diminuição na produção de leite, secreção láctea com aspecto aquoso e inchaço nos quartos mamários. Havendo disseminação do patógeno para a circulação sistêmica, é possível que ocorra bacteremia e/ou septicemia (RIBEIRO *et al.*, 2008; SANTOS; FONSECA, 2019).

A mastite por bactérias Gram-negativas é mais prevalente em vacas com baixa CCS (menor que 150.000 células/mL), sem infecção mediada por outros microrganismos. A infecção se inicia por meio da propagação do microrganismo na glândula mamária, através do canal do teto, durante as ordenhas, e pelo contato dos tetos com o ambiente, fezes, água ou serragem. Além disso, destaca-se que a transmissão não se dá de um animal para o outro (RIBEIRO *et al.*, 2008; SANTOS; FONSECA, 2019).

Os gêneros *Klebsiella* e *Enterobacter* estão presentes no solo, água, no trato intestinal de animais e, assim como *Escherichia coli*, habitantes do trato gastrointestinal daqueles de sangue quente (RIBEIRO *et al.*, 2006).

A mastite ocasionada por *E. coli* pode se manifestar de forma aguda ou hiperaguda no início da lactação e se não tratada, causar a morte do animal. Casos de mastite subclínica têm ocorrido em rebanhos em que há controle da mastite contagiosa, tanto no período de lactação quanto no seco. Salienta-se ainda que o fornecimento de minerais para os animais e a vacinação são medidas de controle para o rebanho (SÁ *et al.*, 2018).

Quanto *Pseudomonas* spp., são bacilos Gram-negativos, aeróbios, oxidase positivos e catalase negativos, presentes no ambiente. A água contaminada é a principal via de transmissão do agente para a glândula mamária, pois é utilizada para lavar os tetos dos animais, os insufladores (teteiras), utensílios e o alojamento. A mastite ocasionada por esse patógeno ocorre de forma aguda, podendo levar o animal à morte (SÁ *et al.*, 2018).

Apesar de não serem frequentes os casos de mastite bovina ocasionados por *Pasteurella multocida*, quando acometidos, os animais podem apresentar sinais clínicos graves, agudos ou hiperagudos, evoluindo para ausência de leite nos quartos mamários, fibrose e atrofia do parênquima. Os sinais sistêmicos são febre, taquicardia, respiração dificultada, grumos e aspecto aquoso do leite, e o principal

veículo de infecção das vacas se dá por meio da microbiota da orofaringe de bezerros via ascendente, pelo ducto do teto, durante a amamentação e também pelo canal do teto, utilizando materiais contaminados durante as ordenhas (RIBEIRO *et al.*, 2010).

Quando isoladas em ágar sangue, as colônias de *Serratia*, *Pseudomonas* e *Proteus* apresentam características distintas das espécies de coliformes. Colônias de *Serratia marcescens* incubadas a 37°C em ágar sangue possuem diâmetro de 2 a 3 milímetros, coloração cinza para amarelo, e se assemelham às colônias de *Staphylococcus*. Por sua vez, as *Pseudomonas* spp. produzem colônias brancas ou cinzas, com bordas irregulares, são geralmente hemolíticas e com odor característico. Já as colônias de *Proteus* são acinzentadas, têm odor fétido similar ao das colônias de *Pasteurella*, que são cinzas e mucoides (NMC, 2004).

3.2.5 Fungos, algas e leveduras

Microrganismos como fungos, algas e leveduras são capazes de ocasionar mastite bovina e, em alguns casos, a doença pode ser severa e não responder ao tratamento (BRITO; BRITO, 1999). Embora estejam por toda parte na natureza, os fungos filamentosos são raramente isolados de mastite, já as leveduras são isoladas de infecções intramamárias com maior frequência, conforme salientado por Spanamberg *et al.* (2009).

Já *Prototheca* sp., destaca-se como algas unicelulares, aclorofiladas, que causam infecções na glândula mamária do bovino e, quando presentes no úbere, contribuem para o aumento da CCS e para a diminuição da produção leiteira. As alterações teciduais são características de mastite crônica granulomatosa e pode se manifestar sob forma de surtos, de casos isolados ou ainda de forma clínica e subclínica, aguda ou crônica, sendo a crônica a mais frequente e originada pela espécie *P. zopfii*. Quando o animal não responde ao tratamento com antibioticoterapia, a secagem dos quartos mamários infectados e/ou descarte do animal, são medidas mais adotadas pelos produtores. Nesse sentido, Gasparotto *et al.* (2015) abordam que a falta de higiene dos tetos na pré-ordenha, a permanência dos animais em locais úmidos e com barro, contribuem para a disseminação desses microrganismos unicelulares nos rebanhos.

3.3 IDENTIFICAÇÃO DOS PATÓGENOS DE MASTITE

Os patógenos de mastite salientados foram identificados através dos testes de Identificação bioquímica e Identificação por MALDI-TOF MS:

3.3.1 Identificação bioquímica

A identificação bioquímica consiste na confirmação das transformações químicas que ocorrem num substrato por meio da ação do microrganismo e é utilizada para auxiliar na identificação dos gêneros e espécies microbianas. Cada microrganismo produz alterações nos meios em que se desenvolve, em virtude das atividades metabólicas, e essas ações são devido à atuação enzimática ocasionada pelos microrganismos. Todo microrganismo apresenta sistema enzimático específico (perfil bioquímico), que resulta em propriedades bioquímicas diversas e úteis na prática para sua caracterização. Essas se baseiam em fenômenos como a utilização de fontes de carbono, carboidratos, alcoóis, glicosídeos e também de nitrogênio, entre eles peptídeos, aminoácidos e outras substâncias nitrogenadas. De acordo com Ribeiro e Soares (1998), a identificação de determinado microrganismo consiste na comparação das características bioquímicas desse desconhecido com as apresentadas por um microrganismo já descrito.

3.3.2 Identificação por MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry) Espectrometria de massa com fonte de ionização e dessorção a laser assistida por matriz e analisador de massa do tipo tempo-de-voo

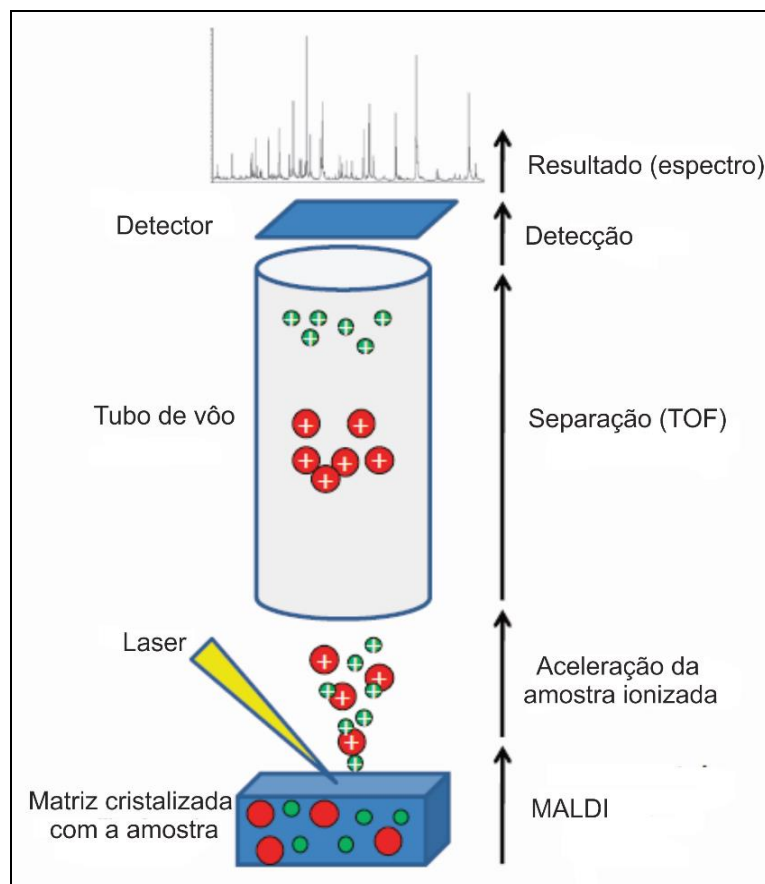
A espectrometria de massa é uma técnica analítica que possibilita a identificação de microrganismos, como bactérias, fungos e actinomicetos, por exemplo. Sua utilização nessa função teve início nos anos de 1970, mas o grande desenvolvimento se deu em 1987, por meio do químico Coichi Tanaka, que foi capaz de ionizar grandes moléculas por laser, utilizando uma matriz composta por cobalto e glicerol (JÚNIOR *et al*, 2014).

O espectrômetro de massa é constituído por três partes principais: fontes de íons, um ou mais analisadores de massa e detector. A primeira atua na ionização das moléculas, transformando as neutras em íons; já a segunda parte, por sua vez, é responsável por separá-los de acordo com a relação massa/carga (m/z), por meio de campos elétricos e magnéticos, e, por fim, o detector capta os íons que chegam dos analisadores de massa, amplifica-os e gera correntes elétricas, que são inseridas em um *software* e, posteriormente, transformadas em espectro de massa (SOUZA, 2008).

O princípio da técnica de MALDI-TOF pode ser caracterizado da seguinte maneira: íons com carga e massas diferentes, quando submetidos a um campo elétrico se movimentam e a distância percorrida em determinado tempo representa a relação massa/carga (m/z). Inicialmente, a amostra é misturada com a matriz em uma placa metálica, seguida da evaporação dos solventes e da cristalização da matriz com a amostra que posteriormente é inserida no espectrômetro de massa. Cada amostra é irradiada por feixe de laser UV- representado por determinado comprimento de onda- a matriz absorve a energia proveniente dele e ocorre a vaporização da amostra e formação de íons com diferentes massas. Aqueles com carga positiva movimentam-se sob ação do campo elétrico, atravessam a grade de extração, passam pelo tubo de voo até atingir o detector, sendo que os íons menores chegam primeiro a ele. O tempo de voo gasto por cada partícula até o detector é utilizado para calcular a massa. Conforme Carbonnelle; Nassif (2011), a soma dos íons forma o espectro de massa, o eixo das abscissas representa a relação massa/carga, e o das ordenadas corresponde à intensidade do sinal, que está relacionado à quantidade de íons de mesma massa/carga.

O princípio da técnica está ilustrado na Figura 1 e foi apresentado por Croxatto, Prod'hom, Greub (2012).

Figura 1. Princípios da técnica de espectrometria de massa (MALDI-TOF MS)



Fonte: Croxatto, Prod'hom, Greub (2012).

A ionização consiste na transformação físico-química de um átomo ou molécula em íons, por meio da adição ou remoção de cargas. É um processo essencial para a espectrometria de massa, pois possui a capacidade de produzir íons, transportar para dentro do espectrômetro e conduzir até o detector. Quando o íon é produzido, apresenta carga positiva, o elétron ligado ao átomo ou molécula gera energia suficiente para se desligar do núcleo, rompe a barreira elétrica e é lançado para a eletrosfera. Já o íon com carga negativa é formado quando o elétron livre se choca com o átomo, o qual, então, é capturado e armazenado no interior do potencial elétrico (BARREIRO, 2015).

A amostra utilizada na ionização por MALDI (Ionização por dessorção a laser assistida por matriz) deve ser misturada a uma matriz específica, que propicia a absorção da energia do laser e a formação de íons com massas diferentes. As matrizes mais utilizadas são o ácido 2,5-dihidroxibenzóico (DHB); α -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA); ácido sinápico (AS); ácido ferúlico (AF) e o ácido 2,4-

hidroxifenilbenzoíco, sendo AS, AF e CHCA as mais eficazes para identificação de proteínas, conforme descrito por Croxatto, Prod`Hom, Greub (2012).

No analisador do tempo de voo (TOF), íons com cargas iguais apresentam energia cinéticas iguais e são inversamente proporcionais à raiz quadrada da massa. No entanto, se dois íons de cargas iguais e massas diferentes aceleram no campo elétrico com potencial constante, as velocidades serão dependentes das massas e, com isso, chegarão ao detector em tempos de voo diferentes. A esse respeito, Souza (2008) ressalta que os íons de menores massas chegarão primeiro ao detector, enquanto os de maiores levarão mais tempo.

Na espectrometria de massa, o detector identifica os íons que chegam, transforma-os em sinais elétricos que podem ser armazenados e convertidos em espectros gerados por amostra. Ao analisar os picos compreendidos entre 2.000 e 20.000 (m/z), as proteínas ribossomais são colocadas em evidência e um *software* realiza a comparação do espectro obtido com um banco de dados que contém espectros de cepas de referência (SOUZA, 2008).

Conforme aborda Murray (2012), por apresentar alta evolução nos resultados, essa tecnologia tem sido aplicada no diagnóstico de rotina em laboratórios clínicos, veterinários, farmacêuticos e de análise de alimentos, pois é altamente específica, pode identificar bactérias que são difíceis de cultivar, apresenta baixos custos operacionais e rapidez nos resultados de identificação.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Utilizou-se como material estirpes bacterianas (retiradas da coleção de microorganismos da Embrapa e, posteriormente, replicadas e estocadas para este estudo) e realizou-se o isolamento, testes bioquímicos, sequenciamento e identificação por MALDI-TOF MS.

4.1 ESTIRPES BACTERIANAS E ESTOQUES DE TRABALHO

O experimento foi realizado com 380 estirpes bacterianas isoladas de amostras de leite, obtidas de quartos mamários de vacas com ou sem sinais de mastite, de rebanhos leiteiros das regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do país,

entre os anos de 1994 e 2018. Tais estirpes fazem parte da Coleção de Microrganismos de Interesse da Agroindústria e Pecuária, da Embrapa Gado de Leite, sediada em Juiz de Fora, Minas Gerais.

O isolamento das estirpes inseridas na Coleção foi feito em ágar sangue (Ágar Soja Tripticaseína, TSA, Oxoid, Basingstoke, Hants, Reino Unido, adicionado de 5% de sangue desfibrinado de carneiro), em seguida, realizaram-se esfregaços que foram corados pelo método de Gram, para verificar a morfologia e coloração do microrganismo, e cocos Gram-positivos, diferenciados pelo teste da catalase. Posteriormente, estirpes cocos Gram-positivos catalase positivos foram classificadas no gênero *Staphylococcus* e cocos Gram-positivos catalase negativos, nos gêneros *Streptococcus* e *Enterococcus*.

A partir dos estoques da Coleção, disponibilizados para este estudo pelo Curador da Coleção, foram preparados estoques de trabalho em 1 mL de leite desnatado (Skim Milk, Difco, Sparks, MD, EUA) com glicerol a 10% (Cromoline, Diadema, SP, Brasil) em microtubos e acondicionados em freezer com temperatura de -20°C para as análises posteriores. O material, ainda congelado, foi coletado do tubo da Coleção com o auxílio de uma alça de inoculação e inoculado em Ágar BHI (Himedia, Mumbai, Índia). Após o cultivo a 35°C por 18-24 horas (ou mais, quando necessário), a amostra foi examinada quanto à pureza, e todo o crescimento bacteriano, coletado com um suabe estéril e transferido para o meio de cultura de congelamento (leite desnatado com glicerol). Em seguida, as amostras foram acondicionadas a -20°C.

Para controle dos testes bioquímicos e da identificação por MALDI-TOF MS foram utilizadas cepas-padrão, apresentadas no Quadro 1.

Quadro 1- Cepas-padrão utilizadas como controles nos testes bioquímicos e na identificação por MALDI-TOF MS.

Identificação	
N°	Bactérias Gram-positivas
1	<i>Arcanobacterium pyogenes</i> ATCC 49698 (Nome atual: <i>Trueperella pyogenes</i>)
2	<i>Corynebacterium fimi</i> NCTC 7547 ^T (Nome atual: <i>Cellulomonas fimi</i>)
3	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212
4	<i>Lactococcus lactis</i> Apg 1201
5	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 11117
6	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 51651
7	<i>Staphylococcus capitis</i> ATCC 35661
8	<i>Staphylococcus carnosus</i> TM 300
9	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228
10	<i>Staphylococcus gallinarum</i> ATCC 700401
11	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> ATCC 29970 ^T
12	<i>Staphylococcus hyicus</i> ATCC 11249 ^T
13	<i>Staphylococcus intermedius</i> ATCC 29663 ^T
14	<i>Staphylococcus lentus</i> ATCC 700403
15	<i>Staphylococcus lugdunensis</i> ATCC 49576
16	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> ATCC 15305 ^T
17	<i>Staphylococcus sciuri</i> ATCC 29061
18	<i>Staphylococcus simulans</i> ATCC 27851
19	<i>Staphylococcus warneri</i> ATCC 49454
20	<i>Staphylococcus xylosus</i> ATCC 29971 ^T
21	<i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC 12386
22	<i>Streptococcus bovis</i> ATCC 33317 ^T
23	<i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i> ATCC 12388 ^T
24	<i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>equi</i> ATCC 33398 ^T
25	<i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> ATCC 43079 ^T
26	<i>Streptococcus gallolyticus</i> ATCC 49147
27	<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 12384
28	<i>Streptococcus uberis</i> ATCC 700407
Bactérias Gram-negativas	
29	<i>Enterobacter sakazakii</i> CDC 7006 (Nome atual: <i>Cronobacter sakazakii</i>)
30	<i>Enterobacter cloacae</i> CDC 3430
31	<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229
32	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883 ^T
33	<i>Salmonella</i> Braenderup ATCC BAA-664
34	<i>Salmonella</i> Typhi IAL 1251
35	<i>Salmonella</i> Typhimurium IAL 1412

Fonte: Elaborada pela autora (2020).

4.2 IDENTIFICAÇÃO DAS ESTIRPES POR TESTES BIOQUÍMICOS

Através de testes bioquímicos foram identificados os gêneros *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. e *Enterococcus* spp. e Bactérias Gram-negativas.

4.2.1 *Staphylococcus* spp.

As estirpes de *Staphylococcus* foram recuperadas em Ágar BHI e incubadas em estufa bacteriológica a 35°C por 24 horas. Utilizou-se 203 estirpes de *Staphylococcus*, já identificadas pelo sequenciamento parcial do gene 16S rRNA em estudo anterior (LANGE *et al.*, 2015). A seguir, serão descritos os testes que foram utilizados para a identificação primária dos *Staphylococcus*, identificados como *S. aureus*, SCP ou SCN.

Os testes descritos abaixo classificam os estafilococos em coagulase positivos (SCP) ou coagulase negativos (SCN) e identificam, presuntivamente, a espécie *S. aureus*, normalmente coagulase e VP positiva. Em virtude da dificuldade de identificação das outras espécies de *Staphylococcus* por meio de testes bioquímicos, serão utilizadas estirpes de *Staphylococcus* já identificadas pelo sequenciamento do gene 16S rRNA.

4.2.1.1 Teste da Catalase

O peróxido de hidrogênio (H₂O₂) é utilizado para detectar a produção da catalase bacteriana. Uma colônia bacteriana foi transferida para uma lâmina de vidro limpa e sobre ela foi adicionada uma gota do peróxido de hidrogênio. O borbulhamento imediato indica uma reação positiva (ATLAS; SNYDER, 2011). Como controle positivo, foi utilizada a cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 51651 e como negativo, a *Streptococcus agalactiae* ATCC 12386.

4.2.1.2 Teste da Coagulase em Tubo

O plasma de coelho desidratado (Coagu-Plasma, Laborclin, Pinhais, Paraná) foi utilizado para detectar a coagulase produzida pelas espécies de *Staphylococcus*. Para esse teste, 0,5 mL do plasma desse animal reidratado foram adicionados a um tubo estéril e, com auxílio de uma alça também estéril, uma colônia do microrganismo foi inoculada no plasma. O tubo foi incubado a 35° C por 24 horas. As observações sobre coagulação devem ser feitas dentro das primeiras quatro horas, pois os estafilococos produzem fibrolisina, que pode dissolver o coágulo. Caso não haja coagulação nesse período, o tubo deve ser incubado novamente e a coagulação observada após 24 horas de incubação (ATLAS; SNYDER, 2011). Como controle positivo, foi utilizada a cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 51651 e como negativo, a *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.

4.2.1.3 Teste de Voges-Proskauer (VP)

Esse teste é utilizado para determinar a habilidade do microrganismo em produzir um composto neutro, o acetilmetilcarbinol (acetoína), a partir da fermentação da glicose. A bactéria foi incubada a 35°C por um período de dois a cinco dias. Para fazer a leitura, foram retirados 2,5 mL do meio e a esse volume, adicionado 0,6 mL da solução alfa-naftol a 5% e 0,2 mL de KOH a 40%. Os tubos foram agitados suavemente para misturar o alfa-naftol ao KOH e para o oxigênio atmosférico penetrar e oxidar a acetoína em diacetila. Uma coloração rosa a vermelho indica resultado positivo, e a cobre, negativo (RIBEIRO; SOARES, 1998). Como controle positivo foi utilizada a cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 51651 e como negativo, a *Staphylococcus hyicus* ATCC 11249.

4.2.2 *Streptococcus* spp. e *Enterococcus* spp.

As estirpes dos gêneros *Streptococcus* e *Enterococcus* foram recuperadas em Ágar BHI e incubadas em estufa bacteriológica a 35°C por 24 horas. Inicialmente, observou-se a pureza da cultura e, em seguida, oito características foram analisadas por meio de provas bioquímicas, são elas: tipo de hemólise;

crescimento em ágar bile-esculina; tolerância a 6,5% de NaCl; hidrólise da esculina e do hipurato de sódio; utilização de inulina e de trealose e teste de CAMP (Christie, Atkins e Munch-Peterson).

4.2.2.1 Tipo de Hemólise e Teste de CAMP (Christie, Atkins e Munch-Peterson)

A hemólise das colônias de *Streptococcus* spp. foi observada em ágar sangue. Conforme aborda Quinn *et al.* (1999), os tipos de hemólise produzidos pelas espécies de *Streptococcus* podem variar e são classificados em: hemólise beta, quando ocorre uma zona clara de hemólise em torno da colônia; hemólise alfa, que se apresenta como uma zona esverdeada ou de hemólise parcial; e hemólise gama, quando não há presença de hemólise em torno da colônia.

De acordo com Barrow; Feltham (1993) e Spellerberg; Brandt (2011), a reação do fator CAMP foi descrita em 1944, por Christie, Atkins e Munch-Peterson e se refere ao rompimento de eritrócitos pela beta-hemolisina de *Staphylococcus aureus* e da proteína extracelular de *S. agalactiae*. A expressão dessa característica é encontrada na maioria das estirpes de *S. agalactiae*, mas CAMP-negativas podem ocorrer. A estirpe a ser testada e uma de *S. aureus* beta-hemolítico foram inoculadas em uma placa de ágar sangue em um ângulo de 90° e incubadas a 35°C por 18-24 horas. Ainda segundo esses estudos, a reação positiva é indicada pela presença de uma zona triangular da beta-hemólise na zona de difusão da beta-hemolisina do *S. aureus* e do fator CAMP. Como controle positivo foi utilizada a cepa *Streptococcus agalactiae* ATCC 12386 e como negativo, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

4.2.2.2 Crescimento em Ágar Bile Esculina, Tolerância a 6,5% de NaCl e Hidrólise da Esculina

O meio Bile Esculina (Oxoid, Basingstoke, Hants, Reino Unido), distribuído em tubos inclinados, foi inoculado com uma a três colônias da estirpe a ser testada e incubado a 35°C por até 48 horas. O escurecimento total ou da metade do meio de cultura indica que o teste é positivo e, em alguns casos, as reações podem ser fracas, tornando difícil a interpretação do teste, de acordo com os estudos de Barrow; Feltham (1993) e Spellerberg; Brandt (2011). Como controle positivo, foi

utilizada a cepa *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e como negativo, a *Streptococcus agalactiae* ATCC 12386.

Este teste é utilizado para diferenciar *Streptococcus* spp. tolerantes ao sal. A tolerância a 6,5% de NaCl foi testada em Caldo de Infusão de Coração (Heart Infusion Broth, HI, Difco, Sparks, MD, EUA), contendo cloreto de sódio, glicose e púrpura de bromocresol (como indicador). O meio foi incubado a 35°C por 48 horas (BARROW; FELTHAM, 1993; ATLAS; SNYDER, 2011). Como controle positivo do teste, foi utilizada a cepa *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e como negativo, *Streptococcus equi* ATCC 33398.

A hidrólise da esculina à esculetina foi detectada em Ágar TSA, acrescido de esculina e cloreto férrico (ambos da Vetec Química, Rio de Janeiro), e é indicada pelo escurecimento do meio após incubação por 18-24 horas a 35°C. A leitura é realizada após 24 horas de incubação e os tubos são examinados diariamente por até cinco dias. Quando não há alteração no meio, o resultado é considerado negativo, conforme salientam Barrow; Feltham, (1993); Atlas; Snyder, (2011) e Spellerberg; Brandt (2011). Como controle positivo do teste, utilizou-se a cepa *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e como negativo, *Streptococcus agalactiae* ATCC 12386.

4.2.2.3 Hidrólise do Hipurato de Sódio

A hidrólise do hipurato de sódio a ácido benzoico e glicina é um teste empregado na identificação presuntiva de *S. agalactiae*. Foi utilizado o Caldo HI, adicionado de Hipurato de Sódio (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha). Baseado nos estudos de Smibert; Krieg (1981); Barrow; Feltham (1993), Atlas; Snyder (2011) e Spellerberg; Brandt (2011), o resultado é positivo quando ocorrer a formação de um precipitado forte após a adição de solução de cloreto férrico acidificado, o que indica a presença de ácido benzóico, resultante da hidrólise do hipurato. Como controle positivo, utilizou-se a cepa *Streptococcus agalactiae* ATCC 12386 e como negativo, *Streptococcus pyogenes* ATCC 12384.

4.2.2.4 Utilização de Inulina e Trealose

A formação de ácido a partir dos carboidratos inulina e trealose foi observada em meio base para fermentação de carboidratos (Purple Broth Base, Difco, Sparks, MD, EUA), adicionado desses açúcares, ambos da marca Merck (Darmstadt, Alemanha). O meio não inoculado apresenta a coloração púrpura. A mudança de coloração do meio para amarelo indica a utilização do açúcar (QUINN *et al.*, 1999). Para ambos os açúcares foram utilizados como controle positivo *Streptococcus uberis* ATCC 700407 e como negativo, *Streptococcus equi* subsp. *equi* ATCC 33398.

4.2.3 Bactérias Gram-negativas

As estirpes foram recuperadas em Ágar BHI e incubadas em estufa bacteriológica a 35°C por 24 horas. Examinou-se a pureza das culturas e em seguida as amostras foram inoculadas nos meios de identificação presuntiva para bactérias Gram-negativas. Para a identificação, utilizou-se os seguintes testes: crescimento em Ágar MacConkey, produção de ácidos em Ágar Tríplice Açúcar-Ferro (TSI), teste do vermelho de metila (VM), de Voges-Proskauer (VP), utilização de citrato, teste de oxidação/fermentação da glicose (O/F), teste de motilidade, produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S) e produção de indol.

4.2.3.1 Crescimento em Ágar MacConkey

O Ágar MacConkey (Merck, Darmstadt, Alemanha) é um meio de plaqueamento diferencial para selecionar e isolar membros da família *Enterobacteriaceae* e bacilos Gram-negativos entéricos. Esse meio contém sais biliares e cristal violeta, que inibem o crescimento de bactérias Gram-positivas e de algumas Gram-negativas. A lactose é o único carboidrato presente, com isso, bactérias fermentadoras produzem colônias com coloração em tons vermelho, devido à viragem do indicador vermelho neutro, e as bactérias não-fermentadoras de lactose são incolores ou transparentes. Para realização do teste, uma colônia isolada deve ser estriada na placa, contendo o meio diferencial, e incubada a 35°C por 24 horas (WINN JR. *et al.*, 2008). Como controle positivo do teste, foi utilizada a

cepa *Escherichia coli* ATCC 11229 e como negativo, *Salmonella* Typhimurium IAL 1412.

4.2.3.2 Teste do Ágar Tríplice Açúcar-Ferro (TSI) e Utilização de Citrato

O meio de cultura TSI contém três açúcares, glicose (0,1%), lactose (1%) e sacarose (1%), e o indicador de pH vermelho de fenol e sulfato ferroso ou citrato de amônio férrico com tiosulfato de sódio, detectam a produção de sulfureto de hidrogênio. O meio é vermelho quando inoculado ou se reações alcalinas ocorrerem, e amarelo quando acontecem reações ácidas. Esse meio é essencial para a identificação presuntiva de *Salmonella*, mas também é útil para a diferenciação de outros membros da família *Enterobacteriaceae* (QUINN *et al.*, 1999).

Tubos contendo Ágar TSI (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) foram inoculados com auxílio de uma agulha bacteriológica, a colônia foi tocada com a extremidade da agulha de inoculação e introduzida na profundidade do tubo. Após a retirada da agulha, efetuou-se a inoculação da superfície inclinada com movimentos de zigue-zague e, em seguida, os tubos foram incubados a 35°C durante 18 a 24 horas. Como resultados, são possíveis diferentes reações. A maioria das salmonelas apresenta a superfície inclinada alcalina (vermelha), a base ácida (amarela) e o escurecimento do meio, em função da produção de sulfureto de hidrogênio. *E. coli* apresenta reação ácida em todo o meio e produção de gás, sem qualquer escurecimento (QUINN *et al.*, 1999). Como controles do teste foram utilizadas as cepas *Escherichia coli* ATCC 11229 e *Salmonella* Typhimurium IAL 1412.

O princípio do teste consiste em determinar a capacidade de um microrganismo utilizar citrato de sódio como única fonte de carbono para seu crescimento e alcalinização. Uma colônia do microrganismo foi inoculada na superfície inclinada do Ágar Citrato de Simmons (Biobrás, Montes Claros, Brasil), que contém sais de amônia inorgânica. O aparecimento de coloração azul no meio, após 24 horas de incubação a 35°C, indica resultado positivo e presença de produtos alcalinos. Por sua vez, a cor verde e sem crescimento visível do inóculo ao longo do meio, mostra um resultado negativo (RIBEIRO; SOARES, 1998). Utilizou-se a cepa *Salmonella* Typhimurium IAL 1412 como controle positivo do teste e *Escherichia coli* ATCC 11229 como negativo.

4.2.3.3 Teste do Vermelho de Metila (VM) e Teste de Voges-Proskauer (VP)

O teste do vermelho de metila possibilita identificar espécies de bactérias que produzem ácidos fortes a partir da glicose. Assim, é pesquisada a fermentação ácida mista, em que as bactérias utilizam glicose como substrato e liberam uma grande concentração de ácidos como produto final. Esse teste exige um período de incubação de dois a cinco dias, a 35°C. Para a leitura, foi utilizada uma alíquota de 2,5 mL do caldo inoculado e a esse volume, acrescentadas cinco gotas da solução hidroalcoólica de vermelho de metila. De acordo com os estudos de Ribeiro e Soares (1998), a coloração vermelha indica resultado positivo (pH de 4,4) e a amarela (pH 6,0), negativo. Foi utilizada a cepa *Escherichia coli* ATCC 11229 como controle positivo e como controle negativo do teste, *Enterobacter cloacae* CDC 3430.

É o mesmo teste utilizado para a identificação de *Staphylococcus*, com a adição de Fosfato de Potássio Bibásico (Merck, Darmstadt, Alemanha) na fórmula, para a identificação de bactérias Gram-negativas. A cor rosa a vermelho indica resultado positivo, e a cobre revela resultado negativo (RIBEIRO; SOARES, 1998). Para monitorar o teste, utilizou-se a cepa *Enterobacter cloacae* CDC 3430 como controle positivo e *Escherichia coli* ATCC 11229 como negativo.

4.2.3.4 Teste de Oxidação-Fermentação da glicose (O/F)

É um teste utilizado para avaliar o metabolismo do microrganismo, se oxidativo ou fermentativo. Para a realização do teste, são necessários dois tubos com um carboidrato, geralmente glicose, sendo que em um deles o meio é exposto ao ar, enquanto no outro, o microrganismo inoculado é coberto com óleo mineral. Quando o microrganismo é oxidativo, utiliza a glicose em presença de oxigênio, com isso, produz ácido somente no tubo exposto ao oxigênio atmosférico. Já se ele for fermentativo, é utilizada a glicose na presença ou ausência de oxigênio, ou seja, nos dois tubos (WINN JR. *et al.*, 2008). Com o auxílio de uma agulha estéril, o microrganismo foi inoculado nos tubos, sendo que em um deles adicionou-se cinco gotas de óleo mineral estéril e, em seguida, ambos foram incubados a 35°C por 24

horas. A cepa *Escherichia coli* ATCC 11229 foi utilizada como controle positivo para as reações de oxidação e fermentação.

4.2.3.5 Teste de Motilidade, Teste de Produção de Sulfeto de Hidrogênio e Produção de Indol

O teste de motilidade, bem como os de produção de sulfeto de hidrogênio e de produção de indol, foram realizados no meio SIM, (Merck, Darmstadt, Alemanha)- nome que indica as características “Sulfeto”, “Indol” e “Motilidade”- o qual possibilita avaliar essas três características no mesmo tubo.

A motilidade da bactéria é um fator importante na identificação final de uma espécie, interpretado pelo exame macroscópico de uma zona difusa de crescimento, a partir da linha de inoculação, possibilita verificar se a bactéria é móvel ou imóvel (WINN JR. *et al.*, 2008). Foi utilizada a cepa *Escherichia coli* ATCC 11229 como controle positivo do teste e *Cronobacter sakazakii* CDC 7006 como negativo.

Esse teste também foi realizado no meio de cultura SIM (Merck, Darmstadt, Alemanha) e determina a liberação de sulfeto de hidrogênio (H₂S) por ação enzimática nos aminoácidos sulfurados (cisteína), que produzem uma coloração negra no meio. As bactérias podem metabolizar aminoácidos que contêm enxofre (cisteína) ou degradar o tiosulfato de sódio (substrato) em ambiente ácido, com a produção de sulfeto de hidrogênio, que é incolor e, por sua vez, pode reagir com íons férricos presentes no meio, formando como produto o sulfeto ferroso, composto insolúvel que dá origem à cor negra. Ressalta-se que o escurecimento do meio SIM indica resultado positivo e, sua coloração amarela, negativo (RIBEIRO; SOARES, 1998).

O indol é um produto da degradação do metabolismo do aminoácido triptofano, e bactérias que possuem a enzima triptofanase são capazes de clivar o triptofano produzindo indol, ácido pirúvico e amônia. O aparecimento da coloração vermelha após a adição da solução contendo p-dimetilaminobenzaldeído (reagente de Kovacs) é indicativo da presença de indol no meio contendo triptofano. O meio SIM inoculado foi incubado por 24 horas a 35°C e 24 horas em temperatura ambiente. No momento da leitura, foram adicionadas três gotas do reagente de Kovacs (p-dimetilaminobenzaldeído em álcool amílico e HCl concentrado) e, em

seguida, observada a reação (BARROW; FELTHAM, 1993; WINN JR. *et al.*, 2008). Como controle positivo do teste, utilizou-se a cepa *Escherichia coli* ATCC 11229 e, *Cronobacter sakazakii* CDC 7006, como controle negativo.

4.3 IDENTIFICAÇÃO DAS ESTIRPES DE *STAPHYLOCOCCUS* PELO SEQUENCIAMENTO PARCIAL DO GENE 16S rRNA

A identificação das estirpes de *Staphylococcus* por esta técnica foi realizada em estudo anterior por Lange *et al.* (2015) e a extração do DNA bacteriano, de acordo com Hesselbarth; Schwarz (1995). É importante ressaltar que o DNA foi quantificado em espectrofotômetro (GeneQuantpro, Amersham Biosciences) e as quantidades ajustadas para a reação de PCR (50-100 µg/µl). Além disso, amplificou-se o DNA por PCR, com os oligonucleotídeos 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' e 5'-GTATTACCGCGGCTGCTG-3', que amplificam um produto de 536 pb. O programa de PCR iniciou-se com uma etapa de desnaturação de 5 min., seguida de 35 ciclos de 95°C por 30 seg., 55°C por 30 seg. e 74°C por 2 min., com uma extensão final de 74°C por 5 min. Os produtos obtidos foram purificados com um kit de purificação (illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), de acordo com as especificações do fabricante. Uma alíquota de 200 ng do DNA purificado foi usada como matriz para as reações de sequenciamento, nas quais utilizou-se o kit de sequenciamento DYEnamic™ ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (GE Healthcare, NYSE, Germany) e 0,5 µM do mesmo oligonucleotídeo empregado para a reação de PCR.

As reações de sequenciamento foram precipitadas com etanol, inseridas no equipamento MegaBACE 1000 DNA sequencer (GE Healthcare, NYSE, Germany), submetidas a 6 kV por 160 min e preparadas, separadamente, com os dois oligonucleotídeos iniciadores, de modo a se obter duas sequências para cada amostra analisada. Os pares de sequências foram editados e reunidos, utilizando-se o software SeqMan (LaserGene package, DNASTAR), e as sequências resultantes, comparadas às bacterianas depositadas na base de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

4.4 IDENTIFICAÇÃO DAS ESTIRPES PELA TÉCNICA DE MALDI-TOF MS

A técnica de MALDI-TOF MS foi executada no Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica (LIMM), localizado no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, onde está instalado o espectrômetro de massas MALDI-TOF *Microflex LT* (Bruker Daltonics, MA, EUA), o qual é equipado com um laser de nitrogênio de 337 nm, de caminho linear. A espectrometria foi registrada pelo programa *CelFlex Control 3.3* e as análises espectrais, pelo software MALDI *Biotyper Realtime Classification 3.1.2* (Bruker Daltonics, MA, EUA). O procedimento foi realizado em duplicata e o maior escore atribuído pelo programa a cada colônia analisada, selecionado para confirmar a identificação de bactérias, na qual se utilizou a configuração padrão.

4.4.1 Preparação das amostras bacterianas

A preparação das amostras foi realizada de acordo com Coimbra-e-Souza *et al.* (2019). Dessa forma, as amostras bacterianas foram inoculadas em Ágar BHI e incubadas 35°C por 24 horas. Com auxílio de um palito de madeira, o material de uma ou mais colônias de cada amostra foi depositado na placa de aço inoxidável do equipamento, com capacidade para acomodar 96 amostras. As amostras foram aplicadas em duplicata, sendo possível analisar 46 em cada placa. A cepa *Escherichia coli* DH5 α foi utilizada como controle interno do equipamento, ou seja, empregou-se o espectro das proteínas ribossômicas dessa cepa como referência. Além disso, o equipamento também fez a leitura em duplicata, de modo que ao final foram obtidas quatro diferentes identificações da mesma amostra.

Após a aplicação das amostras, a placa foi mantida em repouso até a completa secagem do material depositado. Sobre cada uma, adicionou-se 1 μ L de ácido fórmico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), que atuou na lise da parede bacteriana, e, em seguida, as amostras foram submetidas a uma segunda secagem.

Após essa segunda secagem, foi depositado sobre cada amostra 1 μ L da matriz [solução saturada de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico contendo acetonitrila a 50% (v/v) e ácido trifluoroacético a 2,5% (v/v) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA)]. A matriz agiu juntamente com a cristalização da amostra e com a dessorção de íons,

e a solução de acetonitrila extraiu as proteínas presentes nas células bacterianas. Após mais uma etapa de secagem, a placa foi inserida no equipamento para a leitura das amostras.

4.4.2 Obtenção dos dados espectrais e interpretação dos resultados

Os dados espectrais de massa foram coletados dentro da faixa de proporção massa/carga de 2.000 a 20.000 Da, e os resultados, adquiridos e gerados pelo programa computacional *CelFlex Control 3.3*. Como sugerido pelo fabricante do *software*, escores iguais ou maiores que 2,3 foram considerados como identificação altamente provável para a espécie; entre 2,0 e 2,29 obtiveram identificação segura para gênero e provável para espécie; escores entre 1,7 e 1,9 foram considerados como identificação provável apenas para gênero, enquanto que escores de identificação abaixo de 1,69 foram considerados como não confiáveis.

As amostras não identificadas ou que não apresentaram escore igual ou superior a 2,0, através do procedimento de extração diretamente na placa, foram submetidas a um procedimento de extração com ácido fórmico anterior à aplicação na placa, baseado em protocolo fornecido pelo fabricante do equipamento, com modificações sugeridas pela equipe do L IMM, descrito no item 4.3.3.

4.4.3 Procedimento de extração de proteínas com ácido fórmico

As estirpes foram cultivadas em Ágar BHI a 35°C por 24 horas e, com o auxílio de uma alça estéril, uma a duas colônias isoladas de cada amostra, depositadas em 50 µL da solução ácido fórmico a 70% (v/v) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), o material foi homogeneizado, e adicionados mais 50 µL de acetonitrila a 100% (v/v) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). A mistura foi novamente homogeneizada e centrifugada a 12.000 x g por 2 minutos. O sobrenadante foi separado do sedimento, a seguir, congelado a -20°C e, posteriormente, depositou-se 1 µL dele sobre a placa-alvo do equipamento, seguido da completa secagem. Após essa, foi depositado 1 µL da matriz (descrita no item 4.3.1) sobre cada amostra e, depois de nova secagem, a leitura foi realizada no espectrômetro de massas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, foram analisadas 380 estirpes bacterianas, 203 do gênero *Staphylococcus*, 156 cocos Gram-positivos catalase negativos, classificados inicialmente nos gêneros *Streptococcus* e *Enterococcus* e 21 bactérias Gram-negativas. Os cocos Gram-positivos catalase negativos e as bactérias Gram-negativas foram identificadas por testes bioquímicos e pela técnica de MALDI-TOF MS. As estirpes do gênero *Staphylococcus* foram analisadas por MALDI-TOF MS, e os resultados, comparados aos do sequenciamento do gene 16S rRNA, realizado em estudo anterior. Para controle dos dados levantados dos testes bioquímicos e da técnica de MALDI-TOF MS, foram analisadas também 35 cepas-padrão, relacionadas no Quadro 1, apresentada em material e métodos. Os resultados obtidos estão descritos a seguir.

5.1 CEPAS-PADRÃO

As trinta e cinco cepas-padrão de bactérias, incluindo 28 Gram-positivas e sete Gram-negativas, foram identificadas corretamente pela técnica de MALDI-TOF MS, com escores acima de 2,0, com algumas diferenças na nomenclatura das cepas, em função das mudanças taxonômicas ocorridas.

Assim, *Streptococcus bovis* ATCC 33317^T foi identificado como *Streptococcus lutetiensis*. De acordo com informações do *software* do equipamento, as espécies *Streptococcus equinus*, *S. gallolyticus*, *S. infantarius* e *S. lutetiensis* possuem padrões muito similares, e por esse motivo, a diferenciação entre elas é difícil. A taxonomia de bactérias do gênero *Streptococcus* e gêneros relacionados (*Enterococcus*, *Lactococcus*, entre outros) sofreu inúmeras mudanças nos últimos anos, em virtude de estudos genômicos, incluindo o sequenciamento do gene 16S rRNA. Mudanças taxonômicas significativas também ocorreram no grupo *Streptococcus bovis*, um patógeno responsável por doenças no homem e nos animais (SPELLERBERG; BRANDT, 2011). O sistema taxonômico atual do grupo *Streptococcus bovis*, que segue descobertas recentes publicadas na literatura, mas que ainda não está universalmente aceito pela comunidade científica, inclui sete

divisões dentro do grupo: *S. equinus*, *S. infantarius* subsp. *coli* (*S. lutetiensis*), *S. infantarius* subsp. *infantarius*, *S. alactolyticus*, *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, *S. gallolyticus* subsp. *Pasteurianus* e *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus* (DEKKER; LAU, 2016).

Streptococcus dysgalactiae subsp. *equisimilis* ATCC 12388^T foi identificado somente em nível de espécie, já *Streptococcus equi* subsp. *equi* ATCC 33398^T e *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* ATCC 43079^T foram identificados até subespécie.

As cepas *Enterobacter sakazakii* CDC 7006 (atual *Cronobacter sakazakii*), *Salmonella* Typhi IAL 1251, *Salmonella* Typhimurium IAL 1412 e *Salmonella* Braenderup ATCC BAA-664 foram identificadas somente em nível de gênero. Segundo informações do *software* do equipamento, *Cronobacter* e *Salmonella* só podem ser reconhecidas em nível de gênero pela técnica de MALDI-TOF MS.

Enterobacter cloacae CDC 3430 foi identificada como *Enterobacter asburiae*, que é um membro do complexo *Enterobacter cloacae*, juntamente com as espécies *E. cloacae*, *E. asburiae*, *E. hormaechei*, *E. kobei* e *E. xiangfangensis*. Ainda de acordo com o fabricante do equipamento, *Escherichia coli*, *Escherichia fergusonii* e *Shigella* sp. são bactérias intimamente relacionadas e não podem ser distinguidas entre si pela técnica de MALDI-TOF MS até o momento. Ressalta-se ainda que *Klebsiella pneumoniae* é demasiadamente associada à bactéria *Klebsiella variicola*.

5.2 GÊNERO STAPHYLOCOCCUS

As 203 estirpes do gênero *Staphylococcus* identificadas pela técnica de MALDI-TOF MS já haviam sido identificadas pelo sequenciamento do gene 16S rRNA em estudo anterior por Lange *et al.* (2015). Do total de 203 estirpes analisadas por MALDI-TOF MS, 192 (94,5%) foram reconhecidas com escore acima de 2,0, que significa uma identificação provável de espécie. Em alguns casos, foi necessária a repetição do procedimento e/ou a utilização de extração de proteínas com ácido fórmico, para obter uma identificação com escore acima de 2,0. Nove estirpes foram identificadas com escores entre 1,7 e 1,9, que significa uma identificação provável de gênero, mesmo após a utilização do procedimento de extração de proteínas. Identificou-se essas nove estirpes com escores abaixo de 2,0, como *S. haemolyticus*

(3), *S. aureus* (2), *S. sciuri* (2), *S. auricularis* (1) e *S. hyicus* (1). Ademias, duas estirpes não foram identificadas por MALDI-TOF MS.

Os resultados da identificação pelo sequenciamento e pela técnica de MALDI-TOF MS podem ser visualizados na Tabela 1. Todas as estirpes identificadas como *S. aureus* (n=35), *S. simulans* (n=8), *S. pasteurii* (n=1) e *S. succinus* (n=1), pelo sequenciamento do gene 16S rRNA, repetiram a mesma identificação pela técnica de MALDI-TOF MS. Nesse sentido, *S. sciuri*, *S. haemolyticus* e *S. auricularis* também exibiram a mesma identificação pelo sequenciamento e por MALDI-TOF MS, entretanto, algumas estirpes apresentaram escores abaixo de 2,0.

Identificações divergentes ocorreram com as espécies *S. chromogenes*, *S. epidermidis*, *S. hyicus*, *S. agnetis*, *S. caprae* e *S. intermedius*. As quatro estirpes de *S. agnetis* foram identificadas como *S. hyicus*, pela técnica de MALDI-TOF MS, possivelmente porque essa espécie não consta no banco de dados do *software* de identificação. Conforme aborda Taponen *et al.* (2012), a espécie *S. agnetis* é intimamente relacionada às espécies *S. hyicus* e *S. chromogenes* e, provavelmente por este motivo, ela tenha sido identificada como *S. hyicus* por MALDI-TOF MS.

Além disso, *S. caprae* foi identificado como *S. hyicus*, e *S. intermedius*, como *S. pseudintermedius*. Três estirpes identificadas como *S. chromogenes* pelo sequenciamento do gene 16S rRNA foram reconhecidas como *S. haemolyticus* (n=2) e *S. epidermidis* (n=1) por MALDI-TOF MS. Por outro lado, duas estirpes, identificadas como *S. epidermidis* pelo sequenciamento do 16S rRNA, foram constatadas como *S. chromogenes* (n=1) e *S. haemolyticus* (n=1) por MALDI-TOF MS.

Tabela 1-Comparação dos resultados de identificação de 203 *Staphylococcus* spp. por sequenciamento do gene 16S rRNA e MALDI-TOF MS

Sequenciamento 16S rRNA (nº estirpes)	MALDI-TOF MS (nº estirpes)	Concordância de resultados MALDI-TOF MS/sequenciamento
<i>S. chromogenes</i> (82)	<i>S. chromogenes</i> (79) <i>S. haemolyticus</i> (2) <i>S. epidermidis</i> (1)	79/82 (96,3%)
<i>S. aureus</i> (35)	<i>S. aureus</i> (35)	35/35 (100%)
<i>S. epidermidis</i> (28)	<i>S. epidermidis</i> (26) <i>S. chromogenes</i> (1) <i>S. haemolyticus</i> (1)	26/28 (92,8%)
<i>S. sciuri</i> (11)	<i>S. sciuri</i> (11)*	11/11 (100%)
<i>S. hyicus</i> (10)	<i>S. hyicus</i> (9)* <i>S. capitis</i> (1)	9/10 (90%)
<i>S. haemolyticus</i> (9)	<i>S. haemolyticus</i> (9)*	9/9 (100%)
<i>S. simulans</i> (8)	<i>S. simulans</i> (8)	8/8 (100%)
<i>S. agnetis</i> (4)	<i>S. hyicus</i> (4)	0/4
<i>S. auricularis</i> (1)	<i>S. auricularis</i> (1)*	1/1
<i>S. caprae</i> (1)	<i>S. hyicus</i> (1)	0/1
<i>S. devriesei</i> (1)	Não identificada (1)	0/1
<i>S. intermedius</i> (1)	<i>S. pseudintermedius</i> (1)	0/1
<i>S. pasteurii</i> (1)	<i>S. pasteurii</i> (1)	1/1
<i>S. succinus</i> (1)	<i>S. succinus</i> (1)	1/1
<i>S. xylosus/S. saprophyticus</i> (4)	<i>S. xylosus</i> (4)	
<i>S. haemolyticus/S. devriesei</i> (1)	<i>S. haemolyticus</i> (1)	
<i>S. haemolyticus/S. warneri/S. auricularis</i> (1)	<i>S. haemolyticus</i> (1)*	
<i>S. haemolyticus/S. devriesei/S. auricularis/S. warneri</i> (1)	<i>S. haemolyticus</i> (1)	
Não identificadas (3)	Não identificada (1) <i>S. aureus</i> (2)*	

*Presença de estirpes com escore de identificação abaixo de 2,0.

Fonte: Elaborada pela autora (2020).

O único isolado de *S. devriesei* não foi identificado por MALDI-TOF MS, por não constar no banco de dados do *software*. De acordo com Cameron *et al.* (2017), Schmidt *et al.* (2018) e Wilson *et al.* (2019), os espectros de massa de *S. devriesei* ainda não foram colocados no banco de dados do equipamento. Cameron *et al.* (2017) inseriram nele espectros de massa obtidos por MALDI-TOF MS de oito espécies de SCN, aumentando a acurácia da técnica. Wilson *et al.* (2019) também adicionaram em seu estudo espectros de massa obtidos por MALDI-TOF MS das

espécies *S. devriesei*, *S. haemolyticus* e *S. agnetis*, isoladas pelo grupo de pesquisa, ao *software* do equipamento.

De acordo com Nonnemann *et al.* (2018), o banco de dados de massa espectral da Bruker Daltonics consiste em mais de 7.000 espectros de referência, mas existe a necessidade de uma expansão contínua nesses bancos de dados, levando em consideração também a origem da amostra bacteriana, humana, animal ou do ambiente, pois a fonte ou origem da amostra pode ser causa de diferença nos espectros de uma mesma espécie. Cameron *et al.* (2017) defendem a importância de um grande número de espectros de algumas espécies de *Staphylococcus* no banco de dados do equipamento, como por exemplo *S. haemolyticus*, em virtude da grande heterogeneidade genética dessas espécies.

As estirpes com mais de uma identificação possível pelo sequenciamento do 16S rRNA foram identificadas como *S. xylosus* ou *S. haemolyticus* no MALDI-TOF MS. E das três amostras não identificadas pelo sequenciamento do 16S rRNA, uma também não o foi pelo MALDI-TOF MS e duas foram como *S. aureus*, mas com escores abaixo de 2,0. Na realidade, as três amostras consideradas não identificadas pelo seqüenciamento apresentaram 98% de similaridade com a espécie *S. aureus*, entretanto, essa porcentagem de similaridade não permite a identificação em nível de espécie, por meio do sequenciamento do 16S rRNA, *S. aureus*, só é possível se a porcentagem de similaridade for igual ou superior a 99% (CLSI, 2008). Além disso, essas três amostras não foram identificadas de forma inequívoca em nível de espécie, nem pelo sequenciamento do gene 16S rRNA, nem por MALDI-TOF MS.

Pelo sequenciamento do gene 16S rRNA, foram identificadas 14 espécies de *Staphylococcus* e por MALDI-TOF MS 13 espécies. Considerando as 193 estirpes de *Staphylococcus* com identificação inequívoca pelo sequenciamento do gene 16S rRNA, a concordância entre esse e a técnica de MALDI-TOF MS para *Staphylococcus* foi de 93,2% (180/193). Cameron *et al.* (2017) reportaram uma acurácia de 99,5% na identificação de SCN de mastite bovina por MALDI-TOF MS, utilizando o banco de dados comercial do equipamento.

Avellar-Costa e colaboradores (2019) utilizaram quatro técnicas para identificar estirpes de *Staphylococcus chromogenes* isoladas de mastite em búfalos,

dentre elas o sequenciamento do gene 16S rRNA e a técnica de MALDI-TOF MS, reportando 97,7% de acurácia da técnica de MALDI-TOF MS.

As espécies de *Staphylococcus* identificadas no presente estudo já foram reportadas em anteriores, que também utilizaram a técnica de MALDI-TOF MS para a identificação de *Staphylococcus* isolados de mastite bovina, com destaque para Moser *et al.* (2013) ; Tomazi *et al.* (2014); Cameron *et al.* (2017) e Nonnemann *et al.* (2018).

5.3 COCOS GRAM-POSITIVOS CATALASE NEGATIVOS

Os cocos Gram-positivos catalase negativos estavam identificados por características morfológicas e bioquímicas. Foram feitos testes bioquímicos para a confirmação da identidade destas estirpes, e os resultados podem ser visualizados na Tabela 2.

Os testes morfológicos e bioquímicos utilizados neste estudo permitiram a identificação de dois gêneros de cocos Gram-positivos catalase negativos, *Streptococcus* (n= 122) e *Enterococcus* (n=34), e quatro espécies de *Streptococcus*, *S. agalactiae* (n=50), *S. equinus* (=28) , *S. dysgalactiae* (n=15) e *S. uberis* (n=7). As identificações das estirpes nos gêneros *Streptococcus* e *Enterococcus* basearam-se na apresentação das características abaixo, de acordo com informações contidas em documento do *National Mastitis Council* (NMC, 2004):

- (1) Estirpes CAMP positivas e esculina negativas foram identificadas como *S. agalactiae*. Com algumas excessões, todas as estirpes dessa espécie hidrolisam o hipurato de sódio.
- (2) Estirpes com reações positivas nos testes de esculina, bile-esculina e crescimento em 6,5% de NaCl, foram identificadas como *Enterococcus* spp. Algumas espécies de *Enterococcus* hidrolisam o hipurato.
- (3) Estirpes com reações positivas nos testes de esculina e bile-esculina, mas sem crescimento em 6,5% de NaCl foram identificadas como *S. equinus*. A hidrólise do hipurato é variável nessa espécie.
- (4) Estirpes com reações positivas nos testes de esculina, negativa no teste de bile-esculina e CAMP variável foram identificadas como *S. uberis*. Essa espécie geralmente não cresce em 6,5% de NaCl, mas hidrolisa o hipurato.

(5) Estirpes com resultados negativos nos testes de esculina, bile-esculina, CAMP, hipurato e ausência de crescimento em 6,5% de NaCl foram identificadas como *S. dysgalactiae*. Eventualmente, essa espécie pode hidrolisar a esculina.

(6) Estirpes que não apresentaram o conjunto de características, como descrito nos cinco itens anteriores, foram identificadas como *Streptococcus* sp.

Cento e cinquenta e seis estirpes de cocos Gram-positivos catalase negativos foram submetidas à identificação pela técnica de MALDI-TOF MS. Do total de 156 estirpes analisadas, 150 (96,2%) foram identificadas com escore acima de 2,0. Em alguns casos, foi necessária a repetição do procedimento e/ou a utilização de extração de proteínas com ácido fórmico, para quebrar as células bacterianas, de modo que as proteínas ficassem expostas, um espectro mais ajustado fosse obtido e que houvesse uma identificação com escore acima de 2,0. Cinco estirpes foram identificadas como *S. equinus/S. lutetiensis* (3), *S. uberis* (1) e *L. garvieae* (1) e apresentaram escores entre 1,7 e 1,9, que significa uma identificação confiável de gênero, mesmo após o procedimento de extração de proteínas.

Algumas estirpes de cocos Gram-positivos catalase negativos foram cultivadas em ágar sangue, pois revelaram pouco ou nenhum crescimento em ágar BHI após 24 horas de cultivo. Entretanto, de acordo com Wenning *et al.* (2014), mudanças no meio de cultivo não interferem na identificação por MALDI-TOF MS.

Pela técnica de MALDI-TOF MS foram identificados quatro gêneros de cocos Gram-positivos catalase negativos: *Streptococcus* (n=121), *Enterococcus* (n=20), *Lactococcus* (n=12) e *Aerococcus* (2). Dessa forma, do gênero *Streptococcus* identificou-se oito espécies: *S. agalactiae* (n=50), *S. uberis* (n=43), *S. dysgalactiae* (n=17), *S. pluranimalium* (n=5), *S. equinus/S. lutetiensis* (n=3), *S. gallolyticus* (n=1), *S. parauberis* (n=1) e *S. oralis* (n=1). Quanto ao gênero *Enterococcus* encontrou-se as espécies: *E. faecalis* (n=13), *E. faecium* (n=5), *E. avium* (n=1) e *E. hirae* (n=1). Já de *Lactococcus* foram identificadas as espécies *L. lactis* (n=6) e *L. garvieae* (n=6), enquanto do gênero *Aerococcus* identificou-se a espécie *A. viridans* (n=2). No total, foram encontrados quatro gêneros e 15 diferentes espécies de cocos Gram-positivos catalase negativos por MALDI-TOF MS.

Tabela 2-Comparação dos resultados de identificação de 156 cocos Gram-positivos catalase negativos por meio de testes bioquímicos e MALDI-TOF MS

Identificação testes bioquímicos (nº estirpes)	Identificação MALDI-TOF MS (nº estirpes)
<i>Streptococcus agalactiae</i> (50)	<i>Streptococcus agalactiae</i> (48) <i>Streptococcus pluranimalium</i> (1) <i>Streptococcus uberis</i> (1)
<i>Enterococcus</i> spp. (34)	<i>Enterococcus faecalis</i> (12) <i>Enterococcus faecium</i> (5) <i>Enterococcus avium</i> (1) <i>Enterococcus hirae</i> (1) <i>Lactococcus lactis</i> (4) <i>Lactococcus garvieae</i> (1) <i>Aerococcus viridans</i> (1) <i>Streptococcus uberis</i> (8) <i>Streptococcus pluranimalium</i> (1)
<i>Streptococcus equinus</i> (28)	<i>Streptococcus uberis</i> (16) <i>Streptococcus equinus</i> / <i>S. lutetiensis</i> (3) <i>Streptococcus gallolyticus</i> (1) <i>Lactococcus garvieae</i> (5) <i>Lactococcus lactis</i> (2) Não identificado (1)
<i>Streptococcus</i> spp. (22)	<i>Streptococcus uberis</i> (12) <i>Streptococcus dysgalactiae</i> (4) <i>Streptococcus agalactiae</i> (2) <i>Streptococcus parauberis</i> (1) <i>Streptococcus oralis</i> (1) <i>Enterococcus faecalis</i> (1) <i>Aerococcus viridans</i> (1)
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> (15)	<i>Streptococcus dysgalactiae</i> (13) <i>Streptococcus uberis</i> (1) <i>Streptococcus pluranimalium</i> (1)
<i>Streptococcus uberis</i> (7)	<i>Streptococcus uberis</i> (5) <i>Streptococcus pluranimalium</i> (2)

Fonte: Elaborada pela autora (2020).

Ressalta-se ainda que os gêneros e espécies identificados neste estudo foram também reportados por Devriese *et al.* (1999a), Werner *et al.* (2012), Raemy *et al.* (2013), Schabauer *et al.* (2014), Cameron *et al.* (2016), Nonneman *et al.* (2018)

e Silva *et al.* (2018), com cocos Gram-positivos catalase negativos isolados de mastite bovina, e identificados por diferentes metodologias, como testes bioquímicos, MALDI-TOF MS, espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), PCR e sequenciamento do gene 16S rRNA.

5.3.1 *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus dysgalactiae*

Das cinquenta estirpes identificadas como *S. agalactiae*, por testes bioquímicos, 48 apresentaram a mesma identificação por MALDI-TOF MS, uma foi identificada com *S. uberis* e uma como *S. pluranimalium*. Todas as estirpes apresentaram reação de CAMP positiva e não hidrolisaram a esculina, razão pela qual foram reconhecidas como *S. agalactiae*. Por outro lado, duas estirpes que eram *Streptococcus* sp. pelos testes bioquímicos, foram identificadas como *S. agalactiae* por MALDI-TOF MS e não apresentaram reação CAMP positiva (Tabela 3).

Tabela 3- Características bioquímicas de 50 estirpes identificadas como *S. agalactiae* por MALDI-TOF MS.

Nº estirpes	Hem	CAMP	Esc	BE	Hip	NaCl	Inu	Trea	Identificação MALDI-TOF MS
22	-	+	-	-	+	+	+	+ ou ND	<i>S. agalactiae</i>
14	beta	+	-	-	+	+	+	+ ou ND	<i>S. agalactiae</i>
7	beta	+	-	-	+	-	+	+ ou ND	<i>S. agalactiae</i>
2	-	+	-	-	+	-	+	+	<i>S. agalactiae</i>
1	-	+	-	-	-	+	+	ND	<i>S. agalactiae</i>
1	-	+	-	-	+	+	+	-	<i>S. agalactiae</i>
1	beta	+	-	-	+	+	+	-	<i>S. agalactiae</i>
1	beta	-	-	-	+	+	+	ND	<i>S. agalactiae</i>
1	-	-	-	-	+	+	+	+	<i>S. agalactiae</i>

Hem: hemólise; CAMP: teste de CAMP; Esc: hidrólise da esculina; BE: crescimento em ágar bile-esculina; Hip: hidrólise do hipurato; NaCl: crescimento em 6,5% de NaCl; Inu: inulina; Trea: trealose; ND: não determinado.

Fonte: Elaborada pela autora (2020).

Levando em consideração somente a espécie *S. agalactiae*, houve concordância de identificação entre os testes bioquímicos e a técnica de MALDI-TOF MS em 48 estirpes. Por MALDI-TOF MS foram identificadas 50 estirpes de *S.*

agalactiae. Considerando a técnica de MALDI-TOF MS mais acurada que a identificação bioquímica, os testes bioquímicos identificaram 48 de 50 estirpes de *S. agalactiae*, resultando numa concordância de 96%.

Raemy *et al.* (2013) compararam os resultados obtidos com o sequenciamento do gene 16S rRNA e com a técnica de MALDI-TOF MS na identificação de estreptococos isolados de mastite bovina, e reportaram uma concordância de 100% para as espécies *S. agalactiae* e *S. uberis*. Esses autores também reportaram reação positiva ao teste de CAMP, negativa no de hidrólise de esculina e ausência de hemólise alfa em todos os isolados identificados como *S. agalactiae*, assim como observado no presente estudo. Entretanto, em relação ao crescimento na presença de NaCl, utilização de inulina e hidrólise do hipurato, foram constatadas diferenças entre os dois estudos. Neste, 49 estirpes (98%) hidrolisaram o hipurato de sódio, 41 (82%) cresceram em meio com NaCl e todas utilizaram inulina, enquanto que no estudo de Raemy *et al.* (2013), todas as estirpes hidrolisaram o hipurato, nenhuma delas cresceu em meio com 6,5% de NaCl e nem utilizou inulina. Em relação ao crescimento em meio contendo NaCl, a diferença pode estar na metodologia, pois no presente estudo o teste foi realizado em meio líquido, enquanto que em Raemy *et al.* (2013), em meio sólido.

Das 15 estirpes identificadas como *S. dysgalactiae* pelos testes bioquímicos, 13 apresentaram a mesma identificação pela técnica de MALDI-TOF MS. As outras duas estirpes foram identificadas como *S. uberis* (n=1) e *S. pluranimalium* (n=1). De acordo com informações contidas no *software* do equipamento, as espécies *S. dysgalactiae*, *S. canis* e *S. pyogenes* possuem perfis muito semelhantes, o que torna a sua diferenciação pela técnica de MALDI-TOF MS muito difícil. Outras quatro estirpes, reconhecidas por testes bioquímicos como *Streptococcus* spp., foram identificadas como *S. dysgalactiae* por MALDI-TOF MS. As características bioquímicas das 17 estirpes identificadas como *S. dysgalactiae* por MALDI-TOF MS podem ser visualizadas na Tabela 6. Todas as 17 estirpes identificadas como *S. dysgalactiae* por MALDI-TOF MS apresentaram resultados negativos nos testes de CAMP, esculina, bile-esculina e hipurato de sódio.

Tabela 4- Características bioquímicas de 17 estirpes identificadas como *S. dysgalactiae* por MALDI-TOF MS

N° estirpes	Hem	CAMP	Esc	BE	Hip	NaCl	Inu	Trea	Identificação MALDI-TOF MS
9	-	-	-	-	-	-	-	+ ou ND	<i>S. dysgalactiae</i>
2	alfa	-	-	-	-	-	-	+	<i>S. dysgalactiae</i>
2	-	-	-	-	-	-	+	ND	<i>S. dysgalactiae</i>
2	-	-	-	-	-	+	+	+ ou ND	<i>S. dysgalactiae</i>
1	beta	-	-	-	-	-	-	ND	<i>S. dysgalactiae</i>
1	-	-	-	-	-	+	-	ND	<i>S. dysgalactiae</i>

Hem: hemólise; CAMP: teste de CAMP; Esc: hidrólise da esculina; BE: crescimento em ágar bile-esculina; Hip: hidrólise do hipurato; NaCl: crescimento em 6,5% de NaCl; Inu: inulina; Trea: trealose; ND: não determinado.

Fonte: Elaborada pela autora (2020).

Hassan *et al.* (2003) conseguiram diferenciar *S. dysgalactiae* [das subespécies *dysgalactiae* (sorogrupos C e L) e *equisimilis* (sorogrupo G)] das espécies *S. canis* e *S. pyogenes* por PCR, utilizando oligonucleotídeos que amplificam a região intergênica entre 16S e 23S rDNA. Essa diferenciação não é possível com a técnica de MALDI-TOF MS, de acordo com a informação fornecida pelo *software* do equipamento e reportada na literatura (Raemy *et al.*, 2013). No presente estudo, a cepa-padrão *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* ATCC 12388^T foi identificada somente em nível de espécie.

5.3.2 *Streptococcus uberis*

Por meio dos testes bioquímicos, sete isolados foram identificados como *S. uberis*, enquanto que por MALDI-TOF MS, 43 isolados classificados como *S. uberis*. Pela metodologia tradicional, foram considerados *S. uberis* as estirpes com reação positiva no teste de esculina, negativa no teste de bile-esculina e CAMP variável. Entretanto, 36 estirpes, das 43 identificadas como *S. uberis* por MALDI-TOF MS (83,7%), cresceram e hidrolisaram a esculina no ágar bile-esculina. De acordo com NMC (2004), 80% ou mais das estirpes de *S. uberis* apresentam reação negativa em ágar bile-esculina. Entretanto, considerando os resultados obtidos pela técnica de MALDI-TOF MS, o crescimento em ágar bile-esculina não pode ser uma característica de exclusão da espécie.

Como pode ser observado na Tabela 5, as amostras de *S. uberis* apresentaram uma grande variabilidade nas características bioquímicas, mostrando, ao todo, 22 perfis bioquímicos. Em estudo conduzido por Odierno *et al.* (2006), nenhum dos isolados de *S. uberis* cresceu em 6,5% de NaCl, contrastando com o presente estudo, em que oito deles apresentaram tolerância a 6,5% de NaCl. Os isolados que apresentam tolerância ao sal não podem ser diferenciados de espécies dos gêneros *Enterococcus*, *Lactococcus* e *Aerococcus*.

No presente estudo, das 43 amostras identificadas como *S. uberis* por MALDI-TOF MS, 19 (44,2%) foram CAMP-positivas, duas amostras (4,6%) apresentaram hemólise alfa, duas (4,6%) hemólise beta e 39 (90,7%) não hemólise. Contrastando com os resultados aqui apresentados, Asfour *et al.* (2016) reportaram 6,2% de *S. uberis* positivos para a reação de CAMP, 87,5% alfa-hemolíticos, 6,2% beta-hemolíticos e 6,2% não-hemolíticos. Quatro amostras do presente estudo (9,3%) não hidrolisaram esculina, contrastando com o resultado de Raemy *et al.* (2013), que reportaram 100% de *S. uberis* esculina-positivos. Além disso, Raemy *et al.* (2013) também reportaram uma baixa porcentagem de *S. uberis* alfa-hemolíticos, 3%, semelhante à observada no presente estudo. Neste ainda, 44,2% das estirpes identificadas como *S. uberis* foram CAMP-positivas, contrastando com 9% de amostras CAMP-positivas reportadas no estudo de Raemy *et al.* (2013).

Tabela 5- Características bioquímicas de 43 estirpes identificadas como *S. uberis* e uma estirpe identificada como *S. parauberis* por MALDI-TOF MS.

Nº estirpes	Hem	CAMP	Esc	BE	Hip	NaCl	Inu	Trea	Identificação MALDI-TOF MS
7	-	-	+	+	+	-	+	+	<i>S. uberis</i>
5	-	-	+	-	+	-	+	+ ou ND	<i>S. uberis</i>
4	-	+	+	+	+	-	+	+ ou ND	<i>S. uberis</i>
4	-	-	+	+	+	-	-	+ ou ND	<i>S. uberis</i>
3	-	+	+	+	+	-	-	ND	<i>S. uberis</i>
2	-	+	+	+	+	+	-	ND	<i>S. uberis</i>
2	-	-	+	+	+	+	-	+	<i>S. uberis</i>
2	beta	+	+	+	+	+	-	ND	<i>S. uberis</i>
1	-	+	-	+	+	-	-	ND	<i>S. uberis</i>
1	-	-	-	-	-	-	+	ND	<i>S. uberis</i>
1	-	+	-	+	-	-	-	ND	<i>S. uberis</i>
1	-	+	+	+	-	-	+	ND	<i>S. uberis</i>
1	-	-	+	+	-	-	-	ND	<i>S. uberis</i>
1	-	-	+	+	+	-	-	ND	<i>S. uberis</i>
1	-	+	+	+	-	-	-	ND	<i>S. uberis</i>
1	-	+	-	-	+	-	-	ND	<i>S. uberis</i>
1	-	-	+	+	+	-	-	+	<i>S. uberis</i>
1	-	+	+	+	+	+	-	+	<i>S. uberis</i>
1	-	-	+	+	-	-	+	+	<i>S. uberis</i>
1	-	-	+	+	-	-	-	+	<i>S. uberis</i>
1	alfa	+	+	+	+	-	-	ND	<i>S. uberis</i>
1	alfa	+	+	+	+	+	-	ND	<i>S. uberis</i>
1	-	-	+	-	-	-	-	ND	<i>S. parauberis</i>

Hem: hemólise; CAMP: teste de CAMP; Esc: hidrólise da esculina; BE: crescimento em ágar bile-esculina; Hip: hidrólise do hipurato; NaCl: crescimento em 6,5% de NaCl; Inu: inulina; Trea: trealose; ND: não determinado.

Fonte: Elaborada pela autora (2020).

Somente uma amostra deste estudo foi identificada por MALDI-TOF MS como *S. parauberis*, cuja única característica positiva dessa foi a hidrólise da esculina, apresentando resultados negativos nos demais testes. Essa espécie foi proposta por Williams e Collins (1990) para as amostras então denominadas *S. uberis* tipo II, diferenciando-a de *S. uberis*, então designado de *S. uberis* tipo I. Ambas as espécies causam mastite em bovinos e a diferenciação entre elas foi obtida com o sequenciamento do 16S rRNA, com o uso de transcriptase reversa. De acordo com Williams e Collins (1990), *S. parauberis* pode ser fracamente alfa-hemolítico ou não hemolítico; não cresce em 6,5% de NaCl; hidrolisa a esculina; a hidrólise do hipurato de sódio é variável e pode produzir ácido a partir de inulina e trealose. A diferenciação entre as duas espécies só é possível com a utilização de técnicas moleculares, pois as características bioquímicas e sorológicas das duas espécies são indistinguíveis. Jayarao *et al.* (1991) propuseram a distinção das duas espécies por PCR do gene 16S rDNA, seguido de análise de perfis de restrição. Hassan *et al.* (2001) diferenciaram as espécies *S. uberis* e *S. parauberis* por PCR, utilizando como alvos os genes 16S, 23S e a região intergênica 16S-23S. Os resultados obtidos no presente estudo indicam que a técnica de MALDI-TOF MS possui a capacidade de diferenciar as duas espécies.

5.3.3 *Streptococcus equinus* e *Streptococcus gallolyticus*

Pelos testes bioquímicos, identificou-se 28 estirpes como *S. equinus*, entretanto, somente três delas foram identificadas como *S. equinus* (ou *S. lutetiensis*) por MALDI-TOF MS. A identificação bioquímica baseou-se nas reações positivas nos testes de esculina e bile-esculina e ausência de crescimento em 6,5% de NaCl. As outras 25 estirpes foram identificadas por MALDI-TOF MS como *S. uberis* (n=16), *S. gallolyticus* (n=1), *Lactococcus garvieae* (n=5), *Lactococcus lactis* (n=2) e uma estirpe não foi identificada. As três estirpes apontadas como *S. equinus*/*S. lutetiensis* por MALDI-TOF MS, apresentaram escores abaixo de 2,0, mas a estirpe *S. gallolyticus* mostrou escore acima de 2,0. Como a acurácia de identificação da técnica de MALDI-TOF MS é fortemente dependente do banco de dados do equipamento (DEKKER; LAU, 2016), é provável que os problemas taxonômicos encontrados no grupo *S. bovis* reflitam na pouca acurácia dessa.

Pela Tabela 6 pode-se observar que uma estirpe identificada como *S. equinus* e a estirpe *S. gallolyticus* são indistinguíveis pelas características bioquímicas analisadas.

Cameron *et al.* (2016) também relataram uma baixa discriminação de estirpes de *S. equinus/S. lutetiensis* e *S. gallolyticus*, e a identificação de duas espécies diferentes para a mesma amostra bacteriana.

Tabela 6- Características bioquímicas de três estirpes identificadas como *S. equinus* e uma estirpe identificada com *S. gallolyticus* por MALDI-TOF MS

N° estirpes	Hem	CAMP	Esc	BE	Hip	NaCl	Inu	Trea	Identificação MALDI-TOF MS
2	alfa	-	+	+	-	-	+	+	<i>S. equinus</i>
1	-	-	+	+	-	-	+	ND	<i>S. equinus</i>
1	-	-	+	+	-	-	+	-	<i>S. gallolyticus</i>

Hem: hemólise; CAMP: teste de CAMP; Esc: hidrólise da esculina; BE: crescimento em ágar bile-esculina; Hip: hidrólise do hipurato; NaCl: crescimento em 6,5% de NaCl; Inu: inulina; Trea: trealose; ND: não determinado.

Fonte: Elaborada pela autora (2020).

5.3.4 *Streptococcus pluranimalium* e *Streptococcus oralis*

Quatro estirpes foram identificadas por MALDI-TOF MS como *S. pluranimalium* e os resultados dos testes bioquímicos podem ser vistos na Tabela 7. Todas as quatro estirpes apresentaram hemólise alfa e utilizaram inulina, mas diversos resultados em relação às outras características. A espécie *S. pluranimalium* foi descrita por Devriese e colaboradores em 1999, pode ser isolada de diferentes animais (bovinos, cabra, gato, canário) e de distintas partes do corpo de bovinos, como glândula mamária, tonsilas e trato genital. Está associada à mastite subclínica e doenças reprodutivas em bovinos, doenças em aves, peixes e no ser humano, como endocardite e abscesso cerebral (PAN *et al.*, 2018). De acordo com Devriese *et al.* (1999b), *S. pluranimalium* produz hemólise alfa, hidrolisa a esculina e cresce em 6,5% de NaCl, mas a variabilidade nas características bioquímicas é típica da espécie, fato que pode estar relacionado aos diferentes habitats da bactéria. Ainda de acordo com esses autores, pode ser facilmente confundida com *S. bovis*, *Enterococcus* e *Lactococcus*.

Tabela 7- Características bioquímicas de quatro estirpes identificadas como *S. pluranimalium* e uma estirpe identificada como *S. oralis* por MALDI-TOF MS.

N° estirpes	Hem	CAMP	Esc	BE	Hip	NaCl	Inu	Trea	Identificação MALDI-TOF MS
1	alfa	-	+	-	-	-	+	+	<i>S. pluranimalium</i>
1	alfa	-	+	-	+	-	+	ND	<i>S. pluranimalium</i>
1	alfa	+	-	-	+	-	+	ND	<i>S. pluranimalium</i>
1	alfa	-	+	-	+	+	+	ND	<i>S. pluranimalium</i>
1	alfa	-	-	-	+	-	+	-	<i>S. oralis</i>

Hem: hemólise; CAMP: teste de CAMP; Esc: hidrólise da esculina; BE: crescimento em ágar bile-esculina; Hip: hidrólise do hipurato; NaCl: crescimento em 6,5% de NaCl; Inu: inulina; Trea: trealose; ND: não determinado.

Fonte: Elaborada pela autora (2020).

Uma estirpe deste estudo foi identificada como *Streptococcus oralis*., que trata-se de um membro do grupo *Streptococcus mitis*. Membros desse grupo são comensais da cavidade oral, do trato gastrintestinal e do trato genital feminino, e podem ser encontrados como microbiota transiente da pele. Podem causar endocardites em seres humanos, e sepse e pneumonia em indivíduos imunodeprimidos, além de estarem presentes na placa dental, pela capacidade de produzir biofilme (VERMELHO *et al.*, 2008; SPELLERBERG; BRANDT, 2011). Geralmente, são alfa hemolíticos, característica observada na única estirpe identificada como *S. oralis* neste estudo.

A identificação de *Streptococcus* do grupo *viridans* e de *S. oralis* a partir de leite de vacas com mastite, por meio de provas bioquímicas clássicas, pelo sistema VITEK, por sequenciamento do gene 16S rRNA e por MALDI-TOF MS, já foi reportada anteriormente por Groothuis (1981); Nam *et al.*(2009); Raemy *et al.*, (2013) e Cameron *et al.* (2016).

Raemy *et al.* (2013) relatam a identificação de *Streptococcus* do grupo *viridans* a partir de infecções intramamárias bovinas, mas não detalham as espécies identificadas. De acordo com Spellerberg e Brandt (2011), o grupo denominado *Streptococcus viridans* inclui *S. pneumoniae* e cerca de outras 30 espécies de *Streptococcus*, que estão subdivididas em outros cinco grupos, sendo eles: *S. mitis*, *S. anginosus*, *S. mutans*, *S. salivarius* e grupo *S. bovis*, mas mudanças taxonômicas e identificação de novas espécies ainda estão ocorrendo.

5.3.5 Gêneros *Enterococcus*, *Lactococcus* e *Aerococcus*

Trinta e quatro estirpes foram identificadas por MALDI-TOF MS em espécies dos gêneros *Enterococcus*, *Lactococcus* e *Aerococcus*. Como pode ser observado na Tabela 8, a maioria das estirpes desses gêneros apresentaram reação positiva nos testes de esculina, bile-esculina e crescimento em 6,5% de NaCl. Essas características, entretanto, não são suficientes para diferenciar essas espécies de *Streptococcus uberis*.

Tabela 8- Características bioquímicas de 34 estirpes identificadas nos gêneros *Enterococcus*, *Lactococcus* e *Aerococcus* por MALDI-TOF MS

Nº estirpes	Hem	CAMP	Esc	BE	Hip	NaCl	Inu	Trea	Identificação MALDI-TOF MS
8	-	-	+	+	-	+	+	+ ou ND	<i>Enterococcus faecalis</i>
2	-	-	+	+	-	+	-	+	<i>Enterococcus faecalis</i>
1	-	-	+	+	-	+	+	-	<i>Enterococcus faecalis</i>
1	alfa	-	+	+	-	+	+	+	<i>Enterococcus faecalis</i>
1	alfa	-	-	-	+	-	-	-	<i>Enterococcus faecalis</i>
2	-	-	+	+	-	+	+	+ ou ND	<i>Enterococcus faecium</i>
1	-	-	+	+	-	+	-	ND	<i>Enterococcus faecium</i>
1	alfa	-	+	+	-	+	+	+	<i>Enterococcus faecium</i>
1	beta	-	+	+	-	+	+	ND	<i>Enterococcus faecium</i>
1	-	-	+	+	-	+	+	ND	<i>Enterococcus avium</i>
1	-	-	+	+	-	+	-	ND	<i>Enterococcus avium</i>
4	-	-	+	+	-	-	+	+ ou ND	<i>Lactococcus garvieae</i>
1	-	-	+	+	-	+	-	ND	<i>Lactococcus garvieae</i>
1	alfa	-	+	+	-	-	+	+	<i>Lactococcus garvieae</i>
2	-	-	+	+	-	+	+	+ ou ND	<i>Lactococcus lactis</i>
2	-	-	+	+	-	-	+	+	<i>Lactococcus lactis</i>
1	-	-	+	+	-	+	-	ND	<i>Lactococcus lactis</i>
1	beta	-	+	+	-	+	+	+	<i>Lactococcus lactis</i>
1	-	-	-	+	-	+	+	ND	<i>Aerococcus viridans</i>
1	alfa	-	+	+	-	+	+	ND	<i>Aerococcus viridans</i>

Hem: hemólise; CAMP: teste de CAMP; Esc: hidrólise da esculina; BE: crescimento em ágar bile-esculina; Hip: hidrólise do hipurato; NaCl: crescimento em 6,5% de NaCl; Inu: inulina; Trea: trealose; ND: não determinado.

Fonte: Elaborada pela autora (2020).

Cameron *et al.* (2016) identificaram amostras de estreptococos ambientais isoladas, de leite de vacas de rebanhos leiteiros do Canadá, por MALDI-TOF MS. As espécies mais isoladas foram *S. uberis*, *A. viridans*, *S. dysgalactiae*, várias espécies

de *Enterococcus*, além de *L. garvieae* e *L. lactis*. De acordo com esses autores, até recentemente isolados de *Enterococcus* e *Lactococcus* eram identificados como “outros estreptococos”, mas a utilização da técnica de MALDI-TOF MS está possibilitando a especiação, de forma acurada, de vários membros do grupo denominado estreptococos ambientais.

Braga *et al.* (2018) analisaram patógenos de mastite bovina subclínica isolados de fazendas leiteiras do Estado de São Paulo pela microbiologia tradicional e por MALDI-TOF MS, reportando 89% de concordância entre as duas técnicas. Segundo esses autores, os resultados discordantes ocorreram principalmente entre espécies dos gêneros *Streptococcus* e *Enterococcus*.

Não foi possível identificar de forma acurada os cocos Gram-positivos catalase negativos com as oito características fenotípicas utilizadas neste estudo, nem em nível de gênero. O grande número de diferentes gêneros e espécies de cocos Gram-positivos catalase negativos que estão presentes no leite com mastite e a diversidade de características encontradas entre indivíduos da mesma espécie, são alguns dos fatores que tornam a diferenciação desse grupo de microrganismos bastante difícil, a partir de um pequeno número de características bioquímicas.

Schabauer *et al.* (2014) compararam resultados da identificação de cocos Gram-positivos catalase negativos isolados, de mastite bovina, por MALDI-TOF MS e técnicas moleculares (PCR espécie-específico e sequenciamento do 16S rRNA), e reportaram uma acurácia de identificação de 95,2%.

Neste estudo, a espécie que apresentou maior concordância de resultados entre as duas metodologias de identificação foi *S. agalactiae*, ou seja, 96%. Tal resultado é bem próximo do reportado por Cherkaoui *et al.* (2011), que encontraram uma concordância de 88% entre os resultados de testes bioquímicos (VITEK®2) e da técnica de MALDI-TOF MS, para *S. agalactiae* isolados de infecções humanas, e também dos reportados por Raemy *et al.* (2013), os quais obtiveram uma concordância de 100% entre os testes bioquímicos e MALDI-TOF MS para *S. agalactiae* isolados de mastite bovina.

Analkip *et al.* (2014) utilizaram o sistema automatizado VITEK®2 (BioMérieux), que utiliza 43 diferentes testes bioquímicos, para identificar *Streptococcus* isolados de leite de vacas com mastite, e compararam os resultados obtidos ao sequenciamento do gene 16S rRNA. Considerando o sequenciamento

como o método padrão-ouro, 62,5% dos isolados foram identificados corretamente pelo sistema VITEK®2, enquanto que 37,5%, incorretamente, em nível de gênero. Esses resultados sugerem que mesmo utilizando um grande número de testes bioquímicos, a identificação precisa de estirpes de *Streptococcus* e gêneros relacionados, baseada em características bioquímicas, é difícil. A interpretação dos resultados dos testes bioquímicos envolve julgamentos subjetivos, e pequenas alterações na realização de um teste podem dar origem a resultados falsos como sugerido por Alnakip *et al.* (2014).

Por outro lado, Wilson *et al.* (2019) sugerem que os métodos de identificação bioquímica tradicional são suficientes para identificar patógenos de mastite em nível de gênero ou de grupos, e apropriados para tomadas de decisão em relação ao manejo na fazenda, uma vez que os resultados da identificação bioquímica concordaram em grande parte com os obtidos com MALDI-TOF MS e sequenciamento do 16S rRNA.

5.4 BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS

Foram identificadas 21 bactérias Gram-negativas por testes bioquímicos e MALDI-TOF MS, e a identificação foi correspondente em 19 estirpes (90,5%), pelo menos em nível de gênero (Tabela 9). Por testes bioquímicos, as bactérias foram identificadas somente até gênero, com exceção de *Escherichia coli*, e por MALDI-TOF MS, até espécie, exceto do gênero *Salmonella*.

Tabela 9-Resultados da identificação bioquímica e por MALDI-TOF MS de 21 bactérias Gram-negativas isoladas de mastite bovina

N° da estirpe	Lac	VM	VP	H ₂ S	Indol	Mot	Cit	O/F	TSI	Identificação bioquímica	Identificação MALDI-TOF MS
23	+	-	-	-	+	-	-	+/+	A ¹ A H ₂ S-	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
50	+	+	-	-	+	+	-	+/+	A A H ₂ S-	<i>Enterobacter</i> sp.	<i>Leclercia adecarboxylata</i>
219	+	-	-	-	+	-	-	+/+	A A H ₂ S-	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
220	+	-	+	-	-	-	-	+/+	A A H ₂ S-	<i>Klebsiella</i> sp.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
2333	-	-	-	-	-	-	+	+/-	V V ² H ₂ S-	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
2558	-	-	-	-	+	+	+	+/-	V V H ₂ S-	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
3397	+	+	-	-	+	+	-	+/+	A A H ₂ S-	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
3535	+	-	+	-	+	-	+	+/+	A A H ₂ S-	<i>Klebsiella</i> sp.	<i>Klebsiella oxytoca</i>
3536	+	-	-	-	+	-	-	+/+	A A H ₂ S-	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
3888	+	-	-	-	+	+	-	+/+	A A H ₂ S-	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
3890	+	+	-	-	+	+	-	+/+	A A H ₂ S-	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
3922	+	-	-	-	+	-	-	+/+	A A H ₂ S-	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
3945	+	+	-	+	-	+	+	+/+	A A H ₂ S+	<i>Citrobacter</i> sp.	<i>Citrobacter freundii</i>
3946	-	-	-	-	-	+	+	+/-	V V H ₂ S-	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
3951	+	-	+	-	-	+	+	+/+	A A H ₂ S-	<i>Klebsiella</i> sp.	<i>Enterobacter cloacae</i>
5255	-	+	-	+	-	+	+	+/+	V A H ₂ S+	<i>Salmonella</i> sp.	<i>Salmonella</i> sp.
5300	-	-	-	+	-	+	+	+/+	V A H ₂ S+	<i>Salmonella</i> sp.	<i>Salmonella</i> sp.
5432	-	+	-	+	-	+	-	+/+	V A H ₂ S+	<i>Salmonella</i> sp.	<i>Salmonella</i> sp.
7313	+	-	+	-	-	-	+	+/+	A A H ₂ S-	<i>Klebsiella</i> sp.	<i>Klebsiella variicola</i>
8905	+	-	-	-	+	+	-	+/+	A A H ₂ S-	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
10117	+	+	-	-	+	-	-	+/+	A A H ₂ S-	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

Lac: lactose; VM: vermelho de metila; VP: teste de Voges-Proskauer; H₂S: ácido sulfídrico; Mot: motilidade; Cit: citrato; O/F: oxidação/fermentação; TSI: Triple Sugar Iron Agar – Ágar com três açúcares e ferro; a primeira letra se refere à coloração do ápice, a segunda letra se refere à coloração da base e H₂S se refere à produção ou não de gás sulfídrico; ¹ A: amarelo; ² V: vermelho.
Fonte: Elaborada pela autora (2020).

As 21 bactérias Gram-negativas isoladas de leite de vacas com mastite foram identificadas por MALDI-TOF MS em nove diferentes espécies/gênero: *Escherichia coli* (n=9), *Pseudomonas aeruginosa* (n=3), *Salmonella* sp. (n=3), *Leclercia adecarboxylata* (n=1), *Klebsiella pneumoniae* (n=1), *Klebsiella oxytoca* (n=1), *Klebsiella variicola* (n=1), *Citrobacter freundii* (n=1) e *Enterobacter cloacae* (n=1). De acordo com o *software* do equipamento, espécies do gênero *Citrobacter* possuem padrões muito similares e, por isso, a diferenciação entre elas é difícil. O mesmo ocorre com *Klebsiella oxytoca* e as espécies *K. ornithinolytica*, *K. planticola*, *K. terrigena* e o gênero *Raoultella*.

Neste estudo houve a identificação de três estirpes de *Salmonella* por testes bioquímicos e MALDI-TOF MS. As duas primeiras foram isoladas da mesma propriedade rural em Minas Gerais, mas de animais distintos, e com um mês de intervalo entre os isolamentos. A terceira amostra foi isolada de outra fazenda, a 50 Km de distância da primeira, e 30 dias após o segundo isolamento. Isolar *Salmonella* sp., a partir de leite coletado diretamente da glândula mamária, é um evento incomum. Jobim *et al.* (2010) reportaram o isolamento de uma amostra de *Salmonella* sp. de leite de vaca em um estudo, para determinar os agentes etiológicos de mastite bovina, conduzido em propriedades leiteiras da região Sul do Brasil.

Uma estirpe foi identificada por testes bioquímicos como *Enterobacter* sp. e por MALDI-TOF MS como *Leclercia adecarboxylata*. Outra por testes bioquímicos como *Klebsiella* sp. e por MALDI-TOF MS, como *Enterobacter cloacae*.

Leclercia adecarboxylata é um membro da família *Enterobacteriaceae*, encontrada infreqüentemente em amostras clínicas. Essa espécie bacteriana é ubíqua e pode ser encontrada em alimentos, água e em animais, como cobras e lesmas, e é um patógeno oportunista para o homem e animais, conforme aborda Abbott (2011). Estudos recentes indicam que pelo menos algumas estirpes podem ser patogênicas (ABBOTT, 2011), principalmente para pacientes imunocomprometidos (SPIEGELHAUER *et al.*, 2019). A bactéria é móvel, não produz acetoina, mas ácido e gás a partir de carboidratos, características essas que tornam difícil a sua diferenciação de *Enterobacter* e de outras enterobactérias, utilizando os testes descritos na tabela 8, Lima *et al.* (2018) isolaram *L. adecarboxylata* de leite de cabras com mastite em Minas Gerais, em porcentagem

baixa (0,5%), e Choudhary *et al.* (2018) isolaram o patógeno de um bovino acometido por uma doença respiratória na Índia.

Foram também identificados *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella penumoniae*, *Klebsiella oxytoca* e *Pseudomonas aeruginosa*, a partir de amostras de leite de vacas com mastite, por Rodrigues *et al.* (2016) em rebanho leiteiro no Estado do Rio de Janeiro, e por Nonneman *et al.* (2018), na Dinamarca.

A identificação de todas as bactérias Gram-negativas por MALDI-TOF MS foi obtida na primeira tentativa, não sendo necessário repetir o procedimento de identificação. Comparando os resultados dos testes bioquímicos e da técnica de MALDI-TOF MS das 21 estirpes analisadas, somente duas não apresentaram a mesma identificação, demonstrando que os testes bioquímicos utilizados permitiram uma identificação satisfatória em nível de gênero.

5.5 CONSIDERAÇÕES SOBRE OS RESULTADOS DOS TESTES BIOQUÍMICOS E DA TÉCNICA DE MALDI-TOF MS

No presente estudo, foram identificados 12 gêneros e 37 espécies de patógenos de mastite bovina por MALDI-TOF MS, 13 espécies do gênero *Staphylococcus*, 15 de cocos Gram-positivos catalase negativos e nove de bactérias Gram-negativas. Os resultados da identificação por MALDI-TOF foram comparados aos dos testes bioquímicos de cocos Gram-positivos catalase negativos de bactérias Gram-negativas, e à identificação por sequenciamento do gene 16S rRNA de espécies de *Staphylococcus*.

Neste estudo foi utilizada a aplicação direta da colônia bacteriana na placa do equipamento. Em alguns casos foi necessária a repetição do procedimento e inclusive a utilização de extração de proteínas com ácido fórmico para obter uma identificação com escore acima de 2,0. No final, de 380 estirpes analisadas, três (0,8%) não foram identificadas (dois *Staphylococcus* e um coco Gram-positivo catalase negativo) e 14 estirpes (3,7%) foram identificadas com escores entre 1,7 e 1,9 (nove *Staphylococcus* e cinco *Streptococcus*).

A taxa de identificação por MALDI-TOF MS foi de 99,2%, 95,5% em nível de espécie e de 3,7% em nível de gênero. Esses resultados são semelhantes aos

relatados por Nonnemann *et al.* (2018), que identificaram 500 patógenos isolados de glândulas mamárias bovinas por MALDI-TOF MS, obtiveram 93,5% de identificação em nível de espécie e 6,5% de gênero. No estudo de Nonneman *et al.* (2018), um total de 24 gêneros e 61 espécies foram identificados, a maioria pertencente aos gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus*, além de enterobactérias e corineformes. Esses autores recomendam a realização de testes bioquímicos ou o sequenciamento do gene 16S rRNA para a identificação das espécies não identificadas por MALDI-TOF MS.

Wilson *et al.* (2019) compararam os resultados de identificação de microrganismos isolados de leite bovino por testes bioquímicos, MALDI-TOF MS e sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, relatando uma concordância de 94% entre os três métodos. A concordância entre MALDI-TOF MS e sequenciamento do 16S rRNA foi de 98% e a concordância entre os testes bioquímicos com cada um dos outros dois métodos, de 95%.

Taxas de identificação de espécies bacterianas de 75% a 93,5% são relatadas com a aplicação direta da colônia bacteriana na placa do equipamento, conforme aborda Nonnemann *et AL.* (2018). De acordo com esses autores, a utilização de um protocolo com uso de etanol, ácido fórmico e acetonitrila é necessária para a identificação de espécies bacterianas dos gêneros *Bacillus* e *Acinetobacter*. Cameron *et al.* (2017) reportaram uma taxa de identificação de 92%, utilizando a aplicação direta da colônia bacteriana na placa do equipamento. Neste estudo, uma modificação do protocolo de extração de proteínas com ácido fórmico foi necessária para identificar algumas espécies de *Staphylococcus* e de *Streptococcus*.

A concordância entre os resultados do sequenciamento do gene 16S rRNA e da técnica de MALDI-TOF MS foi de 93,2% para espécies do gênero *Staphylococcus*. Em virtude da praticidade e da rapidez na obtenção dos resultados, considerou-se a técnica de MALDI-TOF MS apropriada para identificação de espécies do gênero *Staphylococcus*.

Sendo o objetivo da identificação de patógenos da mastite orientar tomadas de decisão nas fazendas leiteiras, os testes bioquímicos descritos neste estudo permitem a diferenciação dos dois patógenos contagiosos prevalentes nos rebanhos brasileiros, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*, e dos demais

patógenos como grupos, SCN, estreptococos ambientais e bactérias Gram-negativas. Entretanto, para uma identificação de outras espécies de *Staphylococcus* e *Streptococcus*, e a especiação de bactérias Gram-negativas, testes mais acurados, como sequenciamento e MALDI-TOF MS, entre outros, devem ser utilizados.

Em relação aos resultados da identificação por MALDI-TOF MS das 380 estirpes analisadas neste estudo, esses serão inseridos na base de dados AleloMicro da Embrapa, uma vez que as estirpes analisadas pertencem à Coleção de Microrganismos de Interesse da Agroindústria e Pecuária.

6 CONCLUSÃO

Os testes morfológicos e bioquímicos utilizados no presente estudo foram satisfatórios para a identificação, em nível de espécie, dos patógenos contagiosos como *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*, e de gênero, de bactérias Gram-negativas. Foram também apropriados para a identificação de *Staphylococcus* coagulase negativos e de representantes do grupo de estreptococos ambientais. Não foram satisfatórios para a especiação de *Staphylococcus* e de *Streptococcus* diferentes de *S. aureus* e *S. agalactiae*, nem para a diferenciação entre os gêneros *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Aerococcus* e *Lactococcus*.

Já a técnica de MALDI-TOF MS se mostrou adequada para a identificação em nível de espécie de patógenos de mastite bovina dos gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus* e bactérias Gram-negativas, propícia para identificação rápida de um grande número de microrganismos e de estirpes depositadas em coleções biológicas que ainda carecem de uma identidade acurada em nível de espécie.

REFERÊNCIAS

ABBOT, S. L. *Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Serratia, Plesiomonas, and Other Enterobacteriaceae*. In: VERSALOVIC, J.; CARROLL, K. C.; FUNKE, G.; JORGENSEN, J. H.; LANDRY, M. L.; WARNOCK, D. W. (Eds.). **Manual of Clinical Microbiology**. 10. ed. Washington: ASM Press, 2011, p. 639-657.

A BÍBLIA. Provérbios 16:3: **A prática da justiça que Deus deseja**. Tradução de FRIZZO, A. C.; SCARDELAI, D; KAEFER, J. A; PRADO, L. G. do; BAZAGLIA, P e VASCONCELLOS, P. L. Velho Testamento e Novo Testamento. Brasília: Paulus, 2013. 2162 p.

ACOSTA, A. C.; SILVA, L. B. G.; MEDEIROS, E. S.; PINHEIRO-JÚNIOR, J. W.; MOTA, R. A. Mastite em ruminantes no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 36, n. 7, p. 565-573, 2016.

ALNAKIP, M. E.; BALUJA, M. Q.; BÖHME, K.; FERNÁNDEZ-NO, I.; ANTELO, S. C.; AMER, I. H.; ELSAYED, M. S.; AYOUB, M. A.; VELÁZQUEZ, J. B.; CALO-MATA, P. Comparative identification of *streptococci* of dairy origin by VITEK-2 system and 16S rRNA gene sequencing. INTERNATIONAL CONFERENCE OF IMPACT OF ENVIRONMENTAL HAZARDS ON FOOD SAFETY. Zagazig University, Zagazig, 10 a 12 de agosto de 2014.

ARCANJO, A. H. M.; OLIVEIRA, P. C. S.; MOREIRA, L. C.; JAYME, C. G.; SOARES, N. A.; OLIVEIRA, A. R.; PEREIRA, K. A.; NOGUEIRA, M. A. R. Programa dos seis pontos de controle da mastite em rebanhos leiteiros. **Global Science and Technology**, Goiânia, v. 10, n. 1, p.78-88, 2017.

ASFOUR, H. A. E.; DARWISH, S. F.; EL-WAKEEL, S. A. Phenotypic and genotypic characterization of *Streptococcus uberis* isolated from mastitic cow's milk. **Assiut Veterinary Medical Journal**, Assiut, v. 62, n. 151, p. 71-83, 2016.

AVELLAR-COSTA, P.; SANTOS, D. C.; LANGE, C. C.; LAPORT, M. S.; BRITO, M. A. V. P.; ROSSI, C. C.; GIAMBIAGI-DEMARVAL, M. Accurate identification of atypical *Staphylococcus chromogenes* plasma-clotting strains causing bovine mastitis. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 49, n. 6, p. 1-8, 2019.

ATLAS, R. M.; SNYDER, J. W. Reagents, Stains, and Media: Bacteriology. In: VERSALOVIC, J.; CARROLL, K. C.; FUNKE, G.; JORGENSEN, J. H.; LANDRY, M. L.; WARNOCK, D. W. (Eds.). **Manual of Clinical Microbiology**. 10. ed. Washington: ASM Press, 2011, p. 272-307.

BARREIRO, Juliana Regina. **Identificação direta de microrganismos causadores de mastite por espectrometria de massas**. 2015. 87f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

- BARREIRO, J. R.; GONÇALVES, J. L.; GRENFELL, R.; LEITE, R. F.; JULIANO, L.; SANTOS, M. V. Direct identification of bovine mastitis pathogens by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in pre-incubated milk. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 49, p. 801–807, 2018.
- BARROW, G. I.; FELTHAM, R. K. A. **Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria**. 3. ed. Cambridge, Cambridge University Press, 1993. 331 p.
- BRAGA, P. A. C.; GONÇALVES, J. L.; BARREIRO, J. R.; FERREIRA, C. R.; TOMAZI, T.; EBERLIN, M. N.; SANTOS, M. V. Rapid identification of bovine mastitis pathogens by MALDI-TOF Mass Spectrometry. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 4, p. 586-594, 2018.
- BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F. **Diagnóstico Microbiológico da Mastite**. Juiz de Fora, MG: Embrapa Gado de Leite, 1999, 26p. (Embrapa Gado de Leite. Circular técnica, 55).
- CAMERON, M.; BARKEMA, H. W.; DE BUCK, J.; DE VLIEGHER, S.; CHAFFER, M.; LEWIS, J.; KEEFE, G. P. Identification of bovine-associated coagulase-negative staphylococci by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry using a direct transfer protocol. **Journal of Dairy Science**, Amsterdã v.100, p. 2137-2147, 2017.
- CAMERON, M.; SAAB, M.; HEIDER, L.; McCLURE, J. T.; RODRIGUES-LECOMPTE, J. C.; SANCHEZ, J. Antimicrobial Susceptibility Patterns of Environmental Streptococci Recovered from Bovine Milk Samples in the Maritime Provinces of Canada. **Frontiers in Veterinary Science**, Minnesota, v. 3, n. 79, p. 1-14, 2016.
- CARBONNELLE, E.; NASSIF, X. Utilisation en routine du MALDI-TOF MS pour l'identification des pathogenes en microbiologie médicale. **Medicine/sciences**, Sydney, v. 27, n. 10, p. 882-888, 2011.
- CHAGAS, L. G. S.; MELO, P. C.; BARBOSA, N. G.; GUIMARÃES, E. C.; BRITO, D. V. D. Ocorrência de mastite bovina causada por *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp. e *Candida* sp. em uma propriedade rural no município de Indianópolis – Minas Gerais, Brasil. **Bioscience Journal**, Oxford, v. 28, n. 6, p. 1007-1014, 2012.
- CHERKAOUI, A.; EMONET, S.; FERNANDES, J.; SCHORDERET, D.; SCHEREZEL, J. Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption-Time of Flight Mass Spectrometry for Rapid Identification of Beta-Hemolytic *Streptococci*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 49, n. 8, p. 3004-3005, 2011.
- CHOUDHARY, M.; CHOUDHARY, B. K.; BHOYAR, S.; KALE, S. B., CHAUDHARI, S. P.; BERA, B. C.; JAIN, A.; BARBUDDHE, S. B. Isolation and characterization of multidrug-resistant *Leclercia* species from animal clinical case. **Letters in Applied Microbiology**, Londres, v. 66, n. 1, p. 44-48, 2018.

CLSI. **Interpretative Criteria for Identification of Bacteria and Fungi by DNA Target Sequencing; Approved Guideline**. CLSI document MM18-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, Pennsylvania, 2008.

COIMBRA-E-SOUZA, V.; ROSSI, C. C.; FREITAS, L. J. J.; BRITO, M. A. V. P.; LAPORT, M. S.; MARVAL, M. G. Diversity of species and transmission of antimicrobial resistance among *Staphylococcus* spp. isolated from goat. **Journal of Dairy Science**, Amsterdã, v.102, n. 6, 2019.

CROXATTO, A.; PROD`HOM, G.; GREUB, G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. **FEMS Microbiology Reviews**, Oxford, v. 36, p. 380-407, 2012.

DE VISSCHER, A.; SUPRÉ, K.; HAESBROUCK, F.; ZADOKS, R. N.; PIESSENS, V.; VAN COILLIE, E.; PIEPERS, S.; DE VLIEGHER, S. Further evidence for the existence of environmental and host-associated species of coagulase-negative staphylococci in dairy cattle. **Veterinary Microbiology**, Amsterdã, v. 172, p. 466-474, 2014.

DEKKER, J. P.; LAU, A. F. An update on the *Streptococcus bovis* Group: Classification, identification, and disease associations. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 54, n. 7, p. 1694-1699, 2016.

DEVRIESE, L. A.; HOMMEZ, J.; LAESENS, H.; POT, B.; VANDAMME, P.; HAESBROUCK, F. Identification of esculin-hydrolyzing *Streptococci*, *Lactococci*, *Aerococci* and *Enterococci* from subclinical intramammary infections in dairy cows. **Veterinary Microbiology**, Amsterdã, v. 70, p. 87-94, 1999a.

DEVRIESE, L. A.; VANDAMME, P.; COLLINS, M. D.; ALVAREZ, N.; POT, B. HOMMEZ, J.; BUTAYE, P.; HAESBROUCK, F. *Streptococcus pluranimalium* sp. nov., from cattle and other animals. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 49, p. 1221-1226, 1999b.

GARINO JR., F.; MATOS, R. A. T.; MIRANDA NETO, E. G.; BERNARDINO, J. N. N.; SANTOS, E. D.; AGUIAR, G. M. N. Mastite clínica caprina causada por *Arcanobacterium pyogenes*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 64, n. 4, p. 1070-1073, 2012.

GASPAROTTO, P. H. G.; OLIVEIRA, F. M.; OLIVEIRA, G. K.; MARQUES, A. S. C.; MAIA, A. S. Mastite bovina causada por *Prototheca* sp. em Ji-Paraná, Rondônia – relato de caso. **Veterinária em Foco**, Canoas, v. 13, n. 1, 2015.

GROOTHUIS, D. G. A. Case of mastitis caused by *Streptococcus viridans* group biotype IV. **Tijdschrift voor Diergeneeskunde**, Amsterdã, v. 106, n. 7, p. 367-370, 1981.

HASSAN, A. A.; KHAN, I. U.; ABDULMAWJOOD, A.; LÄMMLER, C. Evaluation of PCR methods for rapid identification and differentiation of *Streptococcus uberis* and *Streptococcus parauberis*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, n. 4, p. 1618-1621, 2001.

HASSAN, A. A.; KHAN, I. U.; LÄMMLER, C. Identification of *Streptococcus dysgalactiae* strains of Lancefield's group C, G and L by polymerase chain reaction. **Journal of Veterinary Medicine B**, Nova Jersey, v. 50, p. 162-165, 2003.

HESSELBARTH, J.; SCHWARZ, S. Comparative ribotyping of *Staphylococcus intermedius* from dogs, pigeons, horses and mink. **Veterinary Microbiology**, Amsterdã, v. 45, p. 11-17, 1995.

ISRAEL, L. F. S.; RABELLO, R. F.; DOMINGOS, S. C. B.; MEDEIROS, L. S. Produção de biofilme por *Staphylococcus chromogenes* isolados de amostras de leite provenientes de rebanhos bovinos com mastite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 70, n. 6, p. 1943-1949, 2018.

JAYARAO, B. M.; DORÉ JR, J. J. E.; BAUMBACH, G. A.; MATTHEWS, K. R.; OLIVER, S. P. Differentiation of *Streptococcus uberis* from *Streptococcus parauberis* by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis of 16S ribosomal DNA. **Journal of Clinical Microbiology**, Amsterdã, v. 29, n. 12, p. 2774-2778, 1991.

JOBIM, M. B.; LOPES, M. A.; COSTA, G. M.; DEMEU, F. A. Patógenos associado à mastite bovina em rebanhos leiteiros na região Sul do Brasil. **Boletim de Indústria Animal**, Nova Odessa, v. 67, n. 2, p. 175-181, 2010.

JÚNIOR, J. N. A.; DI GIOIA, T. S. R.; DOI, A. M.; ROSSI, F. Aplicação da tecnologia de espectrometria de massa MALDI-TOF em laboratórios de microbiologia clínica. **Revista da Sociedade Brasileira de Microbiologia**, Vila Pirajussara, v. 5, n. 23, p. 1-36, São Paulo, 2014.

LANGE, C. C.; BRITO, M. A. V. P.; REIS, D. R. L.; MACHADO, M. A.; GUIMARÃES, A. S.; AZEVEDO, A. L. S.; SALES, E. B.; ALVIM, M. C. T.; SILVA, F. S.; MEURER, I. R. Species-level identification of *Staphylococci* isolated from bovine mastitis in Brazil using partial 16S rRNA sequencing. **Veterinary Microbiology**, Amsterdã, v. 176, p. 382-388, 2015.

LANGONI, H.; SALINA, A.; OLIVEIRA, G. C.; JUNQUEIRA, N. B.; MENOZZI, B. D.; JOAQUIM, S. F. Considerações sobre o tratamento das mastites. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 37, n. 11, p. 1261-1269, 2017.

LIMA, M.C.; SOUZA, M. C. C.; ESPESCHIT, I. F.; MACIEL, P. A. C. C.; SOUSA, J. E.; MORAES, G. F.; RIBEIRO FILHO, J. D.; MOREIRA, M. A. S. Mastitis in dairy goats from the state of Minas Gerais, Brazil: profiles of farms, risk factors and characterization of bacteria. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 9, p. 1742-1751, 2018.

LPSN - **List of prokaryotic names with standing in nomenclature**, Bogotá, 2020. Disponível em: www.bacterio.net/staphylococcus.html Acesso em 27 de janeiro de 2020.

MANZI, M. P.; JOAQUIM, S. F.; GUIMARÃES, F. F.; BRUDER-NASCIMENTO, A. C. M. O.; PANTOJA, J. C.; LANGONI, H. Prevalência de *Mycoplasma bovis* em rebanhos de vacas leiteiras. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 4, p. 665-669, 2018.

MOSER, A.; STEPHAN, R.; ZIEGLER, D.; JOHLER, S. Species distribution and resistance profiles of coagulase-negative *Staphylococci* isolated from bovine mastitis in Switzerland. **Schweizer Archiv für Tierheilkunde**, Bern, v. 155, n. 6, p. 333-338, 2013.

MOTTA, R. G.; RIBEIRO, M. G.; PERROTTI, I. B. M.; MOTTA, D. G.; DOMINGUES, P. F.; LUCAS, T. M.; ZAMPROGNA, T.O.; LISTONI, F. J. P. Surto de mastite bovina causada por *Arcanobacterium pyogenes*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 63, n. 3, p. 736-740, 2011.

MURRAY, P. R. What is new in clinical microbiology – microbial identification by MALDI-TOF mass spectrometry. **The Journal of Molecular Diagnostics**, Rockville, v. 14, n. 5, p. 419-423, 2012.

NMC -NATIONAL MASTITIS COUNCIL. **Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection and determination of milk quality**. 4. ed. Verona, National Mastitis Council, Minnesota, 2004. 47 p.

NAM, H.; LIM, S.-K.; KANG, H.-M.; KIM, J.-M.; MOON, J.-S.; JANG, K.-C.; JOO, Y.-S.; KANG, M.; JUNG, S.-C. Antimicrobial resistance of *Streptococci* isolated from mastitic bovine milk samples in Korea. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Nova York, v. 21, p. 698-701, 2009.

NERO, L. A.; MOREIRA, M. A. S. Mastites. In: BELOTI, V. (Org.). **Leite: Obtenção, Inspeção e Qualidade**. Londrina: Editora Planta, 2015, cap. 7, p. 283-306.

NONNEMANN, B.; LYHS, U.; SVENNESEN, L.; KRISTENSEN, K. A.; KLAAS, I. C.; PEDERSEN, K. Bovine mastitis bacteria resolved by MALDI-TOF mass spectrometry. **Journal of Dairy Science**, Amsterdã, v. 102, n. 3, p. 2515-2524, 2018.

ODIERNO, L.; CALVINHO, L.; TRAVERSSA, P.; LASAGNO, M.; BOGNI, C.; REINOSO, E. Conventional identification of *Streptococcus uberis* isolated from bovine mastitis in Argentinean dairy herds. **Journal of Dairy Science**, Amsterdã, v. 89, p. 3886-3890, 2006.

PAN, Y.; AN, H.; FU, T.; ZHAO, S.; ZHANG, C.; XIAO, G.; ZHANG, J.; ZHAO, X.; HU, G. Characterization of *Streptococcus pluranimalium* from cattle with mastitis by whole genome sequencing and functional validation. **BMC Microbiology**, Londres, v. 18, n. 182, p. 1-9, 2018.

PLUMED-FERRER, C.; UUSIKYLA, K.; KORHONEN, J.; WRIGHT, A. V. Characterization of *Lactococcus lactis* isolates from bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdã, v. 167, p. 592-599, 2013.

QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B. K.; CARTER, R. G. **Clinical Veterinary Microbiology**. Edimburgh: Mosby, 1999, 684 p.

RAEMY, A.; MEYLAN, M.; CASATI, S.; GAIA, V.; BERCHTOLD, B.; BOSS, R.; WYDER, A. Phenotypic and genotypic identification of *Streptococci* and related bacteria isolated from bovine intramammary infections. **Acta Veterinaria Scandinavica**, Reino Unido, v. 55, p. 53-61, 2013.

RIBEIRO, M. G.; COSTA, E. O.; LEITE, D. S.; LANGONI, H.; JÚNIOR, F. G.; VICTÓRIA, C.; LISTONI, F. J. P. Fatores de virulência em linhagens de *Escherichia coli* isoladas de mastite bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, n. 5, p. 724-731, 2006.

RIBEIRO, M. G.; LARA, G. H. B.; FERNANDES, M. C.; PAES, A. C.; MOTTA, R. G.; SIQUEIRA, A. K.; SALERNO, T.; LISTONI, F. J. P. Mastite bovina por *Pasteurella multocida*: estudo de nove casos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 62, n. 4, p. 985-988, 2010.

RIBEIRO, M. G.; MOTTA, R. G.; PAES, A. C.; ALLENDORF, S. D.; SALERNO, T.; SIQUEIRA, A. K.; FERNANDES, M. C.; LARA, G. H. B. Mastite bovina hiperaguda causada por *Klebsiella pneumoniae*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 60, n. 2, p. 485-488, 2008.

RIBEIRO, M. C.; SOARES, M. M. S. R. **Microbiologia Prática: Roteiro e Manual Bactérias e Fungos**. São Paulo: Atheneu, 1998, 112 p.

RODRIGUES, N. M. B.; BRONZATO, G. F.; SANTIAGO, G. S.; BOTELHO, L. A. B.; MOREIRA, B. M.; COELHO, I. S.; SOUZA, M. M. S.; COELHO, S. M. O. The Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) identification versus biochemical tests: a study with enterobacteria from a dairy cattle environment. **Brazilian Journal of Microbiology**, Vila Pirajussara, v. 48, p. 132-138, 2016.

SÁ, J. P. N.; FIGUEIREDO, C. H. A.; NETO, O. L. S.; ROBERTO, S. B. A.; ALENCAR, M. C. B. Os principais microorganismos causadores da mastite bovina e suas consequências na cadeia produtiva de leite. **Revista Brasileira de Gestão Ambiental**, Petrópoles, PB, v. 12, n. 1, p. 1-13, 2018.

SANTOS, E. M. P.; BRITO, M. A. V. P.; LANGE, C.; BRITO, J. R. F.; CERQUEIRA, M. M. O. P. *Streptococcus* e gêneros relacionados como agentes etiológicos de mastite bovina. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 35, n. 1, p. 17-27, 2007.

SANTOS, D. C.; LANGE, C. C.; COSTA, A. P.; SANTOS, K. R. N.; BRITO, M. A. V. P.; GIAMBIAGI-DEMARVAL, M. *Staphylococcus chromogenes*, a coagulase-negative *Staphylococcus* species that can clot plasma. **Journal of Clinical Microbiology**, Amsterdã, v. 54, n. 5, 2016.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. **Controle da mastite e qualidade do leite: Desafios e soluções**. Pirassununga/SP: Edição dos autores, 2019, 301p.

SCHABAUER, L.; WENNING, M.; HUBER, I.; EHLING-SCHULZ, M. Novel physico-chemical diagnostic tools for high throughput identification of bovine mastitis associated gram-positive, catalase-negative cocci. **BMC Veterinary Research**, Reino Unido, v. 10, p. 156-166, 2014.

SCHMIDT, T.; KOCK, M. M.; EHLERS, M. M. Identification and characterization of *Staphylococcus devriesei* isolates from bovine intramammary infections in KwaZulu-Natal, South Africa. **BMC Veterinary Research**, Reino Unido, v. 14, n. 324, p. 1-10, 2018.

SILVA, F. E. G.; SILVA, L. M. V.; GONÇALVES, S. F.; SOUZA, G. A. A. D.; XAVIER, A. R. E. O.; XAVIER, M. A. S.; SOUZA, K. S. S.; ALMEIDA, A. C. Uso da espectrometria de massa MADI-TOF para identificação rápida de patógenos em leite contaminado por mastite subclínica. **Zootecnia Brasil**, p. 1-5, Viçosa, 2018.

SMIBERT, R. M.; KRIEG, N. R. General Characterization. *In*: GERHARDT, P.; MURRAY, R. G. E.; COSTILOW, R. R.; NESTER, E. W.; WOOD, W. A.; KRIEG, N. R.; PHILLIPS, G. B. **Manual of Methods for General Bacteriology**. Washington: ASM, 1981, p. 409-443.

SOUZA, Lauro Mero de. **Aplicações da espectrometria de massas e da cromatografia líquida na caracterização estrutural de biomoléculas de baixa massa molecular**. 2008. 182 f. Tese (Doutorado em Ciências – Bioquímica) – Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade do Paraná, Curitiba, 2008.

SPANAMBERG, A.; SANCHES, E. M. C.; SANTURIO, J. M.; FERREIRO, L. Mastite micótica em ruminantes causada por leveduras. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 1, p. 2-9, 2009.

SPELLERBERG, B.; BRANDT, C. *Streptococcus*. *In*: VERSALOVIC, J.; CARROLL, K. C.; FUNKE, G.; JORGENSEN, J. H.; LANDRY, M. L.; WARNOCK, D. W. (Eds.). **Manual of Clinical Microbiology**. 10. ed. Washington: ASM Press, 2011. p. 331-349.

SPIEGELHAUER, M. R.; ANDERSEN, P. F.; FRANDBSEN, T. H.; NORDESTGAARD, R. L. M.; ANDERSEN, L. P. *Leclercia adecarboxylata*: a case report and literature review of 74 cases demonstrating its pathogenicity in immunocompromised patients. **Infectious Diseases**, Paraíso, v. 51, n. 3, p. 179-188, 2019.

SUN, M.; GAO, J.; ALI, T.; YU, D.; ZHANG, S.; KHAN, S. U.; FANNING, S.; HAN, B. Characteristics of *Aerococcus viridans* isolated from bovine subclinical mastitis and its effect on milk SCC yield, and composition. **Tropical Animal Health Production**, Edimburgo, v. 49, p. 843-849, 2017.

TAPONEN, S.; SUPRÉ, K.; PIESSENS, V.; VAN COILLIE, E.; DE VliegHER, S.; KOORT, J. M. *Staphylococcus agnetis* sp. nov., a coagulase-variable species from bovine subclinical and mild clinical mastitis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Cambridge, v. 62, p. 61-65, 2012.

TOMAZI, T.; GONÇALVES, J. L.; BARREIRO, J. R.; BRAGA, P. A. C.; SILVA, L. F. P.; EBERLIN, M. N.; SANTOS, M. V. Identification of coagulase-negative staphylococci from bovine intramammary infection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**, Amsterdã, v. 52, p. 1658-1663, 2014.

VERMELHO, A. B. Nutrição e Crescimento das Células Procarióticas. *In*: VERMELHO, A.B.; BASTOS, M. C. F.; SÁ, M. H. B. (Eds.). **Bacteriologia Geral**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2008, p. 122-183.

WENNING, M.; BREITENWIESER, F.; KONRAD, R.; HUBER, I.; BUSCH, U.; SCHERER, S. Identification and differentiation of food-related bacteria: A comparison of FTIR spectroscopy and MALDI-TOF mass spectrometry. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdã, v. 103, p. 44-52, 2014.

WERNER, G.; FLEIGE, C.; FESSLER, A. T.; TIMKE, M.; KOSTRZEWA, M.; ZISCHKA, M.; PETERS, T.; KASPAR, H.; SCHWARZ, S. Improved identification including MALDI-TOF mass spectrometry analysis of group D *Streptococci* from bovine mastitis and subsequent molecular characterization of corresponding *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates. **Veterinary Microbiology**, Amsterdã, v. 160, p. 162-169, 2012.

WILLIAMS, A. M.; COLLINS, M. D. Molecular taxonomic studies on *Streptococcus uberis* types I and II. Description of *Streptococcus parauberis* sp. nov. **Journal of Applied Bacteriology**, Londres, v. 68, n. 5, p.485-490, 1990.

WILSON, D. J.; MIDDLETON, J. R.; ADKINS, P. R. F.; GOODELL, G. M. Test Agreement among Biochemical Methods, Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry, and 16S rRNA Sequencing for Identification of Microorganisms Isolated from Bovine Milk. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 57, n. 3, p. 1-8, 2019.

WINN JR., W.; ALLEN, S.; JANDA, W.; KONEMAN, E.; PROCOP, G.; SCHRECKENBERGER, P.; WOODS, G. **Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 1760p.