

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS

DISSERTAÇÃO

**Identificação de enterobactérias através da técnica de
MALDI-TOF MS e compreensão da disseminação destes agentes
em ambiente de produção leiteira**

Naiara de Miranda Bento Rodrigues

2016



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**Identificação de enterobactérias através da técnica de
MALDI-TOF MS e compreensão da disseminação destes agentes
em ambiente de produção leiteira**

Naiara de Miranda Bento Rodrigues

Sob a Orientação da Professora
Shana de Mattos de Oliveira Coelho

e Co-orientação da Professora
Miliane Moreira Soares de Souza

Dissertação submetida como
requisito parcial para obtenção do
grau de **Mestre em Ciências**, no
Curso de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2016

636.2089819

R696i

T

Rodrigues, Naiara de Miranda Bento, 1985-

Identificação de enterobactérias através da técnica de MALDI-TOF MS e compreensão da disseminação destes agentes em ambiente de produção leiteira / Naiara de Miranda Bento Rodrigues. - 2016.

67 f.: il.

Orientador: Shana de Mattos de Oliveira Coelho.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, 2016.

Bibliografia: f. 38-45.

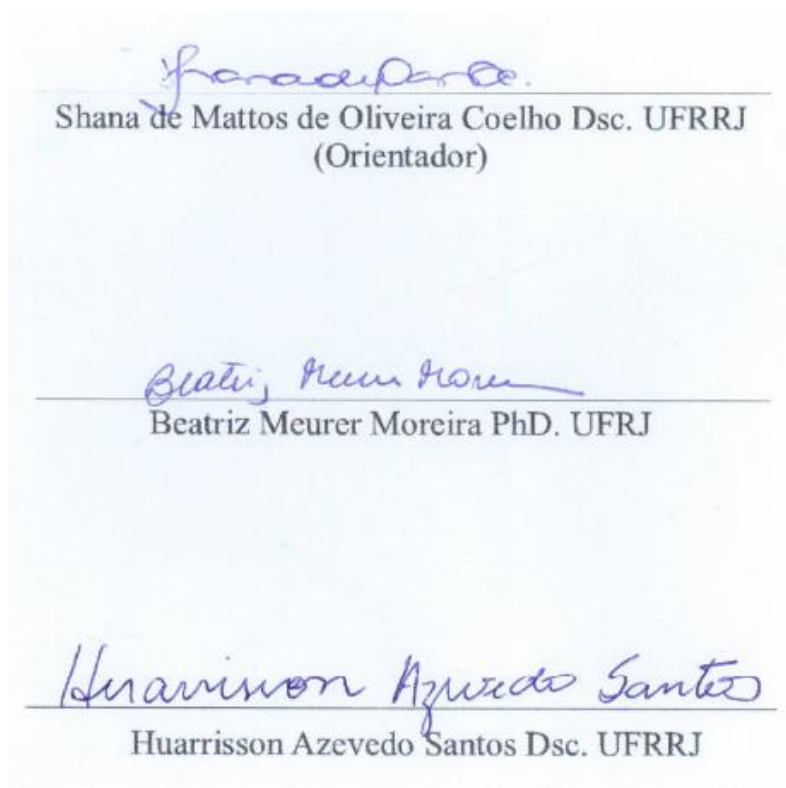
1. Bovino - Doenças - Teses. 2. Mastite - Diagnóstico - Teses. 3. Enterobactérias - Identificação - Teses. 4. Leite - Produção - Teses. 5. Microbiologia veterinária - Teses. I. Coelho, Shana de Mattos de Oliveira, 1980- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

NAIARA DE MIRANDA BENTO RODRIGUES

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração em Sanidade Animal.

DISSERTAÇÃO APROVADA 26/02/2016



“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

Dedico este trabalho a
Deus pela força ; aos meus pais e
aos amigos, pelo amor e apoio
recebido.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus presente em todos os momentos da minha vida. Pelo conforto espiritual, sustentação para vencer e perseverança para não desistir em meio às dificuldades.

À minha família, meus pais, por toda a compreensão e incentivo. Em especial, ao meu pai Wandir Bento Rodrigues que me apoiou de forma incondicional.

À minha orientadora, Professora Doutora Shana de Mattos de Oliveira Coelho, pelo apoio fundamental para meu ingresso no mestrado, pelo exemplo de competência, profissionalismo e respeito ao próximo. Pela excelente orientação, foi presente, discutiu cada resultado com muita sabedoria, se dedicou e apoiou em todos os momentos com eternos ensinamentos, sempre disponível e atenciosa, tornando possível a conclusão deste trabalho. Pelas oportunidades que me proporcionou meus sinceros agradecimentos.

À Professora Doutora Miliane Moreira Soares de Souza, pelos ensinamentos acadêmicos e pessoais, os quais foram essenciais para a minha formação.

À professora Doutora Irene da Silva Coelho, por todo auxílio dedicado as etapas de extração de DNA e aos PCRs realizados durante este projeto, pelos ensinamentos, pela paciência, carinho e amizade. Agradeço por tudo que fez por mim durante o período de convivência que tivemos.

À amiga, Greiciane Franca Bronzato, por sua amizade e companheirismo. Por sua paciência, perseverança e organização impecável dedicados na realização deste trabalho. Muito Obrigada!

Aos amigos, Gabrielli Stefaninni Santiago, Bruno Oliveira de Carvalho, Dayanne Araujo de Melo, Viviane Figueira Marques e Bianca da Silva Soares, pela competência, pelos valiosos ensinamentos e presença em etapas muito importantes deste projeto. Muito Obrigada!

À todos os amigos e colegas do Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária da UFRRJ pela convivência, amizade, compreensão e incentivo: Marisol Alvim Gomez, Daniel Paiva Barros de Abreu, Ramon Pimenta, Tatiane Abreu de Alencar, Jessica de Oliveira, Philipi Estevão da Silva, Cristine da Cunha Giugni, Cassia Couto da Mota e Felipe Dubenczuk .

Aos produtores de leite Júlio e Cíntia, pela luta e esforço diário na atividade leiteira, e por abrirem a porteira de sua propriedade para o desenvolvimento desta pesquisa.

As Professoras da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Beatriz Meurer Moreira e Marcia Giambiagi-deMarval, e à técnica Larissa Botelho pela oportunidade de utilização do equipamento de MALDI-TOF MS.

Ao Curso de PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS da UFRRJ, e aos funcionários, pelo apoio em materiais e pelas condições que recebemos para trabalhar e estudar.

A Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas de estudos e pelos patrocínios concedidos a diversos projetos, possibilitando desta forma, a aquisição de material e equipamentos e a realização dos experimentos.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pelos amigos que fiz e pela formação que recebi.

A todas as pessoas que contribuíram, direta ou indiretamente, para a execução desta dissertação.

BIOGRAFIA

Naiara de Miranda Bento Rodrigues possui graduação em Zootecnia pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, ingressou em 2009 com término em janeiro de 2014.

No segundo ano de graduação (2010) foi estagiária no Instituto de Zootecnia da UFRRJ, sendo bolsista de Apoio Técnico do setor de Caprinocultura, auxiliando na condução de experimento na área de nutrição de ruminantes. Durante o período de 2011 a 2013 estagiou no Laboratório de Bacteriologia Veterinária da UFRRJ, realizando isolamento e caracterização de bactérias presentes em diferentes tratamentos de solos, por meio de análises fenotípicas e genotípicas. Em paralelo, no ano de 2013 foi bolsista de apoio técnico no setor de equinos e suínos do Instituto de Zootecnia, desenvolvendo atividades na identificação dos animais, diferenciação morfológica das raças, nomenclatura das regiões zootécnicas anatômicas e participação do grupo de estudo.

Em 2014, foi aprovada no processo de seleção do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, nível Mestrado, sob a orientação da professora Dra. Shana de Mattos de Oliveira Coelho e em dezembro de 2015 foi selecionada para ingresso do doutoramento no mesmo curso.

RESUMO

RODRIGUES, Naiara de Miranda Bento. **Identificação de enterobactérias e a distribuição destes agentes em ambiente de produção leiteira.** 51p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária. Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

A mastite bovina afeta negativamente a produção de leite dificultando a recuperação dos níveis de produção total das propriedades leiteiras, levando a perdas econômicas consideráveis. Esta redução no percentual da produção de leite pode estar associada ao agente patogênico específico que causou a infecção, sendo as enterobactérias frequentemente responsáveis pela mastite ambiental. Estes microrganismos são preferencialmente encontrados no habitat normal dos animais como locais que apresentam esterco, urina, barro e camas orgânicas. Os testes fenotípicos estão entre os métodos disponíveis atualmente utilizados para identificar as enterobactérias; no entanto, eles podem ocasionalmente identificar erroneamente algumas espécies apesar dos múltiplos ensaios realizados. Além disso, a demora na sua execução pode tardar a antibioticoterapia realizada em campo. Por outro lado, a técnica de MALDI-TOF MS tem atraído a atenção pela sua identificação precisa dos vários microrganismos em nível de espécie. No presente estudo, um total de 183 enterobactérias foram isoladas a partir de amostras de leite (n=47) e fezes colhidas de vacas em lactação (n=94); amostras de água (n=23) e na linha de ordenha (n=19) em uma propriedade situada no Rio de Janeiro. A proposta foi utilizar a técnica de MALDI-TOF MS como um método eficaz de identificação bacteriana de enterobactérias e descrever a permanência destes microrganismos no ambiente de produção leiteira. A técnica proteômica confirmou 92,9% (170/183) das espécies de enterobactérias identificadas pelos testes bioquímicos convencionais. O sequenciamento do gene *gyrB*, realizado em oito das 13 enterobactérias que apresentaram identificação discordante, confirmou em 100% o resultado da técnica proteômica, que foi utilizada como metodologia de referência no presente estudo. O gênero *Enterobacter* foi o mais discordante pelo método bioquímico (76,9%, 9/13). A *E.coli* foi a espécie predominante (83%, 152/183) em todas as amostras avaliadas, sendo que o leite bovino apresentou maior diversidade de enterobactérias. Não foi detectada a presença de *Salmonella* spp. nas amostras de fezes bovinas e todas as amostras de água dos diferentes pontos de coleta da propriedade apresentaram padrões microbiológicos inaceitáveis. Foram isoladas enterobactérias das mãos e cavidades nasal dos ordenhadores, bem como nas ordenhadeiras mecânicas utilizadas na propriedade. Estes dados visam contribuir de forma significativa para a caracterização das enterobactérias bem como para a compreensão e sua descrição no ambiente de produção leiteira, auxiliando no diagnóstico preciso dos possíveis agentes envolvidos na mastite bovina bem como na implementação de medidas profiláticas devidamente direcionadas.

Palavras-chave: Mastite bovina, Enterobactérias, MALDI-TOF.

ABSTRACT

RODRIGUES, Naiara de Miranda Bento. **Enterobacteria identification and distribution of these agents in dairy production environment**. 51p. Dissertation (Master's in Veterinary Science). Veterinary Institute, Department of Animal Parasitology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

Mastitis adversely affects milk production and in general cows do not regain their full production levels post recovery, leading to considerable economic losses. Moreover the percentage decrease in milk production depends on the specific pathogen that caused the infection and enterobacteria are responsible for this greater reduction. These microorganisms are preferentially found in the habitat of animals in places contaminated with feces, urine, clay and also organic beds. Phenotypic tests are among the currently available methods used worldwide to identify enterobacteria; however they tend to misdiagnose the species despite the multiple tests carried out and they can delay the antibiotic therapy by clinic veterinary. On the other hand the MALDI-TOF MS technique has been attracting attention for its precise identification of several microorganisms at species level. In the current study, 183 enterobacteria were detected in milk (n=47) and fecal samples (n=94) collected from cows; also water (n=23) and milk line samples (n=19) collected from a farm in Rio de Janeiro with the purpose to present the MALDI-TOF MS technique as efficient methodology and also as a “gold standard” to better understand the possible current biochemical errors in enterobacteria identification considering isolates from bovine environments. This proteomic technique confirmed 92.9% (170/183) of the enterobacteria species identified by biochemical tests that showed high sensitivity (> 81%) and specificity (> 89%). The *gyrB* sequencing was made in eight from thirteen misidentified enterobacteria and confirmed 100% the MALDI-TOF results, so the proteomic technique was used as a “gold standard” for this study. The amino acid decarboxylation test made the most misidentifications and *Enterobacter* spp was the largest misidentified genus (76.9%, 10/13). *E.coli* was prevalent (83%, 152/183) in all samples and the bovine milk presented the most enterobacteria diversity. The *Salmonella* sp wasn't detected in feces bovine samples and all water samples from different points in the farm presented unacceptable microbiological standards. Was identified enterobacteria in milkers hands and nasal cavity also in the milking machines used on the property. These results aim to contribute significantly to the characterization of the Enterobacteriaceae as well in understanding of its spread in dairy production environment , assisting in need diagnostic of possible agents involved in bovine mastitis as well as to implement properly targeted prophylactic measures.

Keywords: Bovine Mastitis, Enterobacteria, MALDI-TOF.

ÍNDICE DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1	Aplicação da solução matriz ao depósito de colônia bacteriana na placa metálica, para realização da Técnica de MALDI-TOF.	08
Figura 2	Princípios da tecnologia de espectrometria de massa por ionização/dessorção de matriz assistida por laser por tempo de voo MALDI-TOF.	09
Figura 3	Realização do California Mastitis Teste (CMT) de todas as vacas em lactação do rebanho para detecção da mastite subclínica. Análise realizada pela equipe do laboratório de Bacteriologia Veterinária da UFRRJ.	15
Figura 4	Amostra de leite cru coletada de cada animal em lactação para o monitoramento do rebanho.	15
Figura 5	Coleta de fezes frescas diretamente da ampola retal com luvas estéreis, antecedendo a ordenha matinal.	16
Figura 6	Amostras de água coletadas dos pontos (A) poço, (B) açude, (C) torneira da sala do leite, (D) bebedouro dos animais, provenientes da propriedade leiteira em estudo. (foto: acervo pessoal)	17
Figura 7	Isolamento em meio seletivo Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) com crescimento de colônias características de <i>Escherichia coli</i> .	17
Figura 8	Diferentes resultados do Ágar Kligler Iron nos isolados bacterianos das amostras de leite, fezes e água.	19
Figura 9	Prova de descarboxilação dos aminoácidos utilizada para a identificação bioquímica nos isolados das amostras de leite, fezes e água, onde se observa resultado positivo (A) e resultado negativo (B).	20
Figura 10	Prova de Voges-Proskauer (VP) utilizada para a identificação bioquímica nos isolados das amostras de leite, fezes e água, onde se observa resultado positivo (A) e resultado negativo (B).	20
Figura 11	Prova Vermelho de Metila (VM) utilizada para a identificação bioquímica nos isolados das amostras de leite, fezes e água, onde se observa o resultado negativo (A) e positivo (B).	21

Figura 12	Prova do SIM utilizada para avaliação da produção de Indol, Ácido sufrídrico e Motilidade nos isolados das amostras de leite, fezes e água.	21
Figura 13	Prova do Citrato utilizada para identificação bioquímica nos isolados de amostras de leite, fezes e água, onde se observa resultado positivo (A) e resultado negativo (B).	22
Figura 14	Prova do Malonato utilizada para identificação bioquímica no isolados de amostras de leite, fezes e água, onde se observa resultado positivo (A) e resultado negativo (B).	22
Figura 15	Prova da Urease para a identificação nos isolados provenientes de amostras de leite, fezes e água, onde se observa resultado negativo (A) e resultado positivo (B).	23
Figura 16	Amostras cultivadas em ágar BHI foram transferidas para a microplaca de metal; 2. Solução da Matriz foi adicionada ao sedimento bacteriano para serem processados; 3. Microplaca de metal foi introduzida ao espectrômetro de massa MALDI , e os espectros obtidos da amostra desconhecida foram confrontados com o software do computador.	25

ÍNDICE DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1	Enterobactérias provenientes de amostras de ambiente bovino identificadas pelos métodos bioquímicos e pelo MALDI-TOF MS. 28
Tabela 2	Resultados do seqüenciamento de gene <i>gyrB</i> em enterobactérias previamente identificadas pelos testes bioquímicos e MALDI-TOF MS. 29
Tabela 3	Espécies de enterobactérias identificadas pelo MALDI-TOF isoladas de diferentes amostras coletadas de ambiente leiteiro. 32
Tabela 4	Média do número mais provável de Coliformes Totais e Coliformes termotolerantes em amostras dos diferentes pontos da propriedade. 34
Tabela 5	Resultados das análises estatísticas nas diferentes estações do ano, através do Teste de Mann-Whitney (p-valor = 0,05). Em destaque diferenças significativas. 35
Tabela 6	Resultados das análises estatísticas nos cinco diferentes pontos coletados, através do Teste de Mann-Whitney a 5% de probabilidade (p-valor = 0,05). 36

ÍNDICE DE QUADROS

	Pág.
Quadro 1 Reações no meio de triagem Kligler Iron Agar (FIOCRUZ, 2006).	19
Quadro 2 Diferenciação de Enterobacteriaceae por testes bioquímico, segundo Koneman et al.,(2008).	24
Quadro 3 Primers degenerados empregados na amplificação do gene <i>gyrB</i> para as estirpes de Enterobacteriaceae.	26

LISTA DE ABREVIACÕES

μM = Micromolar

$^{\circ}\text{C}$ = graus Celsius

μL = Microlitro

BHI = Infuso Cérebro Coração

CCS = Contagem de Células Somáticas

DNA = Ácido Desoxiribonucléico

dNTP = desorribonucleotideo trifosfatado

EC = *Escherichia coli*

EMB = Ágar Eosina Azul de Metileno

H_2S = Sulfeto de Hidrogênio

IN = Instrução Normativa

KCL = Cloreto de Potássio

kDa = kilo-Dalton

KOH = Hidróxido de Potássio

LBVB = Lactose Bile Verde Brilhante

LST = Lauril Sulfato Triptose

MALDI-TOF MS = Espectrometria de Massa por Tempo de Voo de Ionização/Dessorção por Laser Assistida por Matriz

NCBI = Nacional Centro de Informações sobre Biotecnologia

Nm = nanômetro

NMP = Número Mais Provável

pb = pares de base

PCR = Reação em cadeia de polimerase

pH = Potencial Hidrogeniônico

rep- PCR= repetitiva sequencia baseada em reação em cadeia de polimerase

RNA = ácido ribonucléico

rpm = rotação por minuto

rRNA= ácido ribonucléico ribossomal

SIM= Ácido sulfídrico, Indol e Motilidade

TOF= tempo de voo

UV= Ultra Violeta

VM = Vermelho de Metila

VP = Voges-Proskauer

SUMÁRIO

	Pág
1.INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Mastite Bovina	3
2.2. Enterobactérias associadas à mastite bovina	5
2.3. Métodos de Identificação de Enterobactérias Aplicados no Laboratório de Diagnóstico Microbiológico.	5
2.3.1. Métodos Bioquímicos	6
2.3.2. Métodos Proteômicos - MALDI-TOF MS	7
2.3.3. Métodos Genotípicos	10
3. OBJETIVOS	13
3.1. Objetivo geral	13
3.2. Objetivos específicos	13
4. MATERIAL E MÉTODOS	14
4.1. Local de coleta	14
4.2. Amostragem	14
4.3. Diagnóstico da Mastite	14
4.4. Coleta das Amostras de Leite	15
4.5. Coleta das amostras da Linha de ordenha	16
4.6. Coleta das Amostras de Fezes Bovinas e Água	16
4.7. Isolamento Bacteriano e Testes Microbiológicos Presuntivos	17
4.8. Identificação das Enterobactérias	18
4.8.1. Diagnóstico presuntivo através do meio de triagem Kligler Iron Agar	18
4.8.2. Avaliação do perfil bioquímico	19
4.8.3. Identificação das enterobactérias por MALDI-TOF MS	25
4.8.4. Identificação das enterobctéias através das técnicas genotípicas	25

4.8.4.1. Extração rápida do DNA total bacteriano	25
4.8.4.2. Amplificação do gene <i>gyr B</i> por PCR(<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	26
4.8.4.3. Sequenciamento	26
4.9. Análise estatística	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
6. CONCLUSÕES	37
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
8. ANEXOS	46
ANEXO A - Resultados dos testes de diagnóstico para detecção da mastite bovina utilizados no presente trabalho.	46
ANEXO B - Enterobactérias presentes em vacas mastíticas e não mastíticas	49
ANEXO C - Número Mais Provável de coliformes totais e termotolerantes em amostras de água coletadas em cinco pontos distintos da propriedade de acordo com as estações do ano.	51

INTRODUÇÃO

O Brasil é o quinto maior produtor de leite do mundo e teve uma produção de 6.128 bilhões de litros no primeiro semestre 2015. O gado leiteiro está presente em todo o Brasil sendo extremamente importante para a economia do país pois contribui para a geração de emprego, desenvolvimento regional, da agricultura e laticínios.

No entanto, a mastite bovina ambiental é um grande desafio no setor primário da cadeia produtiva, uma vez que provoca uma queda na produção de leite, descarte precoce de animais, elevados custos de tratamento e possui efeito negativo sobre a qualidade do leite, podendo interferir no processamento industrial de produtos lácteos.

A mastite do tipo ambiental está associada principalmente a bactérias Gram negativas, em especial às pertencentes à família Enterobacteriaceae. Elas colonizam intestinos de mamíferos e aves e podem infectar as glândulas mamárias após a ordenha devido ao contato do úbere com água contaminada, ambiente de ordenha e estábulo contaminado com fezes. Por isso, a caracterização dos agentes circulantes no ambiente de produção leiteira torna-se uma ferramenta importante na compreensão da etiologia da enfermidade bem como no auxílio para elaboração de medidas preventivas.

A família Enterobacteriaceae tem mais de 53 gêneros e mais de 200 espécies. Os gêneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* e *Proteus* são frequentemente isolados de ambientes leiteiros. A *Escherichia coli* está naturalmente presentes nas fezes de espécies de animais de sangue quente. *Klebsiella* spp, *Enterobacter* spp e *Serratia marcescens* habitam predominantemente os solos, grãos e água. O gênero *Proteus* é geralmente contaminante de água já tendo sido isolado de mangueira utilizada para lavar tetas antes da ordenha. Assim, a caracterização da espécie de enterobactéria circulante em um ambiente de produção leiteira é essencial para compreender a sua importância como agentes de mastite bovina, bem como as suas vias de contaminação.

A identificação das bactérias na maioria dos laboratórios de microbiologia clínica veterinária ainda é baseada em testes fenotípicos e a qualidade bem como o tempo de execução desta identificação pode impactar a gestão clínica veterinária em campo. Sabe-se que algumas estirpes dentro de uma espécie de enterobactérias podem ter pequenas diferenças bioquímicas que resultem em falsos resultados *in vitro*. Além disso, algumas propriedades fenotípicas são instáveis e, por vezes, a sua expressão é dependente de mudanças nas condições ambientais, por exemplo, o substrato de crescimento, a temperatura e os níveis de pH. A subjetividade de testes fenotípicos bem como a demora na leitura dos mesmos, tem aumentado a busca por mais técnicas definitivas em identificação bacteriana, tais como ferramentas proteômicas e moleculares.

A técnica de MALDI-TOF MS (Espectrometria de Massas por Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz) é um método que baseia-se na determinação precisa da massa proteica bacteriana, que quando comparado a disponíveis perfis armazenados numa base de dados de software, gera a identificação da espécie em poucos minutos. Esta técnica proporciona resultados rápidos e precisos na identificação de espécies, otimizando assim o diagnóstico microbiológico geral.

Dentre os métodos moleculares de caracterização de enterobactérias, o gene *gyrB* - que codifica a subunidade girase ou a topoisomerase II do DNA, tem sido considerado mais discriminativo do que 16S rRNA, pois possibilita a diferenciação e identificação de espécies extremamente relacionadas dentro do grupo das enterobactérias.

Frente a estes dados, este estudo visou utilizar a técnica de MALDI - TOF MS para identificação de enterobactérias presentes em ambiente de produção leiteira, bem como

avaliar os métodos bioquímicos convencionais de identificação em comparação à técnica proteômica confirmando os equívocos encontrados através de sequenciamento do gene *gyrB*. Acredita-se que estes dados podem auxiliar na busca de uma metodologia de caracterização bacteriana precisa e rápida, bem como a compreensão da distribuição destes agentes no ambiente de produção leiteira de modo a auxiliar na implementação de medidas profiláticas devidamente direcionadas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Mastite Bovina

A mastite é uma doença complexa de caráter multifatorial, que pode envolver mais de 130 agentes segundo a literatura, incluindo-se bactérias, fungos, algas e vírus (SILVA et al., 2008). O caso mais freqüente dos processos inflamatórios da glândula mamária bovina apresenta etiologia bacteriana. O processo infeccioso se inicia quando a bactéria invade a glândula mamária pelo canal do teto e multiplica-se no interior dos tetos mamários. Após invasão da glândula mamária, ocorre intensa migração de leucócitos do sangue para o leite, com o objetivo de eliminar o agente infeccioso e alterações da permeabilidade vascular e outros sinais da inflamação (SANTOS & FONSECA, 2007).

A inflamação na glândula mamária é um dos grandes desafios para a bovinocultura leiteira, uma vez que acarreta muitos prejuízos para toda a cadeia agroindustrial do leite. A mastite infecciosa representa um sério problema tecnológico para as indústrias beneficiadoras por possuírem um número aumentado de células somáticas (CCS), além de diminuir a qualidade do leite em nível nutricional e higiênico para o consumidor (LANGONI et al., 2009; SIMOJOKI, 2011). Considerando os prejuízos relacionados ao sistema de produção, destaca-se à intensidade do quadro clínico que pode acarretar morte do animal infectado devido aos efeitos sistêmicos das endotoxinas liberadas por esses agentes, a redução na produção de leite devido à lesão ocorrida no tecido glandular, descarte do leite em função do tratamento, devido à presença de resíduos de antibióticos, elevados custos com tratamentos e serviços com médico veterinário (HOGAN & SMITH, 2012).

A mastite pode ser classificada quanto à forma de manifestação, em mastite clínica, quando existem sinais evidentes de inflamação, como edema, aumento de temperatura, endurecimento e dor na glândula mamária, e/ou aparecimento de grumos, pus ou qualquer alteração das características do leite, e ainda sintomas sistêmicos como depressão, desidratação e diminuição da ingestão de alimento. Estes sintomas podem ser verificados através do exame físico do úbere por inspeção e palpação, além de coleta dos primeiros jatos de leite para realização de teste da caneca telada para detecção de alterações no aspecto do leite (CUNHA, 2006).

Já na forma subclínica, não ocorrem mudanças visíveis no aspecto do leite ou do úbere. Neste caso, o diagnóstico pode ser realizado através da contagem de células somáticas (CCS) no leite, estas são compostas por dois tipos de células principais: células de descamação do epitélio secretor e leucócitos de origem do sangue. Desta forma a (CCS) reflete o estado de saúde da glândula mamária e mede o risco de ocorrência de alterações não fisiológicas na composição do leite, constituindo uma ferramenta imprescindível na avaliação e monitoramento da saúde do úbere (BLOWEY & EDMONDSON, 2010). Contudo o teste mais usual para este diagnóstico é o *California Mastitis Test* (CMT). O CMT é um teste qualitativo que indica a presença de células somáticas em maior ou menor grau no leite. Este consiste na coleta de leite dos quartos mamários, individualmente, em uma bandeja apropriada, adicionando-se um detergente aniônico neutro, o qual atua rompendo a membrana dos leucócitos, liberando o material nucléico (DNA), que apresenta uma massa de aspecto gelatinoso. Ambos os testes, devem ser confirmados através de diagnóstico microbiológico (RIBEIRO, 2006). Uma vez acometido, o quarto mamário com mastite pode evoluir para cura espontânea ou, na maioria das vezes, para um quadro crônico, tornando-se necessária a

identificação do agente causador para adequar as medidas de controle e tratamento (OLIVER et al., 2004).

Em relação ao agente infeccioso, a mastite pode ser classificada como ambiental ou contagiosa (BLOWEY & EDMONDSON, 2010). Os casos de mastite contagiosa são caracterizados pela maior incidência da forma subclínica. São causados por patógenos cujo habitat preferencial é o interior da glândula mamária e a superfície da pele das tetas, sendo os patógenos mais comumente relacionados os *Staphylococcus* spp., *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium bovis* e *Mycoplasma* spp. A transmissão acontece principalmente no momento da ordenha, por meio de teteiras e pelo manejo dos ordenhadores (HOSSEINZADEH & SAEI, 2014).

A mastite ambiental é causada preferencialmente por microrganismos que vivem no ambiente de permanência das vacas e são chamados de patógenos ambientais, crescem em locais que apresentam esterco, urina, barro e camas orgânicas. Esse tipo de mastite caracteriza-se pela alta incidência de casos clínicos, geralmente de curta duração. A sua transmissão ocorre por contato direto da glândula mamária com material contaminado e principalmente no período entre as ordenhas (BLUM et al., 2014). Dentre as bactérias ambientais mais comumente encontrados nas fazendas leiteiras, destacam-se as espécies de bactérias gram-negativas principalmente os coliformes, anaeróbicos facultativos, fermentadores de lactose da família Enterobacteriaceae, contaminantes fecais ou ambientais (SANTIAGO et al., 2015)

Um aspecto importante a ser considerado sobre a ocorrência da mastite ambiental nas propriedades é a água utilizada no manejo. Segundo Miguel (2010), a carga microbiana inicial do leite está diretamente associada à qualidade da água utilizada para limpeza das teteiras mecânicas. Muitas propriedades não utilizam água tratada e historicamente, a incidência de contaminação das águas subterrâneas, principalmente de poços profundos, geralmente tem sido considerada baixa. No entanto, nos últimos anos, as atividades agrícolas, focadas em grandes operações de criação intensiva, têm criado condições ambientais que possibilitam a contaminação biológica das águas subterrâneas. Em particular, lençóis freáticos superficiais em solos arenosos, tem alto risco de estarem contaminados. Poços mal vedados e mal localizados também são responsáveis por uma grande percentagem dos aquíferos contaminados (Centro de Vigilância Epidemiológica/CVE/SES-SP).

A má qualidade da água associada à ineficiência da higienização de utensílios e equipamentos, como equipamentos de ordenha mecânica, latões e tanques de expansão são primordiais para o aparecimento da mastite. Segundo Oliver e colaboradores (2004), microrganismos provenientes de material fecal podem se aderir aos equipamentos de processamento de leite e/ou diretamente no úbere dos animais. É importante ainda que os animais permaneçam de pé após a ordenha para evitar a penetração de bactérias pelo canal do teto, que permanece aberto por um período variável entre 30 e 120 minutos. A adição de glicerina ao desinfetante do pós-*dipping* auxilia no selamento do esfíncter do teto permitindo que o desinfetante permaneça sobre a pele do animal até a próxima ordenha (HALTIA et al. 2006).

Por fim, ressalta-se a importância do fato de que a glândula mamária apresenta uma queda na imunidade durante as duas semanas após a secagem e nas três semanas após o parto, o que aumenta ainda mais o risco de novas infecções causadas por agentes ambientais, principalmente espécies da família das Enterobacteriaceae, presentes naturalmente no trato gastrointestinal de animais e encontrados em ambientes contaminados com fezes. Estes microrganismos, podem se comportar como patógenos oportunistas, possibilitando o aumento do número de casos clínicos de mastite pós-parto (LANGONI, 2013).

2.2. Enterobactérias associadas à mastite bovina

As enterobactérias são bactérias Gram negativas, com formato bacilar, aeróbias ou anaeróbias facultativas, que podem apresentar motilidade e fermentam variados açúcares sendo a fermentação de glicose obrigatória. Reduzem o nitrato, são catalase positivas e crescem em uma elevada gama de meios de cultura. Habitam comensalmente o trato gastrointestinal de vertebrados e estão entre os agentes patogênicos mais comuns que infectam seres humanos e animais (PATERSON, 2012).

Podem apresentar diversos fatores de virulência, como endotoxinas, adesinas, invasinas, cápsula, captação de ferro e fator necrosante citotóxico. Em especial, a endotoxina é frequentemente responsável pela patogenicidade e reações inflamatórias associadas à mastite quando liberada durante o crescimento e morte bacteriana, podendo acarretar a morte do animal devido ao seu efeito sistêmico (SANTOS, 2007; MADIGAN et al., 2010).

A família das Enterobacteriaceae é composta por mais de 53 gêneros com mais de 200 espécies (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy>). Considerando o ambiente leiteiro, os gêneros mais frequentes isolados de mastite ambiental são *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* e *Proteus*.

Os membros do gênero *Escherichia* habitam o intestino de animais de sangue quente, incluindo humanos, embora não sejam os organismos dominantes nesse habitat. Algumas linhagens são de grande importância para seus hospedeiros enquanto outras são patogênicas podendo causar doenças graves. *Escherichia coli*, um agente oportunista, é a espécie mais isolada em casos de mastite ambiental (SANTOS, 2007).

Outro agente de importância na mastite bovina é a *Klebsiella* spp, em especial a espécie *Klebsiella pneumoniae*. Essa bactéria está presente no ambiente e também na pele do teto podendo colonizar o tecido causando infecção que é potencializada pela presença de cápsula (ZADOKS et al., 2011). A *K. pneumoniae* tem sido relatada em diferentes países em surtos graves ou em casos isolados de mastite bovina aguda e superaguda, predominantemente nas primeiras duas semanas de lactação. Estes estudos propõem a hipótese de que o excremento fecal, bem como o excesso de material orgânico no ambiente da vaca, está associado à mastite bovina por esse microrganismo (RADOSTITS et al., 2007; MUNOZ et al., 2006).

O gênero *Serratia* pode ser isolado de água, esgoto, intestino de animais e humanos, podendo também causar mastite em bovinos pela sua disseminação no ambiente (MADIGAN et al., 2010; ZADOKS et al., 2011). Assim como o gênero *Proteus* que frequentemente é encontrado como contaminante de água de mangueira usadas para lavar úberes antes da ordenha facilitando assim a sua disseminação (ZADOKS et al., 2011).

As espécies *Cronobacter sakazakii* (*Enterobacter sakazakii*), *Pantoea agglomerans* (*Enterobacter agglomerans*) e *Enterobacter cloacae* podem ser isoladas de alimentos, enquanto *Enterobacter aerogenes* e *Enterobacter cloacae* estão mais associados a casos de mastite bovina. (HEALY et al., 2010; AL-HOLY et al., 2009).

2.3. Métodos de Identificação de Enterobactérias Aplicados no Laboratório de Diagnóstico Microbiológico.

A qualidade da identificação microbiana pode impactar a gestão clínica veterinária tornando-se uma tarefa essencial para controlar a mastite bovina. A identificação das bactérias em laboratórios de microbiologia clínica de rotina ainda é baseada em testes fenotípicos, e especificamente no caso das enterobactérias, muitas barreiras são impostas devido à proximidade bioquímica de alguns gêneros bem como as pequenas diferenças existentes entre

determinadas espécies. Esta subjetividade e principalmente a demora na execução e leitura dos testes tem aumentado a busca por técnicas definitivas de identificação bacteriana tais como ferramentas proteômicas e genotípicas (ROSSELLÓ-MORA & AMANN, 2001).

2.3.1. Métodos Bioquímicos

As primeiras investigações bioquímicas substanciais de espécies bacterianas ocorreram durante o final do século XIX e início do século XX. Os primeiros estudos separavam os grupos de bactérias com base na morfologia, tamanho e motilidade. Um pesquisador pioneiro durante este período foi Ferdinand Cohn, que apoiou o conceito de diversidade de microrganismos e argumentou que, dentro de espécies, variedades surgiam e transmitiam suas características para a próxima geração. O desenvolvimento de meios à base de Agar conduziu ao isolamento *in vitro* e propagação de culturas puras. Esta descoberta contribuiu muitas vezes para observação da aparência morfológica de colônias bacterianas, sendo suficiente para a sua identificação no laboratório (ROSSELLÓ-MORA & AMANN, 2001).

No entanto, por causa do número limitado de testes bioquímicos e fenotípicos disponíveis na época, não era possível chegar à caracterização das espécies bacterianas com precisão. Este problema induziu por diversas vezes a equívocos e resultou na descoberta e redescoberta das mesmas espécies bacterianas por diferentes pesquisadores, que deram aos mesmos táxons nomes novos com base em sua morfologia ligeiramente diferente e aos critérios fenotípicos. A *Klebsiella pneumoniae* é um exemplo da grande dificuldade taxonômica, este membro da família Enterobacteriaceae foi listado em seis gêneros diferentes, com sete diferentes epítetos espécie, entre 1885 e 1928 (JANDA & ABBOTT, 2002).

Até os dias de hoje, as rotinas de laboratórios de microbiologia clínica ainda se baseiam nas identificações preliminares da maioria das bactérias cultiváveis. Assim, para que o cultivo bacteriano se torne ideal é essencial a escolha correta do meio de cultura, levando em consideração o microrganismo a ser isolado e condições ótimas de incubação, em seguida são necessárias observações cautelosas quanto à morfologia, desenvolvimento metabólico e propriedades bioquímicas dos microrganismos. Os laboratórios devem desenvolver e realizar um processo de identificação padrão de atividades diárias, utilizando sequencialmente ou simultaneamente um conjunto de testes cuja finalidade seja a identificação do microrganismo ao nível de gênero e espécie (ISENBERG, 2004).

No processo de identificação bacteriana tradicional, a experiência de um microbiologista é fundamental para a escolha de um ou mais testes laboratoriais em função da confiabilidade dos mesmos, considerando o gênero ou a espécie bacteriana para ser identificada, a origem do isolado bacteriano e a viabilidade econômica para o respectivo uso. Logo, a experiência profissional minimiza o erro da identificação, visto que muitos testes bioquímicos são subjetivos quanto a sua interpretação na maioria dos casos (BOU et al., 2011).

Dentre as baterias de provas bioquímicas utilizadas para a caracterização da diversidade bacteriana, os testes mais utilizados para enterobactérias são os testes preliminar e leitura imediata como, por exemplo, coloração de Gram, catalase e oxidase, além dos testes lentos, de leitura partir de 24 h, 48 h a até 6 dias para concluir, como redução de nitrato, motilidade, produção de ácidos mistos, indol, acetoina, urease e sulfeto de hidrogênio, fermentação de açúcares com ou sem produção de gás, descarboxilação de aminoácidos e utilização de citrato e malonato como única fonte de carbono.

Além da desvantagem relacionada ao tempo de leitura, é importante ressaltar que algumas espécies, como as do gênero *Enterobacter*, são difíceis de serem diferenciadas por

estes testes convencionais (HOFFMANN & ROGGENKAMP, 2003). Em adição, bactérias que exibem perfil bioquímico atípico e aquelas que pertencem a espécies raras podem ser identificadas incorretamente (WOO et al., 2001). Em particular, quando consideramos o caso da mastite bovina, a demora das respostas para o clínico em campo dificulta a tomada de decisões de manejo e controle da doença em nível de rebanho.

2.3.2. Métodos Proteômicos - MALDI-TOF MS

A palavra proteoma apareceu pela primeira vez em 1996 para se referir ao complemento de proteínas de uma célula expressa por um genoma, e assim veio o nome proteômica, designando o estudo do proteoma (NEIDHARDT, 2011). Proteômica pode ser definida como o estudo geral das proteínas e enzimas ou ainda, o estudo integrado da soma de todas as proteínas produzidas pelos organismos ou grupo de organismos (JAMESDANIEL et al., 2009).

Os estudos de proteômica foram idealizados para produzir tanto informações qualitativas sobre proteínas (identificação, distribuição, interações, estrutura e função) quanto informações quantitativas (abundância, distribuição dentro de diferentes localizações, variações temporais de abundância devido a síntese e degradação ou ambos) e muitas proteínas podem ainda revelar surpresas mesmo após anos de estudo. A investigação de um proteoma inteiro ou qualquer mistura complexa de proteínas é algo grandioso e consequentemente requer um trabalho intensivo (OTTO et al., 2012).

Tais fatos incentivaram pesquisadores a desenvolverem atalhos na forma de um amplo arsenal de tecnologias e banco de dados atualizados voltados para a determinação da função protéica em nível celular, sendo que as técnicas mais utilizadas são as baseadas em eletroforese e espectrometria de massas (BOU et al., 2011; COX et al., 2012).

A espectrometria de massas por ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS) é um método rápido, preciso e eficaz em termos de caracterização microbiana e tem sido muito utilizada em laboratórios de microbiologia clínica. As primeiras tentativas de identificar microrganismos utilizando a espectrometria de massa foram realizadas em 1975 pelos pesquisadores Anhalt e Fenselau (ANHALT & FENSELAU, 1975). No entanto, estas experiências culminavam em resultados irreprodutíveis devido às variabilidades originadas pelas condições de crescimento e meios de cultura. Somente em 1980, com o desenvolvimento da MALDI-TOF MS a análise de grandes biomoléculas, incluindo proteínas ribossômicas maiores, se tornou possível (BIZZINI & GREUB, 2010).

Esta técnica começou a se tornar mais popular no final da década de 90 para a rápida identificação de bactérias, fungos e leveduras, principalmente em nível de gênero e espécie. A partir deste momento, o número de publicações considerando a técnica MALDI-TOF para investigação e identificação de proteínas e peptídeos, identificação taxonômica de microrganismos, investigação de modificações pós-transcricionais no RNA dentre inúmeras outras aplicações, tem crescido exponencialmente (CROXATTO et al., 2012).

Para a identificação de microrganismos por MALDI-TOF MS, um composto, chamado de matriz, é utilizado para auxiliar na dessorção e ionização das partículas de microrganismos através da energia do laser. Este se caracteriza por um laser de N₂ de comprimento de onda de 336 nm, frequência de 60 Hz e tempo de vida de milhões de disparos. A matriz é misturada na amostra de colônia bactéria ou fungo, promovendo assim a evaporação dos solventes e cristalização. O depósito formado pela amostra e pela matriz é realizado sobre uma placa metálica que pode conter diversas divisões que acomoda 48 a 96 amostras, dependendo do aparelho a ser utilizado (**Figura 1**). A matriz pode ser composta de derivados de ácido cinâmico ou benzóico, diluídos em um solvente orgânico e água, ou ainda

em ácido trifluoracético. A escolha da matriz adequada permite a obtenção de espectros com melhor qualidade, pela ótima razão entre sinal e ruído e picos estreitos, favorecendo a análise final do espectro de massas (SANTOS et al., 2010).

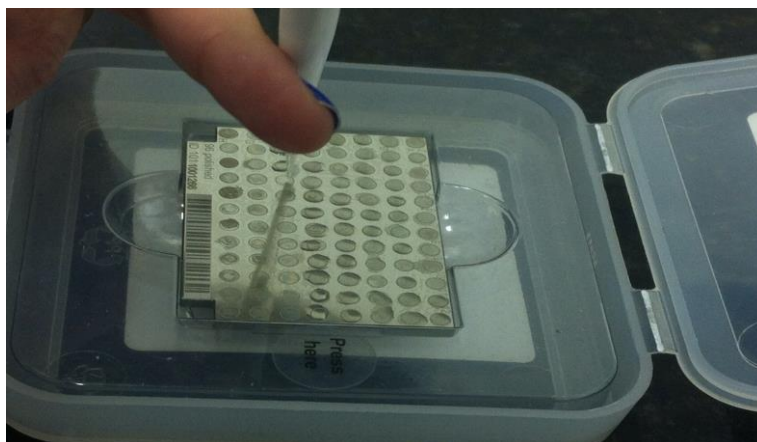


Figura 1 Aplicação da solução matriz ao depósito de colônia bacteriana na placa metálica, para realização da Técnica de MALDI-TOF.

A placa metálica é introduzida no espectrômetro de massa e feixes de laser UV de determinados comprimentos de onda são emitidos em cada depósito. A matriz absorve a energia do laser e ocorre a evaporação das amostras com a formação de íons com massas diferentes. Os íons formados com carga +1 são acelerados sob a influência do campo elétrico de carga positiva para um tubo de vácuo, o analisador de massa (TOF; tempo de voo), no qual em sua extremidade se encontra o detector. Os íons menores chegam mais rapidamente ao detector. O tempo de voo de cada partícula até o detector é utilizado para calcular sua massa. O analisador TOF determina a razão da massa molecular pela carga (m/z) dos íons por meio da mensuração da velocidade destes, após a calibração do instrumento com moléculas de pesos conhecidos (SANTOS et al., 2010). Os íons são separados pela razão massa/carga, entretanto, a carga é praticamente única, sendo o peso molecular a variável que efetivamente separa as moléculas (PATEL, 2015). Todo este processo ocorre de forma muito rápida, em menos de 1 minuto por amostra.

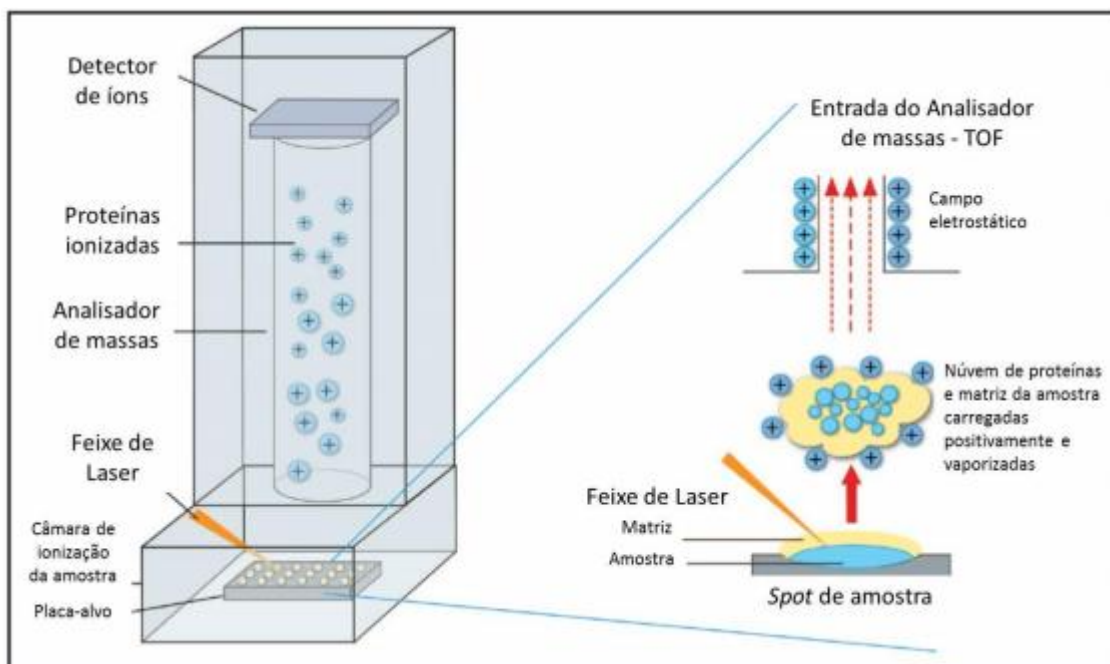


Figura 2. Princípios da tecnologia de espectrometria de massa por ionização/dessorção de matriz assistida por laser por tempo de voo MALDI-TOF.

As proteínas ribossomais são muito abundantes nos microrganismos e, portanto, constituem os principais componentes de avaliação pelo espectro de massa. Com base no perfil das proteínas ribossomais, que variam de 2 a 20 kDa, que é único para cada espécie de microrganismo, o espectro de massa obtido é comparado a um banco de espectros de referência como um todo. O microrganismo com espectro de massa mais relacionado é identificado e a medida da confiança desta análise é indicada por um valor, que difere de um sistema para outro (SUAREZ et al., 20015).

A identificação bacteriana através do MALDI-TOF MS foi proposta em dois métodos gerais. O primeiro compara os espectros de massa com o banco de dados de impressões digitais e o segundo, harmoniza massas de biomarcadores para um banco de dados proteômico. Na primeira abordagem, espectros únicos gerados de células intactas são comparados com bibliotecas de impressões digitais, coletadas anteriormente, que estão disponíveis comercialmente. Este método pode ser utilizado para a identificação de espécies e subespécies, independentemente das condições de cultura utilizadas para o microrganismo crescer, além de ser um método rápido e simples que pode ser facilmente adaptável no uso rotineiro de laboratórios de diagnóstico (CARBONNELLE et al., 2010). Na segunda abordagem, as massas de biomarcadores associadas com um microrganismo desconhecido são identificadas correspondendo massas moleculares de proteínas no espectro com massas moleculares de proteína prevista a partir de genoma seqüenciado. Um algoritmo prevê disponíveis massas de proteínas *in silico* dos genomas e procura correspondência com massas experimentalmente derivadas. No entanto, esta aplicação é limitada a microrganismos do qual genomas são seqüenciados e a necessidade de mais estratégias desenvolvidas para a organização do proteoma na base de dados (CROXATTO et al., 2012).

O objetivo final de técnicas de espectrometria de massa aplicadas à identificação bacteriana é determinar o gênero e espécie de microrganismo. É imprescindível que este resultado seja correto devido suas implicações clínicas, sendo assim, os principais fatores que influenciam a qualidade da identificação de microrganismos pela espectrometria de massa são

a pureza das cepas a serem identificadas e a quantidade de material biológico disponível. As plataformas comerciais de espectrometria de massa MALDI-TOF para identificação microbiana informam o usuário sobre o grau de confiança dos resultados de identificação para cada amostra (BOU et al., 2011).

Em particular, o *software* MALDI Biotyper versão 2.0 analisa os picos obtidos e, após comparação com os picos da base de dados é obtido um *score* logarítmico avaliada com base no grau de identidade ou semelhança, para definir espécies: ≥ 2 ; $<2 \geq 1,7$: gênero, $<1,7$ ausência de identificação, respectivamente. Entretanto, no *software* Saramis, o resultado é expresso como percentagem de identidade (BOU et al., 2011).

No momento em que o resultado de identificação na faixa aceitável é obtido pela técnica comercial, é importante a experiência do microbiologista para validar essa identificação. Uma vez validado a identificação é possível transferir o resultado para o sistema de computador laboratório. O resultado "não identificado" pode ter duas explicações possíveis: primeiro o espectro obtido não ser de boa qualidade e quando comparado com o banco de dados não encontrar semelhanças, e a segunda seria que apesar apresentar um bom espectro, este organismo não está presente no banco de dados (BOU et al., 2011).

A técnica de MALDI-TOF MS tem sido bastante aplicada em estudos de identificação de diferentes gêneros de bacilos Gram-negativos, tais como *Escherichia coli* e outros membros da família Enterobacteriaceae a partir de amostras clínicas de humanos (RICHTER et al., 2013). Os autores Siegrist et al., 2007 investigaram a capacidade do MALDI-TOF em discriminar e caracterizar isolados ambientais de *E.coli* obtidas a partir de amostras de fezes provenientes de mamíferos e aves. Comparado o desempenho da técnica MALDI-TOF MS com um método de tipagem baseado na amplificação via PCR de elementos de DNA repetitivos presentes em genomas bacterianos (rep-PCR), os dados sugeriram que os resultados encontrados no MALDI-TOF-MS aproximam-se de forma mais eficaz dos isolados ambientais de *E.coli* do que a (rep-PCR). Em estudo realizado no Laboratório de Bacteriologia Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Motta et al. (2014) avaliaram isolados de amostras de leite provenientes de vacas mastíticas e observaram que a identificação genotípica como *S. aureus* obteve excelente concordância com a identificação proteômica por MALDI-TOF MS. Além disso, apresentaram 100% de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo, quando comparada ao método proteômico, confirmando a acurácia desta técnica na caracterização de *S.aureus*. Porém poucos são os dados disponíveis na literatura sobre a aplicação desta técnica na identificação de enterobactérias isoladas de ambiente de produção leiteira.

Devido a sua alta reprodutibilidade e a praticidade em manusear o aparelho, esta técnica também tem sido, com menos frequência, utilizada em amostras animais e ambientais. Especificamente no caso da mastite bovina, ela tem sido aplicada no controle da adulteração de produtos lácteos identificando proteínas alteradas e microrganismos responsáveis pela deterioração dos alimentos (BARREIRO et al., 2010).

2.3.3. Métodos Genotípicos

O princípio dos métodos genotípicos é a aplicação de biomarcadores que possuem regiões altamente conservadas entre os diferentes organismos e regiões variáveis, específicas de cada um, para detecção e identificação de microrganismos. Um biomarcador comumente utilizado para inferir identidade dos microrganismos é a molécula de RNA ribossomal, biomarcador denominado rRNA. O rRNA é parte integrante do ribossomo, uma estrutura celular responsável pela síntese de proteínas, essencial para a sobrevivência dos organismos, e altamente conservado entre as bactérias e, por isso, é considerado um biomarcador ideal. A

região 16S compõe a subunidade menor dos ribossomos presentes em organismos procariontes. O seqüenciamento do gene do 16S rRNA tem sido extensivamente usado com finalidade taxonômica e filogenética e é considerado o método de referência para a identificação bacteriana (Nolte & Caliendo 2003; Becker et al. 2004;).

As técnicas de identificação genotípicas em bactérias mediante a análise do 16S rRNA ou de outros genes de regiões conservadas são baseados na amplificação e seqüenciamento genômico destes genes ou de seus fragmentos. Após o seqüenciamento do fragmento amplificado, as seqüências encontradas são comparadas com aquelas depositadas na base de dados de acesso online públicos ou privados. Atualmente, a base de dados que apresenta o maior número de consultas por sua variedade em organismos, genes e números de seqüências depositadas na base de dados pública GenBank NCBI (National Centro de Informações sobre Biotecnologia, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e possuem programas como o BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) para alinhamento de sequências. Além disso, o GenBank contém uma seção de taxonomia que inclui informações sobre mais de 160.000 seqüências organismos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy>) (BOU et al., 2011).

Através aoprograma BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) disponível no NCBI é possível a interpretação dos resultados através do relatório disponível no banco de dados que consiste em um gráfico que indica o nível e tamanho dos fragmentos alinhados, seguido pela uma lista em ordem de sequências de microrganismos descendente com que a identidade ou de similaridade.

Apesar da exemplar aplicabilidade da técnica genética para identificação bacteriana, a elevada homologia genética presente em alguns gêneros bacterianos e a recente mudança na atribuição taxonômica, ainda não permite realizar a identificação através do 16S rRNA de espécies ou gêneros como *E. coli* e a *Shigella* spp., por exemplo, que não são diferenciadas por seqüenciamento do gene 16S rRNA. (VAN DEN BELD &, REUBSAET, 2012).

Diante destas dificuldades, genes *housekeeping* são empregados para a identificação de espécies, pois tendem a ser conservados entre os diferentes organismos. Estes são geralmente associados à codificação de proteínas que realizam processos celulares essenciais, como por exemplo a enzima girase B (*gyrB*), as subunidades alfa e beta da RNA polimerase (*rpoA* e *rpoB*) e *rec A*, um gene que codifica uma enzima importante no reparo do DNA (EMERSON et al., 2008).

O gene *gyrB*, considerado mais discriminativo do que 16S rRNA, codifica a subunidade girase ou a topoisomerase II do DNA e está envolvido na replicação do DNA bacteriano, possibilitando assim a discriminação e identificação de espécies extremamente relacionadas dentro do grupo das enterobactérias (DAUGA, 2002;. FUKUSHIMA et al., 2002). Em estudos prévios considerando este gene para diferenciar isolados clínicos de enterobactérias, concluiu-se que sistemas de identificação comerciais não são capazes de fazer uma distinção confiável entre as espécies do Complexo *Enterobacter cloacae* e do grupo *Cronobacter sakazakii*. Em trabalho desenvolvido por Delmas et al. (2006), quarenta e cinco isolados foram identificados como *E. cloacae* pelo método fenotípico. Enquanto que pela análise do sequenciamento *gyrB*, 42 cepas foram identificadas como *E. hormaechei*, uma como *E. intermedius* e apenas duas como *E. cloacae*. Em adição, Huang et al., (2013) desenvolveram uma PCR espécie-específica com base na seqüência do gene *gyrB* para identificação direta da espécies de , dentro do grupo *C. sakazakii*.

Apesar da baixa frequência de execução em laboratórios clínicos de microbiologia veterinária, as técnicas moleculares que vão desde PCR simples até PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*) vêm ganhando importância no sentido de otimizar a identificação de microrganismos envolvidos na mastite bovina, investigar surtos e detectar problemas na

qualidade do leite. Todos estes parâmetros visam auxiliar na rapidez da implementação do tratamento, controle e profilaxia da enfermidade nas propriedades leiteiras.

OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Propor a utilização da técnica proteômica MALDI-TOF MS, e apontar as dificuldades do método bioquímico convencional para a identificação de enterobactérias bem como descrever estes agentes no ambiente leiteiro.

3.2. Objetivos específicos

- Isolar enterobactérias a partir de amostras de leite e fezes bovinas, água utilizada no manejo e amostras provenientes da linha de ordenha;
- Identificar as espécies de enterobactérias a partir de provas bioquímicas convencionais;
- Executar a técnica de MALDI-TOF MS para identificação de todas as enterobactérias;
- Realizar o sequenciamento do gene *gyrB* nos isolados cuja identificação apresentou discrepâncias nas técnicas executadas;
- Utilizar a técnica de MALDI-TOF MS como método de referência em comparação ao método bioquímico;
- Descrever as enterobactérias, devidamente identificadas, no ambiente de produção leiteira.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local de Coleta

O experimento foi realizado em uma propriedade leiteira, no município de Barra do Piraí, localizada no centro da região sul fluminense, Rio de Janeiro, Brasil. O Município de Barra do Piraí possui uma área territorial de 578,965 km², tendo o município uma latitude de 22° 28' 14" Sul e longitude 43° 49' 36" Oeste, estando a uma altitude de 361 metros. A população municipal é de 94.778 habitantes (IBGE, 2014).

4.2. Amostragem

Foram estudadas 31 vacas em lactação na estação de Inverno (Julho, 2014), 37 vacas em lactação na estação da Primavera (Outubro, 2014), 9 vacas em lactação na estação do Verão (Março, 2015) e 17 vacas em lactação na estação do Outono (Maio, 2015), totalizando 94 animais, cujo o leite foi coletado sob forma de “pool” dos quatro quartos durante 3 semanas consecutivas. Desse modo, foi obtido um total de 282 amostras de leite.

4.3. Diagnóstico da Mastite

Antes da ordenha matinal, após o procedimento de descarte dos primeiros jatos de leite e da higienização das tetas com a solução *pré-dipping* e posterior secagem dos mesmos com papel toalha. Todas as vacas em lactação do rebanho foram submetidas ao exame clínico da glândula mamária e ao teste da caneca de fundo preto, que visualizam as alterações macroscópicas do leite, para detecção de quartos infectados com mastite clínica e o *California Mastitis Teste* (CMT) para detecção da mastite subclínica (**Figura 3**). Para análise do CMT, realizou-se a coleta de leite de todos quartos mamários, de cada animal, em uma bandeja e foi adicionado reagente aniônico neutro, o qual atua rompendo a membrana dos leucócitos, liberando o material nucléico (DNA), que apresenta alta viscosidade. Após as reações, os resultados foram interpretados de acordo com o grau de gelatinização: negativa (0), reação leve (+), moderada (++) , intensa (+++) (LANGONI, 2015).

Para a contagem de células somática (CCS), as amostras de leite cru, foram acondicionadas em recipientes plásticos com tampas rosqueáveis, homogeneizadas com o conservante celular Bronopol® e dispostas em caixas apropriadas em temperatura ambiente, visando à contagem eletrônica de células somáticas por citometria de fluxo, de acordo com as recomendações técnicas do equipamento. As análises foram encaminhadas à Clínica do Leite, ESALQ-USP/Piracicaba, SP. Foi considerado normal o leite com ≤ 200.000 CS/mL (LANGONI et al. 2011). Os resultados do presente estudo foram comparados com a IN 62 do Brasil (BRASIL, 2011), vigente para o período de julho de 2014 a junho de 2016, que preconizava valor máximo de 500.000 céls/mL.

Este trabalho foi conduzido de acordo com as normas éticas e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da instituição com número de protocolo: CEUA3664040915.



Figura 3. Realização do *California Mastitis Teste* (CMT) de todas as vacas em lactação do rebanho para detecção da mastite subclínica. Análise realizada pela equipe do laboratório de Bacteriologia veterinária da UFRRJ.(foto: acervo pessoal)

4.4. Coleta das Amostras de Leite

Para análise microbiológica do leite um “pool” dos quatro quartos de cada vaca em lactação foi coletado diretamente em frascos estéreis, devidamente identificados, após a antissepsia das tetas com álcool a 70% (**Figura 4**). Posteriormente, as amostras de leite foram acondicionadas em caixas isotérmicas com gelo reciclável e transportadas imediatamente ao Laboratório de Bacteriologia Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro para a incubação por 6hs a 37°C.



Figura 4. Amostra de leite cru proveniente de cada animal em lactação, para o monitoramento do rebanho. (foto: acervo pessoal)

4.5. Coleta das Amostras da Linha de ordenha

Foram coletadas 48 amostras da linha de ordenha, sendo 10 amostras das mãos, 10 da cavidade nasal dos ordenhadores, 20 da ordenhadeira mecânica e oito da cavidade nasal dos animais de companhia, presentes na sala de ordenha.

As coletas das amostras de mãos e da cavidade nasal dos ordenhadores foram realizadas após os procedimentos da ordenha. Foram utilizados suabes estéreis para as mãos de cada ordenhador, que foram passados nos espaços interdigitais, nos espaços subugueais e sobre as palmas dos mesmos. A coleta das amostras da cavidade nasal dos ordenhadores e dos animais de companhia foi realizada através da introdução de suabes estéreis individuais em movimentos circulares.

As amostras da ordenhadeira mecânica foram coletadas imediatamente após a ordenha, onde os suabes estéreis foram friccionados na superfície interna das teteiras em 20 movimentos circulares para cima, a partir da borda da borracha insufladora e 20 movimentos circulares para baixo, em um altura de 15 cm (OLIVEIRA et al., 2007).

4.6. Coleta das Amostras de Fezes Bovinas e Água

Na primeira semana de cada estação foram coletadas amostras de fezes diretamente da ampola retal de todas as vacas em lactação (**Figura 5**), totalizando 94 amostras.



Figura 5. Coleta de fezes frescas diretamente da ampola retal com luvas estéreis, antecedendo a ordenha matinal.(foto: acervo pessoal)

Concomitantemente foram coletadas amostras de água da propriedade estuda, em cinco pontos distintos sendo: amostras do riacho que eventualmente é utilizado como fonte de água para os animais no pasto, amostra do açude que recebe água de efluentes assim como da chuva e que serve como fonte de água em caso de seca do poço, amostra de água da torneira situada na sala de ordenha e finalmente do bebedouro disponível para os animais antes e depois da ordenha (**Figura 6**). Assim, um total de 20 amostras de água foram analisadas. Todas as amostras foram armazenadas em frascos estéreis e transportadas sob condições adequadas de refrigeração, ao Laboratório de Bacteriologia Veterinária da UFRRJ para isolamento e análise microbiológica.



Figura 6. Amostras de água coletadas dos pontos (A) poço, (B) açude, (C) torneira da sala do leite, (D) bebedouro dos animais, provenientes da propriedade leiteira em estudo. (foto: acervo pessoal)

4.7. Isolamento Bacteriano e Testes Microbiológicos Presuntivos

As amostras de leite e fezes foram direcionadas ao isolamento de enterobactérias, que consistiu no repique de 0,01mL de leite em placas de Petri contendo meios seletivos de ágar Eosina Azul de Metileno (HiMedia[®]) e ágar MacConkey (HiMedia[®]), incubando-se a 37°C. As leituras das placas foram realizadas as 24 e 48 horas, observando-se a morfologia das colônias (**Figura 7**) e, a seguir, preparadas lâminas com esfregaços corados pelo método de Gram, para verificar-se ao microscópio, a morfologia bacteriana e sua característica tintorial. Além disso, foi realizado o KOH a 3%, onde a formação de gel viscoso indicou resultado positivo. Posteriormente, realizou-se testes bioquímicos, para a diferenciação das espécies da família Enterobacteriaceae (KONEMAN et al., 2012).



Figura 7. Isolamento em meio seletivo Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) com crescimento de colônias características de *Escherichia coli* (foto: acervo pessoal).

As amostras de fezes também foram analisadas quanto à presença de *Salmonella* sp. Para tal, foram suspensas em solução salina (0,9%) e posteriormente inoculadas em Caldo de enriquecimento Tetracionato. Após 24h a 37°C, uma alíquota foi repicada em Agar Salmonella Shigella (A.SS) por também 24h a 37°C para avaliação das características coloniais típicas do gênero (KONEMAN et al., 2012).

Para análise de água, utilizou-se a determinação do Número Mais Provável (NMP.g-1) de coliformes, utilizando a técnica de fermentação dos tubos múltiplos. Alíquotas de 1 mL foram inoculadas em caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) contendo tubos de Durham invertidos e incubados por 48 horas a 35°C. Em seguida, um inóculo dos tubos positivos (formação de gás nos tubos de Durham e turvação do meio) foi transferido para tubos contendo caldo Lactose Bile Verde Brilhante (LBVB) e caldo EC (*Escherichia coli*) e incubados respectivamente, a 35°C por 48 horas e a 45°C, em banho-maria, por 24 horas. Dos tubos de EC positivos semeou-se nos meios seletivos agar Eosina Azul de Metileno (EMB) e Mac Conkey, incubou-se a 35°C por 24 horas. Após incubar a 35°C, as amostras foram submetidas ao mesmo protocolo de caracterização utilizado para amostras de leite e fezes, citados anteriormente (KONEMAN et al., 2012).

4.8. Identificação das Enterobactérias

Este método de diagnóstico é obtido através da verificação das transformações químicas, que ocorrem num determinado substrato, pela ação das enzimas de um dado microrganismo. Para a realização das provas bioquímicas é necessário utilizar meios de cultivo especiais contendo o substrato a ser analisado e fornecer ao microrganismo as condições nutritivas e ambientais necessárias ao seu desenvolvimento.

Após a identificação presuntiva das colônias, os bastonetes Gram negativos, KOH positivos foram submetidos aos testes bioquímicos, para a diferenciação das espécies da família Enterobacteriaceae (KONEMAN et al., 2012).

4.8.1. Diagnóstico presuntivo através do meio de triagem Kligler Iron Agar

O ágar Kligler Iron (HiMedia®) foi utilizado para detectar a capacidade da bactéria fermentar a glicose e/ou a lactose. Este meio contém glicose em pequena concentração (0,1%), lactose em concentração superior (1%), o indicador de pH vermelho de fenol para detectar a produção de ácidos resultantes da fermentação dos hidratos de carbono, tiosulfato de sódio, substrato para a produção de H₂S (sulfeto de hidrogênio) e sulfato de ferro para a detecção desse produto final. O meio foi inoculado por picada no cilindro e por estria na parte inclinada (rampa). É essencial que as culturas sejam observadas após 18 a 24 h de incubação para evitar que os hidratos de carbono sejam completamente utilizados e que ocorra degradação das peptonas, formando produtos finais alcalinos. A leitura da fermentação de lactose foi realizada pela mudança de cor da rampa, no fundo do cilindro a da glicose e no meio do cilindro a de H₂S (**Figura 8**). Após incubação puderam ser determinadas as atividades fermentativas, a produção de gás e a produção de H₂S (**Quadro 1**).



Figura 8. Diferentes resultados do Ágar Kligler Iron nos isolados bacterianos das amostras de leite, fezes e água. (foto: acervo pessoal)

Quadro 1. Reações no meio de triagem Kligler Iron Agar (FIOCRUZ, 2006).

Leitura	Interpretação	Diagnóstico presuntivo
Reação ácida (amarelo) e gás na profundidade. Reação ácida na superfície. Ausência de H ₂ S.	Fermentação da glicose e fermentação da lactose, inclusive com produção de gás.	<i>Escherichia, Klebsiella, Enterobacter, Providencia, Serratia</i>
Reação ácida e gás na profundidade. Superfície alcalina (vermelha). Presença de H ₂ S.	Fermentação da glicose sem ataque á lactose.	<i>Salmonella, Edwardsiella, Citrobacter, Proteus</i>
Reação ácida sem gás na profundidade, superfície alcalina. Ausência de H ₂ S.	Glicose fermentada apenas formando ácido; nenhuma ação sobre a lactose.	<i>Shigella, Salmonella, Proteus, Providencia, Serratia, Yersinia</i>
Meio inteiramente ácido com gás. Presença de H ₂ S.	Fermentação da glicose com gás; fermentação da lactose.	<i>Citrobacter, Proteus</i>
Meio inteiramente ácido sem gás. Ausência de H ₂ S.	Fermentação da glicose com formação de ácido; fermentação da lactose.	<i>Escherichia coli, Serratia</i>

4.8.2 Avaliação do perfil bioquímico

Para a realização das provas de descarboxilação de lisina e ornitina e dehidrolisação de arginina, foi utilizada uma base contendo peptona, extrato de levedura, dextrose e púrpura de bromocresol, com a qual foram preparadas as soluções de lisina, arginina e ornitina (Micromed[®]). As soluções foram distribuídas em tubos aos quais foi adicionada uma fina camada de óleo mineral, previamente esterilizado, à superfície do líquido, a fim de promover ambiente microaerófilo. Como controle, utilizou-se a solução base pura também acrescida de óleo mineral previamente esterilizado. Após a inoculação dos isolados e incubação à 37°C por até 7 dias, a leitura destas provas é interpretada como negativa quando a coloração do meio apresenta-se amarela indicando acidez em ocasião da fermentação da glicose. Na reação

positiva, ocorre fermentação do meio para ativação das enzimas de descarboxilação e posteriormente o meio vira para coloração violeta, indicando alcalinidade do meio em função da descarboxilação ou dehidrolisação dos aminoácidos (**Figura 9**). A base usada como controle sempre apresentou resultado negativo (KONEMAN et al., 2012).

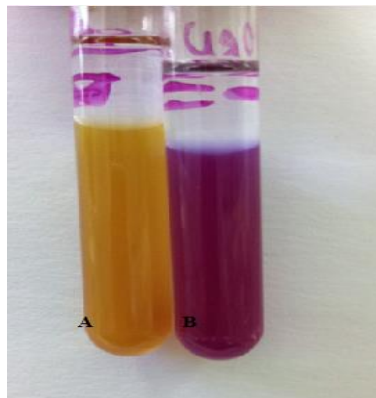


Figura 9. Prova de descarboxilação dos aminoácidos utilizada para a identificação bioquímica nos isolados das amostras de leite, fezes e água, onde se observa resultado negativo (A) e resultado positivo (B). (foto : acervo pessoal)

As provas de Voges-Proskauer (VP) e Vermelho de Metila (VM) foram realizadas através da utilização do caldo MR-VP (VETEC[®]) que apresenta na sua composição glicose, peptona, água e fosfato. A utilização da glicose, apresentando a produção de acetilmetilcarbinol (acetoína), é indicada pela coloração rosa na prova do VP após a adição de 0,6 mL de α -naftol a 5% e 0,2 mL de KOH (40%) no caldo contendo o inóculo incubado por 24 a 48 horas à 35°C (**Figura 10**). A prova do VM é utilizada para a detecção de ácidos mistos. É detectado através da viragem da coloração do caldo para vermelho após a adição do reativo vermelho de metila (**Figura 11**) (KONEMAN et al., 2012).

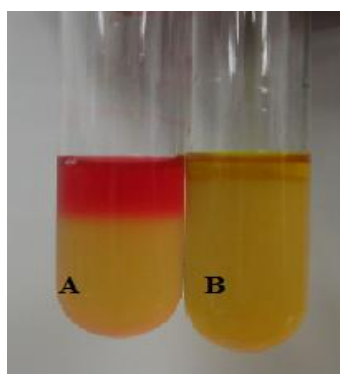


Figura 10. Prova de Voges-Proskauer (VP) utilizada para a identificação bioquímica nos isolados das amostras de leite, fezes e água, onde se observa resultado positivo(A) e resultado negativo (B). (foto : acervo pessoal)

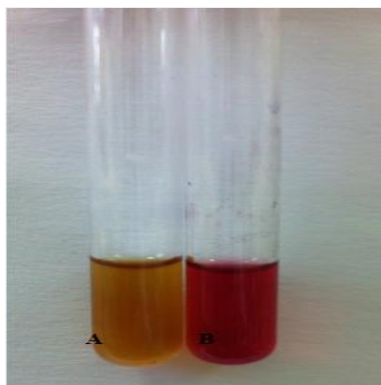


Figura 11. Prova Vermelho de Metila (VM) utilizada para a identificação bioquímica nos isolados das amostras de leite, fezes e água, onde se observa o resultado negativo (A) e positivo (B). (foto : acervo pessoal)

A produção de indol, ácido sulfídrico e avaliação da motilidade foram realizadas em meio ágar Sulfeto Indol Motilidade (SIM - VETEC[®]). A produção de indol está baseada na formação de um complexo de cor vermelha quando o indol, produzido pela bactéria, reage com o grupo aldeído do p-dimetilaminobenzaldeído (reativo de Kovacs). A motilidade é considerada positiva quando ocorre difusão do microrganismo na zona de inoculação. Na prova positiva para H₂S, as bactérias produzem a enzima redutase do tiosulfato, o qual converte o tiosulfato em sulfato com liberação de sulfeto de hidrogênio, este enegrece a extremidade inferior do meio SIM. A leitura é feita após 24h de incubação à 35°C. O resultado obtido é confrontado com o meio Kligler sendo, portanto considerada a bactéria produtora de H₂S aquela que se apresentou positividade em ambos os testes (**Figura 12**) (KONEMAN et al., 2012).



Figura 12 Prova SIM utilizada para avaliação da produção de Indol, Ácido sulfídrico e Motilidade nos isolados das amostras de leite, fezes e água. (foto : acervo pessoal)

A capacidade do microrganismo utilizar o citrato como única fonte de carbono foi avaliada através da inoculação dos isolados em ágar citrato Simmons (VETEC[®]). Após incubação por 24h à 35°C, foi observada a coloração dos tubos, onde a alteração de verde para azul, indicava alcalinização do meio após a utilização do citrato (**Figura 13**).

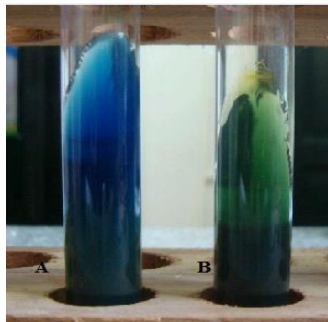


Figura 13. Prova do Citrato utilizada para identificação bioquímica nos isolados de amostras de leite, fezes e água, onde se observa resultado positivo (A) e resultado negativo (B). (foto: acervo pessoal)

A capacidade do microrganismo utilizar o malonato como única fonte de carbono foi avaliada através da inoculação dos isolados em caldo malonato (MERCK®). Após incubação por 24h à 35°C, foi observada a coloração dos tubos, onde a alteração de verde para azul, indicando alcalinização do meio após a utilização do malonato (**Figura 14**) (KONEMAN et al., 2012).

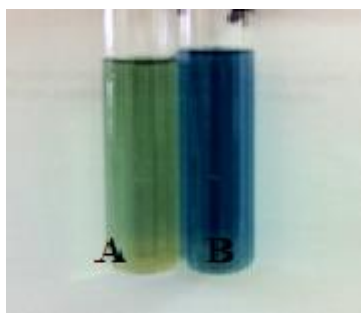


Figura 14 Prova do Malonato utilizada para identificação bioquímica no isolados de amostras de leite, fezes e água, onde se observa resultado positivo (A) e resultado negativo (B). (foto: acervo pessoal)

A capacidade do microrganismo produzir uma enzima urease foi avaliada através da incubação do crescimento bacteriano em caldo contendo uréia, pH neutro e um indicador de pH, o vermelho fenol (HiMedia®). Após 24 horas de incubação à 35°C a prova foi revelada positiva, quando a urease degrada a uréia alcalinizando o meio que assume a coloração rosa choque. Na prova negativa não há alteração da cor do meio (**Figura 15**) (KONEMAN et al., 2012).



Figura 15. Prova da Urease para a identificação nos isolados provenientes de amostras de leite, fezes e água, onde se observa resultado negativo (A) e resultado positivo (B). (foto: acervo pessoal).

A leitura das provas bioquímicas considerando a metodologia de Koneman et al. (2012) está disposta no **quadro 2**.

Quadro 2. Diferenciação de Enterobacteriaceae por testes bioquímicos, segundo Koneman et al. (2008).

	<i>Escherichia coli</i>	<i>Shigella sonnei</i>	<i>outras Shigella</i>	<i>Edwardsiella tarda</i>	<i>Salmonella sp</i>	<i>Salmonella typhi</i>	<i>Arizona</i>	<i>Citrobacter</i>			<i>Klebsiella</i>		<i>Enterobacter</i>					<i>Hafnia alvei</i>	<i>Serratia</i>			<i>Proteus</i>		<i>Morganella morganii</i>	<i>Providencia</i>			<i>Yersinia</i>		
								<i>freundii</i>	<i>diversus</i>	<i>amalonaticus</i>	<i>pneumoniae</i>	<i>oxytoca</i>	<i>cloacae</i>	<i>aerogenes</i>	<i>agglomerans</i>	<i>sakasaki</i>	<i>gergoviae</i>		<i>marcescens</i>	<i>liquefaciens</i>	<i>rubidae</i>	<i>vulgaris</i>	<i>mirabilis</i>		<i>rettgeri</i>	<i>alcalifaciens</i>	<i>stuartii</i>	<i>enterocolitica</i>	<i>pseudotuberculosis</i>	<i>pestis</i>
Indol	+	-	V	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	V	V	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	V	-	-	
Vermelho de Metila	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	V	V	-	-	V	V	V	V	V	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Voges-Proskauer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	V	+	+	V	+	+	-	V	-	-	-	-	V	-	-	
Simmons Citrato	-	-	-	-	V	-	+	+	+	+	+	+	+	+	V	+	+	V	+	+	V	V	-	+	+	+	-	-	-	
H ₂ S (TSI)	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
Motilidade	V	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	V	+	+	+	+	+	V	+	+	V	+	+	V	1	1	2
Gelatina (22°C)	-	-	-	-	-	-	+	-	-	V	-	-	V	V	V	-	-	-	V	+	V	+	+	-	-	-	-	-	-	
Lisina Descarboxilase	V	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	V	+	+	V	V	-	-	-	-	-	-	-	-	
Arginina Dihidrolase	V	-	V	-	V	-	V	V	V	+	-	-	+	-	-	+	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Onitina Descarboxilase	V	+	-	+	+	-	+	V	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	
Urease	-	-	-	-	-	-	-	V	V	V	+	+	V	-	V	-	+	-	V	V	V	+	V	+	+	-	V	+	+	
Malonato	-	-	-	-	-	-	+	V	+	-	+	+	V	V	V	V	+	V	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	
Gás de D-Glucose	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	V	+	+	+	V	V	V	V	+	V	V	V	-	-	-	
Lactose	+	-	-	-	-	-	V	V	V	V	+	+	V	+	V	+	V	V	-	V	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
Sucrose	V	-	-	-	-	-	-	V	V	V	+	+	+	+	V	+	+	V	+	+	+	+	V	-	V	V	V	+	-	

4.8.3. Identificação das enterobactérias por MALDI-TOF MS

Todas as enterobactérias previamente identificadas pelos testes bioquímicos foram avaliadas pela técnica de Espectrometria de Massas por Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz (MALDI- TOF) no Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica do Instituto de Microbiologia Paulo Góes (UFRJ).

Para o preparo das amostras, isolados foram cultivados em ágar BHI a 37°C por 24 horas. Cada cultura bacteriana foi transferida para a microplaca (96 MSP, Bruker-Billerica, E.U.A) e, ao sedimento bacteriano, foi adicionado uma solução de lise (ácido fórmico 70% Sigma-Aldrich®) em quantidade suficiente para cobri-lo. Em seguida 1 µL de solução da matriz (ácido alfa-ciano-4-hidroxi-cinâmico diluído em acetonitrila 50% e ácido trifluoracético 2, 5%, Sigma-Aldrich®) foi utilizado para cobrir o extrato bacteriano, para finalmente ser processado. Os espectros de cada amostra foram gerados em um espectro de massa (MALDI-TOF LT Microflex Bruker, Bruker®) equipado com laser de 337 nm de nitrogênio no modo linear controlado pelo programa Flex Control 3.3 (Bruker®).

Os espectros foram coletados na faixa de massa entre 2.000- 20.000 m/s e, posteriormente analisados pelo programa MALDI Biotyper 2.0 (Bruker®), com as configurações padronizadas para a identificação bacteriana. O programa confronta os espectros da amostra desconhecida com amostras de referência em um banco de dados (**figura 16**).

Os resultados obtidos variam em uma escala que vai de zero a três, sendo que quando maior o valor, mais confiável é a identificação. Neste trabalho, consideram-se como uma identificação aceitável aquelas que apresentam valores iguais ou superiores a dois



Figura 16. 1. Amostras cultivadas em ágar BHI foram transferidas para a microplaca de metal; 2. Solução da Matriz foi adicionada ao sedimento bacteriano para serem processados; 3. Microplaca de metal foi introduzida ao espectrômetro de massa MALDI, e os espectros obtidos da amostra desconhecida foram confrontados com o software do computador. (foto: acervo pessoal)

4.8.4. Identificação das enterobactérias através das técnicas genotípicas

Todos os isolados foram reativados em ágar BHI e, posteriormente, submetidos à extração do DNA total para análises genotípicas.

4.8.4.1. Extração rápida do DNA total bacteriano

Para a extração do DNA total bacteriano, foi utilizado a metodologia preconizada pelo Laboratório de Bacteriologia Veterinário da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Cada isolado foi cultivado em 1,5 mL de caldo BHI, à 35°C por 24 horas. Posteriormente, os microtubos foram centrifugados por 2 minutos a 15689g e o sobrenadante descartado. As

células foram ressuspensas em 200 µL de água ultra pura e agitada em vórtex, sendo então incubadas a 100°C por 10 minutos. Após o tempo estipulado, os microbutos foram esfriados em temperatura ambiente e centrifugados por 2 minutos a 15689g. Aproximadamente 180 µL do sobrenadante foram transferidos para novos microtubos de 600 µL que foram armazenados a temperatura de -20°C.

4.8.4.2. Amplificação do gene *gyrB* por PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Após a extração rápida do DNA genômico bacteriano, a identificação genotípica foi realizada através da amplificação de um fragmento de aproximadamente 700 pb do gene *gyrB* pela técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Para a amplificação desta seqüência foram utilizados os *primers* degenerados listados no **quadro 3**.

Quadro 3. *Primers* degenerados empregados na amplificação do gene *gyrB* para as estirpes de Enterobacteriaceae

Primer	Seqüência	Referência
UPI	(5' - GAAGTCATCATGACCGTTCTGCAYGCGNGGNGNAARTTYGA - 3')	(Yamamoto et al., 1995) *
181r	(5' - CAGGAAACAGCTATGACCARRTGNGTNCNC - 3')	(Kasai et al., 1998)*

*(Ciclo): 95°C 5 min, (94 °C 1 min, 65°C 1 min, 72 °C 1 min) x 30 e 72 °C 5 min

As concentrações utilizadas nas reações foram: tampão 10X (10 mM Tris-HCl, pH 9.0; 50 mM KCl e 0.1% Triton X-100), 2,0 mM de MgCl₂, 0,5 µM de cada primer, 0,2 mM de dNTP (Fermentas) e 0,5 U de Taq polimerase (Fermentas), em um volume total de reação de 20 µL contendo 20 ng do DNA extraído. Os fragmentos foram avaliados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% e revelados com o corante SYBR Green (Invitrogen), possibilitando a visualização em luz ultravioleta e documentação dos *amplicons* pelo sistema de captura de imagem L-PIX EX (Loccus Biotecnologia). Os tamanhos dos fragmentos foram estimados por comparação, utilizando o marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas).

4.8.4.3. Sequenciamento

Algumas amostras de interesse foram selecionadas para identificação por sequenciamento. Os produtos de PCR foram purificados utilizando a Exo-Sap (USB Corporation, Cleveland, Ohio), conforme recomendação do fabricante e, em seguida, submetido ao seqüenciador ABI 3130xl da Applied Biosystems do Laboratório de Biotecnologia da Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília.

As seqüências foram editadas utilizando o programa Bioedit (HALL et al., 1999) e Mega versão 4.0 (KUMAR et al., 2004) e posteriormente foram comparadas com outras seqüências depositadas no banco de dados do NCBI (GenBank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) utilizando o algoritmo BLASTn (ALTSCHUL et al., 1997).

4.9. Análise estatística

Os resultados obtidos a partir do NMP/mL de coliformes fecais e totais foram submetidos ao teste estatístico de Mann-Whitney a 5%, para avaliar a diferença significativa entre os cinco pontos coletados durante as quatro estações do ano de modo a permitir a avaliação da disseminação destes microrganismos no ambiente de produção leiteira e sua possível influência na etiologia da mastite. Para estes testes, foi utilizado o software Bioestat 5.3.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir do total de 444 amostras de ambiente de produção leiteira, foram isoladas 183 enterobactérias, sendo 25,6% (47/183) de leite bovino, 51,3% (94/183) das fezes destes animais, 12,6% (23/183) de água e 10,3% (19/183) da cadeia produtiva (Anexo A). Todos os isolados foram submetidos às identificações bioquímicas e MALDI-TOF MS e ambos os procedimentos identificaram em nível de espécie todos os isolados. A **tabela 1** apresenta os resultados das metodologias executadas.

Tabela 1. Enterobactérias provenientes de amostras de ambiente bovino identificadas pelos métodos bioquímicos e pelo MALDI-TOF MS

Espécies identificadas pelo MALDI-TOF (Escores)	Nº de isolados	Número de isolados (%) identificados pelo método fenotípico convencional		
		Identificação concordante		Identificação discordante
		Espécie	Espécie	Gênero
<i>Escherichia coli</i> (2.473)	152	152 (100)	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i> (2.172)	7	4 (57.1)	2(28,5) ^a	1 (14.2) ^b
<i>Enterobacter asburiae</i> (2.329)	5	-	5(100) ^{a, c}	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> (2.450)	2	-	2 (100) ^c	-
<i>Citrobacter freundii</i> (2.273)	1	1 (100)	-	-
<i>Klebsiella oxytoca</i> (2.341)	5	5 (100)	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (2.314)	5	4 (80)	1 (20) ^d	-
<i>Morganella morganii</i> (2.422)	1	1 (100)	-	-
<i>Providencia stuartii</i> (2.228)	1	1 (100)	-	-
<i>Raoultella ornithinolytica</i> (2.509)	2	-	-	2 (100) ^b
<i>Serratia marcescens</i> (2.232)	2	2 (100)	-	-
Total	183	170 (92.9)	10 (5.5)	3 (1.6)

^a*Pantoea agglomerans*, ^b*Klebsiella pneumoniae*, ^c*Enterobacter cloacae*, ^d*Klebsiella oxytoca*

Após o confronto das técnicas, um total de 92,9% (n=170) das enterobactérias fenotipicamente identificadas foram confirmadas pelo método proteômico, sendo as espécies concordantes: *E. coli* (n = 152), *Klebsiella oxytoca* (n = 5), *Klebsiella pneumoniae* (n = 4), *Enterobacter cloacae* (n = 4), *Serratia marcescens* (n = 2), *Citrobacter freundii* (n = 1), *Morganella morganii* (n = 1), *Providencia stuartii* (n = 1). Outros autores também encontraram uma correlação elevada entre essas técnicas. Eigner et al. (2009) descreveram 95,2% de concordância em 1.116 cepas bacterianas previamente identificados na rotina de laboratórios de microbiologia clínica. Através da utilização do sistema Bruker, 327 isolados clínicos identificados por técnicas convencionais foram analisados através do MALDI-TOF MS por van Veen et al. (2010) e os autores observaram a correta identificação de 95,1% em nível de gênero e 85,6% em nível de espécie. O mesmo grupo apresentou um estudo de validação prospectivo em 980 isolados clínicos de bactérias e leveduras e apresentaram 92,2% de identificação correta através do MALDI-TOF. Uma das principais vantagens da utilização desta tecnologia para a identificação de bactérias é a resposta rápida dos resultados, o qual o tempo é reduzido de 1 a 6 dias para menos de uma hora. Além disso, a técnica MALDI-TOF permite a identificação precisa de bactérias a partir de uma grande diversidade de bactérias,

porém a sua utilização ainda é quase sempre limitada aos laboratórios de microbiologia de pesquisa.

A espécie *E. coli* foi caracterizada como predominante nas amostras avaliadas (83%, 152/183). O perfil bioquímico desta espécie é muito característico (indol positiva, H₂S e citrato negativos) o que justifica o maior nível de concordância do método bioquímico em confronto com o MALDI-TOF MS.

Após a identificação proteômica, os 13 (7,10%, 13/183) isolados identificados incorretamente foram novamente testados bioquimicamente e apresentaram os mesmos resultados. Estes foram submetidos ao seqüenciamento do gene *gyrB*, conforme metodologia de identificação genotípica proposta por Delmas et al (2006). Após inúmeras tentativas não foi possível extração e conseqüentemente a amplificação de gene em cinco isolados (1 *K. pneumoniae*, 1 *E. cloacae*, 1 *E. asburiae* e 2 *Raoultella ornithinolytica*). Portanto oito enterobactérias, cuja identificação não foi concordante, foram analisadas nesta parte do estudo. Em adição, 15 isolados cuja identificação foi concordante também tiveram o gene *gyrB* sequenciado como controle (**tabela 2**).

Tabela 2. Resultados do seqüenciamento do gene *gyrB* em enterobactérias previamente identificadas pelos testes bioquímicos e MALDI-TOF MS*

Isolados	Identificação Bioquímica	Identificação MALDI	Identificação BLASTn	Acesso NCBI	Máxima identidade	<i>E-value</i>
L65	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	CP013253.1	99%	0.0
L22	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	KF914219.1	98%	0.0
L57	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	CP013253.1	92%	0.0
L64	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	CP013253.1	97%	0.0
F56	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	CP013253.1	98%	0.0
A21	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	DQ386875.1	96%	0.0
A24	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	CP011018.1	96%	0.0
A16	<i>E.coli</i>	<i>E.coli</i>	<i>E.coli</i>	CP011331.1	99%	0.0
A16	<i>E.coli</i>	<i>E.coli</i>	<i>E.coli</i>	CP011331.1	99%	0.0
*L10	<i>E. cloacae</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>E. cloacae</i>	EF064834.1	99%	0.0
L19	<i>E. cloacae</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>E. cloacae</i>	CP012167.1	88%	0.0
L58	<i>E. cloacae</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>E. cloacae</i>	AB084013.1	99%	0.0
L34	<i>S. marcescens</i>	<i>S. marcescens</i>	<i>S. marcescens</i>	JX1034 78.1	99%	0.08e-149
L60	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	CP008700.1	98%	0.0
A4	<i>K. oxytoca</i>	<i>k. oxytoca</i>	<i>K. oxytoca</i>	FJ617358.1	84%	1e-36
A5	<i>E. cloacae</i>	<i>E. asburiae</i>	<i>Enterobactersp.</i>	KF871115.1	99%	0.0
A12	<i>E. cloacae</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>E. aerogenes</i>	CP011574.1	98%	0.0
**A17	<i>E. cloacae</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>E. aerogenes</i>	F0203355.1	95%	0.0
**L52	<i>P. agglomerans</i>	<i>E. asburiae</i>	<i>Enterobactersp.</i>	FJ617364.1	90%	1e-114
L62	<i>P. agglomerans</i>	<i>E. asburiae</i>	<i>E. asburiae</i>	CP011591.1	95%	0.0
**L68	<i>P. agglomerans</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>E. cloacae</i>	EF064834.1	99%	0.0
**L4	<i>P. agglomerans</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>E. cloacae</i>	AB084017.1	92%	0.0
**L25	<i>P. agglomerans</i>	<i>E. asburiae</i>	<i>E. asburiae</i>	CP012162.1	82%	1e-64

*Em destaque de cor, isolados utilizados como controle. **Isolados cujo seqüenciamento foi realizado apenas considerando a fita “forward”

Após análise dos resultados gerados pelo seqüenciamento do gene *gyrB*, foi possível avaliar que seis espécies foram identificadas conforme o resultado obtido pela técnica de MALDI-TOF MS. São eles: dois isolados de *E. aerogenes* (A12 e A17), dois de *E. asburiae*

(L62 e L25) e dois de *E. cloacae* (L62 e L4). Um isolado (L52) identificado como *P. agglomerans*, através dos métodos bioquímicos e, como *E. asburie* pela técnica proteômica, foi caracterizado como pertencente ao gênero *Enterobacter*, apresentando portando maior identidade ao resultado do MALDI-TOF MS. E outro isolado identificado como *E. cloacae* e *E. asburie* pelas técnicas bioquímicas e proteômica, respectivamente, também foi caracterizado apenas em nível de gênero pelo seqüenciamento. Sendo assim, a técnica genotípica validou o resultado do MALDI-TOF MS em 100% (8/8) das enterobactérias utilizadas no presente estudo. Sendo assim, o mesmo foi utilizado como método de referência quando comparado com os resultados obtidos pelo método bioquímico convencional.

Dentre os resultados discordantes, o gênero *Enterobacter* foi o mais encontrado (77%, 10/13). Todos *Enterobacter asburiae* (n = 5) foram identificados como *Pantoea agglomerans* (n = 3) e *Enterobacter cloacae* (n = 2). Atualmente, seis espécies foram atribuídos ao complexo *Enterobacter cloacae*, incluindo *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter hormaechei*, *Enterobacter kobei*, *Enterobacter ludwigii* e *Enterobacter nimipressuralis*.

Em estudos de vigilância, as espécies de *Enterobacter* muitas vezes não são classificadas além do nível de gênero, provavelmente porque a identificação é considerada difícil de ser realizada. Os isolados de *Enterobacter* spp que pertencem ao complexo *E. cloacae* são os de maior importância clínica e tem sido cada vez mais isolados como patógenos humanos. Assim, a identificação mais precisa de isolados do complexo de *E. cloacae* pode permitir a diferenciação entre patógenos, agentes comensais e espécies transitórias e assim auxiliar na caracterização dos focos de infecção e consequentemente na implementação de medidas profiláticas (KAMPFER et al., 2007).

Neste estudo os isolados de *E.asburie* tiveram a identificação discordante pelo método bioquímico convencional, segundo Koneman et al. (2012) a produção de acetoina por esta espécie pode ser expressa em apenas 79% dos isolados, o que sugere que o método bioquímico de diferenciação das espécies de *E.asburie* estão sujeitos a discordância quando utilizados em cepas atípicas.

A espécie *Pantoea agglomerans* já foi pertencente ao gênero *Enterobacter*, sendo classificada como *Enterobacter agglomerans* por muitos anos (Brady et al., 2013). É difícil diferenciar *Pantoea* spp. de outros membros desta família, como espécies de *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Serratia*. No entanto, *Pantoea* spp não utiliza os aminoácidos lisina, arginina e ornitina, uma característica que o diferencia de outros gêneros (KONEMAN et al., 2012).

Dois isolados de *Raoultella ornithinolytica* foram discordantes quando identificados pelo bioquimismo como *Klebsiella pneumoniae*. A produção de indol e ácidos mistos bem como os testes de descarboxilação de ornitina são responsáveis por diferenciar *R. ornithinolytica* e *K. pneumoniae*, todavia nos dois isolados avaliados no estudo não apresentaram essa característica. Estudar mais profundamente essas duas cepas, em etapas futuras, poderiam responder de forma mais segura as razões dessa divergência. Historicamente, estas espécies estavam intimamente relacionadas. Drancourt et al. (2001) por análise filogenética do gênero *rpoB* confirmou a heterogeneidade de *Klebsiella* spp e propôs a formação de três grupos: Grupo I compreende três subespécies, *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* e *K. pneumoniae* subsp. *Rhinoscleromatis*; grupo II compreendem *K. terrigena*, *K. ornithinolytica*, *K. planticola* também *K. trevisanii* e finalmente Grupo III representado por *K. oxytoca*. Com base nessas evidências, eles propuseram uma divisão do gênero

Klebsiella: *Klebsiella* spp e *Raoultella* spp. Todas as espécies do grupo II foram transferidas para novo gênero *Raoultella* spp.

Um isolado de *Enterobacter cloacae* apresentou discordância na identificação em nível de gênero. Pelo método bioquímico foi identificado como *Klebsiella pneumoniae*. Embora pertencendo a gêneros diferentes eles são incluídos na mesma tribo - *Klebsiella*, juntamente com *Enterobacter*, *Hafnia*, *Serratia* e o gênero *Pantoea*. Os testes de descarboxilação de aminoácidos são extremamente importantes, especialmente para a separação de certos membros do grupo *Klebsiella – Enterobacter – Serratia - Hafnia* (KONEMAN et al., 2012). Porém algumas cepas não se enquadram nessa variedade porque não fazem descarboxilação de aminoácidos nem apresentam motilidade sendo consideradas cepas atípicas o que contribui para a identificação discordante pelos métodos bioquímicos.

Outra *K. pneumoniae* foi identificada como *K. oxytoca*. A produção de indol poderia ser utilizada como teste de diferenciação, mas algumas estirpes não produzem reações clássicas que conduzem a designação de várias espécies adicionais e, conseqüentemente, induzem a identificação discordantes (CHU et al., 2012).

A interpretação dos testes de descarboxilação de aminoácidos deve ser precisa, especialmente porque alguns isolados apresentam reação lenta resultando em uma identificação discordante. Além disso, a densidade bacteriana, o tempo de incubação e o pH adequadamente ajustados são os padrões exigidos para minimizar o risco de resultados falsos (PEDRAZA et al., 2014). Em geral, os microrganismos fermentam primeiro a glicose para baixar o pH, de modo que a concentração ótima de íons de hidrogênio seja atingido para a atividade da descarboxilase. A descarboxilação dos aminoácidos resulta em formação de aminas e no conseqüente aumento do pH. Os resultados positivos são geralmente obtidos após 18 a 24 horas de incubação, mas para algumas estirpes de metabolismo lento os testes devem ser mantidos incubados na estufa a 35°C por até quatro dias (GONZALEZ et al., 2013). Um grande número de microbiologistas adota o caldo lisina Falkow em vez do Möller, porque o teste Falkow elimina o ambiente ácido e anaeróbio. No entanto, este teste não pode ser utilizado para detectar a atividade da descarboxilase da lisina de certos membros do grupo *Klebsiella – Enterobacter – Serratia - Hafnia* considerando a produção metilacetilcarbinol que interfere, no pH final conduzindo à interpretação discordante (KONEMAN et al., 2012).

A subjetividade de testes fenotípicos tem aumentado a busca por técnicas mais definitivas na identificação de bactérias como ferramentas proteômicas e moleculares (ROSSELLÓ-MORA et al., 2001).

Após confronto das técnicas bioquímicas e proteômica foi realizada uma análise da presença das espécies de enterobactérias nas diferentes amostras coletadas a partir do ambiente de produção leiteira (**tabela 3**).

Tabela 3. Espécies de enterobactérias identificadas pelo MALDI-TOF MS isoladas de diferentes amostras coletadas de ambiente leiteiro.

Espécies de enterobactérias	Amostras					Água	Fezes	Total
	Leite	Linha de ordenha*						
		MO	CN	OM	CA			
<i>Escherichia coli</i>	35	2	1	3	2	15	94	152
<i>Enterobacter cloacae</i>	2	1	1	3	-	-	-	7
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3	1	-	1	-	-	-	5
<i>Klebsiella oxytoca</i>	3	-	-	-	-	2	-	5
<i>Enterobacter asburiae</i>	1	1	-	1	1	1	-	5
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	-	-	-	-	-	2	-	2
<i>Serratia marcescens</i>	2	-	-	-	-	-	-	2
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	-	-	-	-	2	-	2
<i>Citrobacter freundii</i>	1	-	-	-	-	-	-	1
<i>Morganella morganii</i>	-	-	1	-	-	-	-	1
<i>Providencia stuartii</i>	-	-	-	-	-	1	-	1
Total	47			19		23	94	183

*MO: Mão dos ordenhadores, CN: cavidade nasal dos ordenhadores, OM: ordenhadeira mecânica e CA: cavidade nasal dos animais de companhia

Os exames clínicos e o teste da caneca telada demonstraram que nenhum animal apresentou sinais de mastite clínica. Em contrapartida, os testes de diagnóstico CMT e CCS (Anexos A e B) determinaram que 56,4% (53/94) dos animais apresentavam mastite do tipo subclínica. No Brasil, a média detectada deste tipo de mastite tem sido estabelecida em torno de 40% (SANTOS, 2014). A literatura aponta que os valores ideais devem atingir níveis de ocorrência inferiores a 1% para mastite clínica e 15% para mastite subclínica em rebanhos leiteiros (DEMEU et al., 2010). Nesse sentido, apesar da ausência de caso de mastite clínica, a prevalência de mastite subclínica observada neste estudo está acima dos índices considerados toleráveis para essa enfermidade, evidenciando a importância de concentrar esforços para diminuir esses índices.

Após isolamento e identificação bacteriana a partir das amostras de leite, foi possível o isolamento de 47 enterobactérias a partir de amostras de leite proveniente de 37 animais. Portanto, a discussão a seguir refere-se apenas aos animais cujo leite apresentou estas bactérias, uma vez que outros grupos bacterianos como por exemplo *S.aureus* estão sendo analisadas pelos demais discentes de pós-graduação do LABAC-VET.

Do total de enterobactérias detectadas, 55% (26/47) foram provenientes de vacas mastíticas (n=20) cuja média de CCS detectada foi de 948.000 cels/mL. No presente estudo, foram utilizados valores de CCS > 200.000 céls/mL para o diagnóstico da mastite bovina considerando os dados de KEEFE (2012). Os valores da CCS podem ser atribuídos ao tipo de bactéria causadora da mastite, sendo que os patógenos principais como *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, estreptococos ambientais e *Mycoplasma* spp. são os que mais induzem a elevação das células somáticas, quando comparados aos patógenos considerados secundários (*Corynebacterium bovis* e *Staphylococcus* spp. coagulase negativo).

A prevalência de *E.coli* em amostras de leite mastítico foi de 77% (20/26), seguida de *Klebsiella pneumoniae* em 11,5% (3/26) e *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter cloacae* em 4% (1/26) cada. Espécimes de *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp. são

encontradas preferencialmente em dejetos dos animais, no solo e em água contaminada. A *E.coli* é o microrganismo mais predominante na mastite do tipo ambiental e a *Klebsiella* spp. acomete geralmente rebanhos manejados em camas de serragens, com evolução crônica, podendo permanecer no animal mesmo após a secagem (HOGAN & SMITH, 2012).

Considerando o universo de 20 vacas mastíticas que apresentaram enterobactérias nas amostras de leite, em 75% (15/20) houve isolamento concomitante com outro agente bacteriano como o *Staphylococcus aureus*, em pelo menos duas das três coletas realizadas, caracterizando a ocorrência de mastite do tipo contagiosa (PEIXOTO et. al. 2015; LANGONI et. al. 2015). Os principais carreadores dessa bactéria são os ordenhadores que albergam a bactéria na pele devido ao alto teor de sal e suor. Sua eliminação pode ser transitória, uma vez que em pequenas propriedades não apresentam programas de boas práticas de higiene, que contribuem para a disseminação destes microrganismos (PAIXÃO et al., 2015). A ocorrência de mastite contagiosa no rebanho indica a necessidade da adoção de padrões de higiene na ordenha e cuidados na substituição do lote, verificando o estado de saúde do úbere das vacas adquiridas para que não ocorra a transmissão do microrganismo de vaca para vaca (OLIVEIRA et. al., 2011).

Em apenas um animal 5% (1/20) houve o crescimento de *E.coli* nas três amostras coletadas, caracterizando a persistência do agente e a sua confirmação na etiologia da doença. Porém em 20% (4/20) dos animais mastíticos, a presença de enterobactérias foi detectada apenas em uma das coletas realizadas. De acordo com Hogan & Smith, (2012) a duração da infecção intramamária causada por patógenos ambientais varia de acordo com os agentes causadores e pode ser associada com o grau de adaptação ao hospedeiro. Desse modo, estes agentes podem causar casos clínicos leves não identificados - que em seguida aparentam estar curados, porém retornam rapidamente para um quadro subclínico e podem não ser detectados devido à baixa carga no leite.

Em 46% (17/37) das amostras de leite de vacas não mastíticas (com média de CCS de 62.000 céls/mL) também houve crescimento bacteriano (21/47), ao contrário do que demonstra a literatura, onde amostras de leite com CCS inferior a 200.000 céls/ mL dificilmente apresentam crescimento destes principais patógenos (GIOVANNINI et al., 2015). Autores como Philpot e Nickerson (2002) afirmam que contagens inferiores a 200.000 células/mL provavelmente não indicam infecção da glândula mamária e que estes agentes poderiam estar no animal devido à contaminação recente com material fecal, por exemplo, indicando a presença de característica transitória.

Nenhuma amostra de fezes apresentou *Salmonella* sp e também não apresentou qualquer outra enterobactéria que não fosse *E.coli*, que esteve em totalidade (100%) nas 94 amostras avaliadas.

A análise das amostras de água dos diferentes pontos da propriedade (bebedouro, riacho, poço, torneira e açude) foi realizada considerando o NMP (Número Mais Provável) (Anexo C), que revelou resultados insatisfatórios de todas as amostras em todas as estações, uma vez que os padrões de potabilidade estavam superiores aos estipulados pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2004) (**Tabela 4**).

Tabela 4. Média do número mais provável de Coliformes Totais e Coliformes termotolerantes das quatro estações em amostras de água dos diferentes pontos da propriedade

Pontos de coleta	Coliformes Totais (NMP/100mL)	Coliformes Termotolerantes (NMP/100mL)
Poço	907	226
Açude	1103	52
Bebedouro	875	432
Torneira	1250	110
Riacho	1208	945

Dentre os microrganismos frequentemente veiculados pela água utilizada nos processos de limpeza dos equipamentos de ordenha e utensílios, destacam-se os coliformes, em especial a *E. coli*, que pode estar associada ao surgimento de casos de mastite na propriedade (MIGUEL, 2010). Outro aspecto relevante, é que no meio rural as principais fontes de abastecimento de água são os poços rasos, açudes e riachos, fontes bastante suscetíveis à contaminação por estarem próximas a fossas e as áreas de pastagem ocupadas por animais. Os coliformes são habitantes naturais da microbiota intestinal dos bovinos, estando presente em suas fezes e podem ser facilmente disseminados através da água (PASTORE, 2014; HESSEL, 2015).

As amostras da água provenientes do riacho apresentaram valores consideravelmente altos tanto para coliformes totais quanto termotolerantes. Na propriedade avaliada, o riacho era empregado de forma esporádica como fonte de água pelos animais, que a utilizavam durante o pastejo. A presença destes microrganismos na água é utilizada como parâmetros de avaliação de qualidade microbiológica por serem consideradas bactérias indicadoras de contaminação fecal, o que torna os achados do presente trabalho preocupantes. Devido à baixa qualidade da água utilizada na fazenda estudada, mais pesquisas e adoção de medidas corretivas são necessárias, devido aos riscos de contaminação do leite, afetando consideravelmente sua qualidade final.

Para determinar as diferenças estatísticas entre as amostras coletadas nas diferentes estações do ano e entre os diferentes pontos de coleta, foi realizado o teste estatístico de Mann-Whitney (teste não paramétrico) - devido à falta de normalidade dos dados, considerando 0,5% de significância.

O teste de significância detectou diferença entre coliformes totais nas estações de inverno e verão, sendo que a maior concentração de coliformes totais presentes nas amostras coletadas foi no verão ($P=0,0472$) (**tabela 5**).

Tabela 5. Resultados das análises estatísticas nas diferentes estações do ano, através do Teste de Mann-Whitney (p-valor= 0,05). Em destaque diferenças significativas.

		Coliformes totais				Coliformes termotolerantes		
		Inverno	Primavera	Verão	Outono	Inverno	Primavera	Verão
Coliformes totais	Primavera	0,3472						
	Verão	0,0472	0,1745					
	Outono	0,0601	0,4647	0,4647				
	Inverno	0,8345	0,8345	0,009	0,0283			
Coliformes termotolerantes	Primavera	0,6015	0,4034	0,0163	0,0758	0,9168		
	Verão	0,8345	0,8345	0,0122	0,0283	0,9168	0,6015	
	Outono	0,9168	0,1745	0,009	0,0163	0,9168	0,754	0,754

Estes dados podem estar relacionados aos fatores propícios para o desenvolvimento destes microrganismos na estação do verão, como à presença de matéria orgânica, que em associação outros fatores como umidade e calor potencializa sua proliferação (OLIVEIRA, 2011).

Houve também uma diferença significativa dos coliformes totais nas estações de verão e outono em relação aos coliformes termotolerantes nas outras estações. Esta diferença pode estar associada aos baixos níveis pluviométricos observados nas demais estações em relação ao verão e outono. Uma vez que as chuvas durante o verão contribuem para que ocorra a lixiviação do solo, desta forma, a água da chuva ao percolar o solo arrasta consigo materiais orgânicos de resíduos animais e vegetais em decomposição presentes no mesmo que terão como destino o lençol freático e aquíferos profundos resultando na contaminação da água (DE RESENDE, 2009). Outro aspecto importante a ser considerado é que durante as estações de verão e outono houve uma redução considerável no número de animais do rebanho, consequentemente menor quantidade material fecal e microrganismos, sendo carregado pela chuva.

O teste de significância demonstrou que não houve diferença entre os cinco pontos de coleta (**Tabela 6**), indicando a contaminação por coliformes totais e termotolerantes em todos eles.

Tabela 6. Resultados das análises estatísticas nos cinco diferentes pontos coletados, através do Teste de Mann-Whitney a 5% de probabilidade (p-valor = 0,05).

	Poço	Açude	Bebedouro	Torneira
Açude	0,248			
Bebedouro	0,4948	0,5635		
Torneira	0,9581	0,3446	0,7527	
Riacho	0,3184	0,0929	0,2271	0,248

Apesar de a propriedade leiteira estar situada em uma área rural, a mesma apresentava saneamento básico adequado em toda a sua extensão, diminuindo assim a possibilidade desta contaminação ser de origem humana. Portanto, a presença de gado leiteiro em pastagem próxima a estes aquíferos, poderia ocasionar a disseminação de resíduos fecais através da erosão e água drenada via escoamento superficial e lixiviação. Os aquíferos subterrâneos em princípio deveriam ser mais protegidos da contaminação, porém, a atividade agrícola desenvolvida de forma inadequada tem contribuído para que a dispersão de resíduos derivados de animais contamine a água das áreas rurais (LIMA, 2014). A investigação da origem da contaminação dos aquíferos no ambiente de produção leiteira é fundamental para minimizar a contaminação ambiental e conseqüentemente os danos causados na saúde pública.

Na linha de ordenha foram obtidos 19 isolados sendo 42% (8/19) identificados como *Escherichia coli*, seguidos de *Enterobacter cloacae* em 26% (5/19), *Klebsiella pneumonia* em 11% (2/19), *Enterobacter asburiae* em 16% (3/19) e *Morganella morganii* em 5% (1/19). A presença de enterobactérias no ambiente leiteiro é por sua vez frequente visto que no momento de ordenha muitos animais costumam defecar. Porém, medidas de higiene devem ser implementadas de modo a minimizar o impacto desta contaminação. Na propriedade analisada, foram observadas falhas tanto nas etapas de higienização das mãos dos ordenhadores quanto da ordenhadeira mecânica utilizada. Outro fator observado foi a frequente circulação de animais de companhia, como cães, no ambiente de ordenha.

A ordenhadeira mecânica apresentou o maior número enterobactérias isoladas, com quatro espécies diferentes das oito isoladas. Para diminuir a frequência destas bactérias e evitar a sua disseminação, a ordenhadeira mecânica deve ser submetida à higienização e manutenção, de acordo com as indicações do fabricante e as exigências regulamentares (TAFFAREL et al.,2015). Em adição, o ordenhador deve se atentar para não deixar a teteira cair durante a ordenha, pois isto pode acarretar em contaminação da mesma e conseqüentemente do leite durante a ordenha (De OLIVEIRA ALMEIDA, 2015).

Acredita-se que os dados apresentados no presente estudo podem contribuir para a compreensão dos fatores que estão relacionados à permanência das enterobactérias no ambiente de produção leiteira, considerando que a presença de material fecal somado à inadequada desinfecção dos tetos dos animais, má higienização das mãos dos ordenhadores e utilização de água contaminada na limpeza dos equipamentos, são fatores primordiais para a permanência destes agentes neste ambiente e conseqüentemente aumentam o risco para o desenvolvimento da mastite bovina.

CONCLUSÃO

- Foram obtidas 183 enterobactérias após isolamento de 444 amostras provenientes da linha de ordenha;
- A técnica proteômica confirmou 92,9% das espécies de enterobactérias identificadas pelo método bioquímico convencional;
- O sequenciamento do gene *gyrB* confirmou em 100% o resultado da técnica proteômica, que foi utilizada como metodologia de referência quando comparada ao método bioquímico convencional;
- O gênero *Enterobacter* spp apresentou a maior porcentagem de identificação discordante (76,9%) pelos métodos bioquímicos;
- O alto nível de mastite subclínica pode ser explicado pelo elevado nível de contaminação ambiental por enterobactérias na água, fezes, ordenhadeira mecânica e ordenhadores.
- Em 70% (14/20) das vacas mastíticas que apresentaram enterobactérias no leite, também foram isolados outros agentes como *S.aureus*;
- A água é uma importante fonte de contaminação em ambiente de ordenha na propriedade leiteira avaliada;
- Os processos de higienização do pessoal que trabalha na linha de ordenha é essencial no controle e prevenção da mastite ambiental, assim como a limpeza e desinfecção dos equipamentos de ordenha.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-HOLY, M.A.; LIN, M.; ABU-GHOUSH, M.M.; AL-QADIRI, H.M.; RASCO, B.A. Thermal resistance, survival and inactivation of *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) in powdered and reconstituted infant formula. **J Food Safety**, v.29, p.287-301. 2009.

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v.25, p.3389-3402, 1997.

ANHALT, J.P.; FENSELAU, C. Identification of bacteria using mass spectrometry. **Anal Chem**, v.47, p. 219–225, 1975.

BARREIRO, J.R. Identificação de patógenos causadores de mastite subclínica por espectrometria de massas. (**Dissertação de Doutorado**). Universidade de São Paulo. 2010.

BECKER, K.; HARMSSEN, D.; MELLMANN, A.; MEIER, C.; SCHUMANN, P.; PETERS, G.; VON EIFF, C. Development and evaluation of a quality controlled ribosomal sequence database for 16S ribosomal DNA based identification of Staphylococcus species. **J. Clin. Microbiol.**, v 42, n.11, p.4988-4995. 2004.

BENEDETTE, M. F.; SILVA, D.; ROCHA, F.P.C.; SANTOS, D.A.N.; COSTA, E.A.D.; AVANZA, M.F.B. Mastite Bovina. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária**, Ano VI, n.11, 2008.

BIZZINI, A., GREUB, G. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. **Clin. Microbiol. Infect**, v.16, n.11, p. 1614–1619, 2010.

BLOWEY, R. W.; EDMONDSON, P. Mastitis control in dairy herds. 2. ed. **Cabi International**, p. 266, 2010.

BLUM, S.E.; HELLER, E.D.; LEITNER, G. Long term effects of Escherichia coli mastitis. **The Veterinary Journal**, v.201, p.72–77, 2014.

BOU, G.; OLMOS, A.F.; GARCIA, C.; NIETO, J.A.S.; VALDEZATE, S. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, v.29, n.8, p.601–608, 2011.

BRADY, C.; CLEENWERCK, I.; VENTER, S.; COUTINHO, T.; DE VOS, P. Taxonomic evaluation of the genus *Enterobacter* based on multilocus sequence analysis (MLSA): proposal to reclassify *E. nimipressuralis* and *E. amnigenus* into *Lelliottia* gen. nov. as *Lelliottia nimipressuralis* comb. nov. and *Lelliottia amnigena* comb. nov., respectively, *E. gergoviae* and *E. pyrinus* into *Pluralibacter* gen. nov. as *Pluralibacter gergoviae* comb. nov. and *Pluralibacter pyrinus* comb. nov., respectively, *E. cowanii*, *E. radicincitans*, *E. oryzae*

and *E. arachidis* into *Kosakonia* gen. nov. **Systematic and applied microbiology**, v.36, p.309-319. 2013.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E DO ABASTECIMENTO (MAPA). Instrução Normativa N°62. Regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, do leite tipo B, do leite tipo C, do leite pasteurizado e do leite cru refrigerado e o regulamento técnico da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. **Diário Oficial da União**, 2011.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa n° 13. Aprova o Regulamento Técnico sobre Aditivos para Produtos Destinados à Alimentação Animal, segundo as boas práticas de fabricação, contendo os procedimentos sobre avaliação da segurança de uso, registro e comercialização. **Diário Oficial da União**, 2004.

CARBONNELLE, E.; MESQUITA, C.; BILLE, E.; DAY, N.; DAUPHIN, B., BERETTI, J.L.; NASSIF, X. MALDITOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. **Clin Biochem**, v.44, p.104–109, 2010.

CHU, W.; ZERE, T.R.; WEBER, M.M.; WOOD, T.K.; WHITELEY, M.; HIDALGO-ROMANO, B.; MCLEAN, R.J. Indole production promotes *Escherichia coli* mixed-culture growth with *Pseudomonas aeruginosa* by inhibiting quorum signaling. **Applied and environmental microbiology** v78, p. 411-419, 2012.

COX, J.; MANN, M. Quantitative, high-resolution proteomics for data-driven systems biology. **Annu Rev Biochem**, v.80, p.273-299, 2011.

CROXATTO, A.; PROD'HOM, G.; GREUB, G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. **FEMS Microbiol Rev**, v.36, n.2, p. 380-407. 2012.

CUNHA, A.P.; SILVA, L.B.G.; PINHEIRO, J.W.; SILVA, D.R.; OLIVEIRA, A.A.F.; SILVA, K.P.C.; MOTA, R.A. Perfil de sensibilidade antimicrobiana de agentes contagiosos e ambientais isolados de mastite clínica e subclínica de búfalas. **Arq. Inst. Biol**, v.73, n.1, p.17-21. 2006.

DAUGA, C. Evolution of the *gyrB* gene and the molecular phylogeny of Enterobacteriaceae: a model molecule for molecular systematic studies. **Int J Syst Evol Microbiol**, v.52, p.531–547. 2002.

DE OLIVEIRA ALMEIDA, T.J.; DE ARAÚJO, V.V.; DA SILVA FEITOSA, P.J.; DA SILVA, A.D.F.A. Perfil sociocultural de produtores de leite bovino do município de São Bento do Una (PE) e suas implicações sobre o manejo da ordenha. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v.9, n.1, p.125-138. 2015.

DE RESENDE, A. V. **Agricultura e qualidade da água: contaminação da água por nitrato**. Embrapa Cerrados, 2002.

DELMAS, J.; BREYSSE, F.; DEVULDER, G.; FLANDROIS, J.P.; CHOMARAT, M. Rapid identification of Enterobacteriaceae by sequencing DNA gyrase subunit B encoding gene. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.55, p. 263–268, 2006.

DEMEU, F.A.; LOPES, M. A.; ROCHA, C.M.B.M.D.; COSTA, G.M.D.; SANTOS, G.D.; NETO, A.F.; Influence of production scale in the economic impact of mastitis in dairy cattle herds. **Revista ceres**, v.62, n.2, p.167-174. 2015.

DRANNCOURT, M.; BOLLET, C.; CARTA, A. Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoutella* gen. nov., with description of *Raoutella ornythinolytica* comb. Nov., *Raoutella terrigena* comb. Nov. and *Raoutella planticola* comb. **Int J Syst Evol Microbiol**, v.51, p.925-932, 2001.

EMERSON, D.; AGULTO, L.; LIU, H.; LIU, L.; Identifying and characterizing bacteria in an era of genomics and proteomics. **BioScience**, v.58, n.10, p.925-936. 2008.

FUKUSHIMA, M.; KAKINUMA, K.; KAWAGUCHI, R.. Phylogenetic analysis of *Salmonella*, *Shigella*, and *Escherichia coli* strains on the basis of the *gyrB* gene sequence. **Journal of clinical microbiology**, v.40, n.8, p. 2779-2785. 2002.

GIOVANNINI, C.I.; SANTOS, P.A.; RINDADE, J.D.S.; ROBL, A.A.B.; DENISE, D.D.C.B.C.; De LIMA, V.M.M. A melhoria da qualidade do leite e a adequação da IN 62. **Revista Eletrônica Interdisciplinar**, v.2, n.14, 2015.

GONZALEZ PJB, SOTO VARELA Z, HERNÁNDEZ E, VILLAREAL CJ. Aislamiento de *Salmonella* spp y herramientas moleculares para su detección. **Revista Científica Salud Uninorte**, v.30, n.1, 2013.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp. Ser**, v.41, p.95-98, 1999.

HALTIA, L.; HONKANEN-BUZALSKI, T.; SPIRIDONOVA, I.; OLKONEN, A.; MYLLYS, V. A study of bovine mastitis, milking procedures and management practices on 25 Estonian dairy herds. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.48, p.22–27, 2006.

HEALY, B.; COONEY, S.; O'BRIEN, S.; IVERSEN, C; WHYTE, P; NALLY, J. *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*): An opportunistic foodborne pathogen. **Foodborne Pathog Dis**, v.7, p.339-50, 2010.

HESSEL, C.T. *Escherichia coli* o157 em água de irrigação: detecção, multiplicação e sobrevivência ao hipoclorito de sódio. **Dissertação (Ciência e tecnologia de Alimentos)**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2015.

HOFFMANN, H.; ROGGENKAMP, A. Population genetics of the nomenclature species *Enterobacter cloacae*. **Appl Environ Microbiol**, v.69, p.5306–5318, 2003.

HOGAN, J.; SMITH, K. L. Managing Environmental Mastitis. **Vet Clin North Am Food Anim Pract**, v. 28, n. 2, p. 217-224, 2012.

HOGAN, J.; SMITH, K.L. Managing environmental mastitis. **Veterinary Clinics North America: food animal practice**, v.28, n.2, p.217-224. 2012.

HOGAN, J.S.; GONZALEZ, R.N.; HARMON, R.J.; NICKERSON, S.C.; OLIVER, S.P.; PANKEY, J.W.; SMITH, K.L. Laboratory Handbook on Bovine Mastitis, National Mastitis Council, **Inc., Madison**, Wisconsin, USA. 1999.

HOSSEINZADEH, S. AND SAEI, H.D. Staphylococcal species associated with bovine mastitis in the North West of Iran: Emerging of coagulase-negative staphylococci. **International Journal of Veterinary Science and Medicine**, v.2, p.27–34, 2014.

HUANG, C.H.; CHANG, M.T.; HUANG, L. Use of novel species-specific PCR primers targeted to DNA gyrase subunit B (*gyrB*) gene for species identification of the *Cronobacter sakazakii* and *Cronobacter dublinensis*. **Molecular and cellular probes**, v.27, n.1, p.15-18. 2013.

IBGE. **Censo Demográfico e Econômico**, 2014. <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 27 de dezembro de 2015.

ISENBERG, H.D. Clinical Microbiology Procedures Handbook, American Society for Microbiology. Washington DC: **ASM Press**, p. 3213–323, 2004.

JANDA, J.M.; ABBOTT, S.L. Bacterial Identification for Publication: When Is Enough Enough?. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.6, p.1887–1891, 2002.

KÄMPFER, P.; NIENHÜSER, A.; PACKROFF, G.; WERNICKE, F.; MEHLING, A. Molecular identification of coliform bacteria isolated from drinking water reservoirs with traditional methods and the Colilert-18 system. **Int J Hyg Environ Health**, v.211, p.374–384, 2007.

KAIPAINEN, T.; POHJANVIRTA, T.; SHPIGEL, N. Y. Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from bovine clinical mastitis. **Veterinary Microbiology**, v.85, p.37-46, 2002.

KEEFE, G. Update on Control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for management of mastitis. **Veterinary Clinics Food Animal**, Philadelphia, v. 28, n. 2, p. 203–216. 2012.

KONEMAN, W.E.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, JR.W.C. As Enterobacteriaceae. In: KONEMAN, E. W. **Diagnóstico microbiológico** – texto e atlas colorido. 6. ed. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica, p.263-329, 2012.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. **Briefings in bioinformatics**, v.5, n.2, p.150-163. 2004.

LANGONI, H. Qualidade do leite: Utopia sem um programa sério de monitoramento da ocorrência de mastite bovina. **Pesq. Vet. Bras**, v.33, n.5, p.620-626, 2013.

LANGONI, H., GUIMARÃES, F. F., COSTA, E. O. D., JOAQUIM, S. F., & MENOZZI, B. D. Milk cellularity and colony forming units in mastitis caused by coagulase-positive staphylococci and coagulase negative. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.35, n.6, p.518-524. 2015.

LANGONI, H.; LAURINO, F.; FACCIOLI, P. Y.; SILVA, A. V.; MENOZZI, B. D. Cultivo microbiológico e a sensibilidade no isolamento de patógenos nas mastites bovinas. **Veterinária e Zootecnia**, v.16, n.4, p.708-715, 2009.

LIMA, G. F. C. A. D. O gerenciamento de resíduos sólidos urbanos em Rio Pomba–MG na visão de atores sociais que participaram do processo. 2014.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**, 12.ed. Porto Alegre: ArtMed. 2010.

MIGUEL, P.R.R. Incidência de contaminação no processo de obtenção do leite e suscetibilidade a agentes antimicrobianos. **Dissertação (Zootecnia)**. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. 2010.

MOTTA, C.C.; ROJAS, A.C.C.M.; DUBENCZUK, F.C.; BOTELHO, L.A.B.; MOREIRA, B.M.; DE OLIVEIRA COELHO, S.M.; DE SOUZA, M.M.S. Verification of molecular characterization of coagulase positive *Staphylococcus* from bovine mastitis with matrix-assisted laser desorption ionization, time-offlight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) mass spectrometry. **African Journal of Microbiology Research**, v.8, p.3861-3866, 2014.

MUNOZ, M.A.; AHLSTROM, C.; RAUCH, B.J. Fecal shedding of *Klebsiella pneumoniae* by dairy cows. **J. Dairy Sci**, v.89, p.3425-3430. 2006.

NEIDHARDT, F.C. How microbial proteomics got started. **Proteomics**, v.11, n.15, p.2943-2946. 2011.

NOLTE, F.S.; CALIENDO, A.M. Molecular detection and identification of microorganisms, p.234-256. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; JORGENSEN, J.H.; PFALLER, M.A.; YOLKEN, R.H. Gene sequences useful for predicting relatedness of wholegenomes in bacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.53, (Eds)

Manual of Clinical Microbiology. 8thed. ASM Press, Washington. Zeigler DR. p.1893–1900. 2003.

OLIVEIRA, C.M.C.; SOUSA, M.G.S.; SILVA, N.S.; MENDONÇA, C.L.; SILVEIRA J.A.S.; OAIGEN, R.P.; ANDRADE, S.J.T.; BARBOSA, J.D. Prevalência e etiologia da mastite bovina em rebanhos leiteiros na região de Rondon do Pará, Estado do Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, n.2, p.104-110, 2011.

OLIVER, S. P.; GILLESPIE, B. E.; IVEY, S. J.; LEWIS, M. J.; JOHNSON, D. L.; LAMAR, K. C.; MOOREHEAD, H.; DOWLEN, H. H.; CHESTER, S. T.; HALLBERG, J. W. Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection and determination of milk quality. Verona, WI: **National Mastitis Council**, 2004.

OTTO, A.; BERNHARDT, J.; HECKER, M.; BECHER, D. Global relative and absolute quantitation in microbial proteomics. **Current Opinion in Microbiology**, v.15, p.364–372, 2012.

PAIXÃO, M.G.; LOPES, M.A.; PINTO, S.M.; DE ABREU, L.R. Impacto econômico da implantação das boas práticas agropecuárias relacionadas com a qualidade do leite. **Revista Ceres**, v.61, n.6. 2015.

PASTORE, A.P.W. Análise da resistência a antimicrobianos e determinação dos grupos filogenéticos em isolados de *Escherichia coli* de origem ambiental, humana e animal. **Dissertação (Microbiologia Agrícola e meio ambiente)**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2014.

PATEL, R. MALDI-TOF MS for the Diagnosis of Infectious Diseases. **Clinical chemistry**, v.61, n.1, p.100-111. 2015.

PATERSON, D.L. Infections Due to Other Members of the Enterobacteriaceae, Including Management of Multidrug-Resistant Strains. **Goldman's Cecil Medicine**, v.2, p.1874–1877. 2012.

PEDRAZA, J.G.; SANANDRES, N.P.; VARELA, Z.S.; AGUIRRE EH, CAMACHO J.V. Aislamiento microbiológico de *Salmonella* spp. y herramientas moleculares para su detección. **Salud Uninorte**, v.30, p.73-94. 2014.

PEIXOTO, M. M.; GRESSLER, L. T.; SUTILI, F. J.; COSTA, M. M.; VARGAS, A. C. Ação dos desinfetantes sobre a adesão e biofilme consolidado de *Staphylococcus* spp. **Pesq. Vet. Bras**, v.35, n.2, p.105-109, 2015.

PHILPOT, W.N.; NICKERSON, S.C. Winning the fight against. Naperville: Westfalia, p.187.2002.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; HINCHCLIFF, K.W. et al. (Eds) Veterinary medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats. 10.ed. **Philadelphia: Saunders**, p.673-762. 2007.

RICHTER, S.S.; SERCIA, L.; BRANDA, J.A.; BURNHAM, C.A.; BYTHROW, M.; FERRARO, M.J.; MANJI, R. Identification of Enterobacteriaceae by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry using the VITEK MS system. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**, v. 32, n.12, p.1571-1578. 2013.

ROSSELLÓ-MORA, R.; AMANN, R. The species concept for prokaryotes. **FEMS Microbiol. Lett**, v.25, p.39–67. 2001.

SANTIAGO, G.S.; LASAGNO, M.C.; ALENCAR, T.A.; RIBEIRO, L.; DUBENCZUK, F.C.; OLIVA, M.S., ... & COELHO, S. M. (2015). AmpC-lactamase production in enterobacteria associated with bovine mastitis in Brazil. *African Journal of Microbiology Research*, 9(8), 503-508.

SANTOS M.V. Tratamento da mastite começa no laboratório 2014. Mundo do Leite. Disponível em < <http://www.portaldbo.com.br/Mundo-do-Leite/Colunas/Tratamento-da-mastite-comeca-no-laboratorio/10595>> Acesso em 28 de janeiro de 2016.

SANTOS M.V.; FONSECA L.F.L. Estratégias para o controle de mastite e melhoria da qualidade do leite. Manole, São Paulo. p 314.2007.

SANTOS, C.; PATERSON, R.R.M.; VENÂNCIO, A.; LIMA, N. Filamentous fungal characterizations by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **J Appl Microbiol**, v.108, p.375–85. 2010.

SILVA, C. C.; VARGAS, C. G.; LUND, R. G.; LADEIRA, S.; GONZALES, H. L.; NASCENTE, P.S. Suscetibilidade *in vitro* de bactérias causadoras de mastite frente a antimicrobianos. 2008. Disponível em < [HTTP :// WWW .ufpel .edu br/cic/ 2008/ cd/pages/pdf/CA/CA_00928.pdf](http://WWW.ufpel.edu.br/cic/2008/cd/pages/pdf/CA/CA_00928.pdf)> Acessado em 26 de dezembro de 2015.

SIMOJOKI, H. Bovine mastitis caused by coagulase-negative staphylococci: host response and bacterial factors. 2011. 81p. **Dissertação** (Mestrado) - Faculty of Veterinary Medicine, Department of Production Animal Medicine, University of Helsinki, Finland, 2011.

SUAREZ, S.; NASSIF, X.; FERRONI, A. Applications de la technologie MALDI-TOF en microbiologie clinique. **Pathologie Biologie**, v.63, n.1, p. 43-52. 2015.

TAFFAREL, L.E.; COSTA, P.B.; TSUTSUMI, C.Y.; KLOSOWSKI, E.S.; PORTUGAL, E.F.; LINS, A.C. Variação da composição e qualidade do leite em função do volume de produção, período do ano e sistemas de ordenha e de resfriamento. **Semina: Ciências Agrárias**, v.36 n.3Supl1, p.2287-2300. 2015.

VAN DEN BELD, M.J.; REUBSAET, F.A. Differentiation between *Shigella*, enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) and noninvasive *Escherichia coli*. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v.31, p.899–904, 2012.

VAN VEEN, S.Q.; CLAAS, E.C.J.; KUIJPER, E. J. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. **Journal of clinical microbiology**, v.48, n.3, p. 900-907. 2010.

WOO, P.C.; CHEUNG, E.Y.; LEUNG, K.W.; YUEN, K.Y. Identification by 16S ribosomal RNA gene sequencing of an Enterobacteriaceae species with ambiguous biochemical profile from a renal transplant recipient. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v.39, n.2, p.85-93. 2001.

ZADOKS, R. N. ; MIDDLETON, J. R.; McDOUGALL, S.; KATHOLM, J.; SCHUKKEN, Y. H. Molecular Epidemiology of Mastitis Pathogens of Dairy Cattle and Comparative Relevance to Humans. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v.16, n.4, p. 357-372. 2011.

8 ANEXOS

ANEXO A- Resultados dos testes de diagnóstico para detecção da mastite bovina utilizados no presente trabalho.

Animais	CCS (x mil/mL)	CMT(AD/PD/AE/PE)		
		Coleta 1 (30/06/2014) Inverno	Coleta 2 (07/07/2014) Inverno	Coleta 3 (14/07/2014) Inverno
Sertaneja	589	-/-/+	-/-/++	- /- /- /++
Demetria	76	-/-/++	-/-++/-	+/-+/-
Borboleta	1057	+/+/-++	-/-++/-	-/-/++
Alteza	729	-/-/-	+++ /+++ /- /++	++ /+++ /+++ /+++
Fortuna	51	-/-/-	-/-+/-	-/-/-
Carla	6863	-/+/-+++	-/-++/+	-/+++/-/+++
Cinderela	547	-/-/+	-/+/-	-/-/+
Paola	793	-/-/+	-/-+++/-	-/+++ /+++ /+++
Leila	1263	-/-++/+	'+++ /+++ /- /+	+++ /+++ /+++ /+++
Nara	717	-/-+++/-	+++ /+++ /- /++	++ /+ /+++ /+
Beijoqueira	68	-/-/-	-/-+/-	-/-/+
Jandira	343	-/-+/-	-/-++/-	-/+++ /- /-
Melissa	133	-/-/+	-/-/+	-/-/+
Helô	177	+/-/-	+/-+/-	-/-+/-
Holanda	99	-/-/-	-/-/-	+/-/-
Adelaide	48	-/-/-	-/-/-	-/-/-
Chalana	441	+/-/-	+/-/-	++ /- /- /-
Bandeira	340	+ /+ /+	- /+++ /- /+	- /+ /+++ /+
Janga	386	-/-/-	-/-/+	-/-/-
Naiara	91	-/-/-	-/-/-	-/-/-
Mari	629	-/+/-	-/-/-	++ /- /+++ /-
Elizangela	149	-/-/-	-/-/-	-/-/-
Barcelona	118	-/-/-	-/-/-	-/-+/-
Raina	16	-/-/-	-/-/-	- /+ /+++ /-
Imperatriz	600	-/-+/-	-/-+/-	- /+ /+++ /+
Baixinha	575	-/-/+	-/+/-	- /- /- /++
Nina	19	-/-/-	+/-/-	-/-/-
Hungria	107	-/-/-	-/-/-	-/-/-
Chalô	8	-/-/-	-/-/-	-/-/-
Magnolia	25	-/-/-	-/-/-	-/-/-
Julieta	877	+++ /- /+++ /+	-	-
Luneta	-	-	- /- /+ /-	'- /- /- /-

Animais	CCS (x mil/mL)	CMT(AD/PD/AE/PE)		
		Coleta 1 (13/10/2014) Primavera	Coleta 2 (20/10/2014) Primavera	Coleta 3 (27/10/2014) Primavera
Alteza	307	+/-/-/-	++/-/-/-	++/-/-/-
Gaucha	242	-/++/-/-	-/-/-/-	-/-/-/-
Princesa	272	-/-/+/+	-/-/+++/	-/-/-/+
Cabocla	793	-/+//++	-/++++//+++	-/++++/-/+++
Seropédica	142	-/-/+/-	-/-/-/-	++/-/+/-
Aline	100	+/-/-/-	-/-/-/-	-/++++/-/++
Chalana	9999	++++/-/++++/-	++++/-/++++/-	++++/++++/-/-
Duqueza	1582	-/++//+++	++++//+++//+++	++++//+++//+++
Quatá	46	-/-/+/-	-/-/-/-	-/-/-/-
Jangada	730	+//+/-/++	-/-/+++++	+//+++//+++
Farroma	354	-/-/-/-	-/-/-/+	++/-/-/-
Tizil	273	-/-/-/-	+/-/++/-	-/-/++++/-
Mineira	1618	-/++//+++	-/++//+/-	+//+++//+++//+++
Brasil	269	-/-/-/++	-/-/-/++	-/-/+//+++
Lua	10	-/+/-/-	+/-/-/-	-/-/-/-
Belgica	360	+//++/-/-	-/-/-/+	-/-/-/-
Estrela	12	-/-/-/-	-/-/-/-	-/-/+/-
Amazonia	4	++/-/++/-	++++/-/-/-	+/-/+/-
Floresta	12	-/-/-/-	-/-/-/-	-/-/-/-
Astra	171	-/+/-/-	-/++++/-/-	+/-/-/-
Gaiola	1	-/-/-/-	-/-/-/+	-/+/-/-
Carioca	1071	++++/-/-/-	-/-/++++	++++/-/++++/-
Rifaine	423	+//++//+++	-/-/-/-	-/-/-/-
Dondoca	17	-/-/-/-	-/-/-/-	-/-/-/-
Nirvana	1	+//+/-/-	-/-/-/-	-/-/-/-
Novela	15	-/+//+/-	-/-/-/-	-/-/-/-
Passa vinte	346	+/-/-/-	-/++++/-/-	-/++++/-/-
Laica	1429	++//+++//+++//+++	++++//+++//+++//+++	+/-/+//+
Marisa	815	+/-/+/-	++//+++//+++	-/-/-/-
Monaliza	139	++/-/-/-	-/-/-/-	-/-/-/-
Boneca	52	-/-/-/-	-/-/-/-	-/-/-/-
Chica	897	-/-/+/+	+//+/-/-	++++//+//+++/-
Bia	428	-/-/-/-	-/-/+//++	++//++++//+++
Catita	19	-/-/-/-	++//+//+++/-	-/+//+/-
Pretinha	120	-/-/-/-	-/-/-/-	-/-/-/-
Siriema	74	-/-/-/-	-/-/-/-	-/+//+/-
Pombinha	4483	-/-/+//++	-/-/-/+++	-/-/-/+

Animais	CCS (x mil/mL)	Coleta 1 (09/03/2015) Verão	Coleta 2 (16/03/2015) Verão	Coleta (23/03 /2015) Verão
Mellita	430	-/-/+/+	-/-/+/+/+	-/+/+/+/+/+
Magal	160	-/+/-/-	-/+/-/-	-/+/-/-
Baleia	1439	-/+/+/-/+/+	-/+/+/+/-/+/+	-/+/+/+/-/+/+
Nublada	6920	-/+/+/+/-/+/+	-/-/-/-	-/-/-/+/+
Beicho	89	-/+/+/+/+/+/+	-/-/-/-	-/-/-/-
Dorinha	170	-/-/-/-	-/-/-/-	-/-/-/-
Magrela	3829	+/+/+/+/+/+/+/+	-/+/+/-/+/+	+/+/+/+/+/+/+/+
Gaiola	282	+/-/-/+	-/-/-/+/+	+/+/-/+/-
Gabriela	11	-/-/-/-	-/-/-/-	-
Boa Sorte	-	-	-	+/-/-/-
Animais	CCS (x mil/mL)	Coleta 1 (18/05/2015) Outono	Coleta 2 (25/ 05/2015) Outono	Coleta3(01/06/2015) Outono
Bertioga	135	-/-/+/-	-/-/-/+	+/-/+/-
Castanha	1957	+/+/+/+/+/+	+/+/+/+/+/-	+/+/+/+/+/+/+/+
Braúna	5471	+/-/+/+	-/+/+/+/-	-
Gaiola	1986	+/-/+/+	+/-/+/+/+	+/+/+/+/+/+/+/+
Americana	1583	-/+/+/-/+/+	'-/-/+/+/+	-/-/+/+/+
Mamona	5731	+/+/+/+/+/+/+	+/+/+/+/+/+/+	+/+/+/+/+/+/+/+
Rani	657	-/+/-/+	+/+/-/-/+/+	+/+/+/-/+
Naiara	1022	-/-/-/+/+	-/-/-/+/+	-/-/+/+/-
Morena	771	-/-/+/+/-	+/+/+/-/-	+/+/+/-/+
Sol	5816	+/+/+/+/+/-	+/+/+/-/+	+/+/+/-/+
Amora	237	-/-/-/-	-	-
Meia-noite	262	+/+/-/-	+/+/-/-	+/+/-/-
Marlene	96	-/-/-/-	-/+/+/+/-/+/+	+/+/+/+/+/+/+/+
Castanhola	176	-/-/-/-	-/-/-/-	-
Bragança	7033	+/+/+/-/+/+/+/+	+/+/+/+/-/+/+	-
Riqueza	363	-/+/-/-	-/-/-/-	-/-/+/+
Pantanal	1984	+/+/+/+/+/+/+	-/+/+/+/-	+/+/+/+/+/+/+

ANEXO B- Enterobactérias presentes em vacas mastíticas e não mastíticas.

Animais	CCS (x mil/mL)	MALDI -TOF MS		
		Coleta 1	Coleta 2	Coleta 3
Inverno				
Cinderela	547	<i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Leila	1263	<i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	- <i>Staphylococcus aureus</i>	- <i>Staphylococcus aureus</i>
Janga	386	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>S.haemolyticus</i>	- <i>Staphylococcus aureus</i>	- <i>Staphylococcus aureus</i>
Bandeira	340	- <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	- <i>Staphylococcus aureus</i>
Mari	629	- <i>Staphylococcus aureus</i>	- <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i>
Imperatriz	600	<i>Escherichia coli</i>	-	-
Luneta	877	-	<i>Escherichia coli</i>	-
Baixinha	575	-	<i>Escherichia coli</i>	-
Chalô*	8	<i>Serratia marcescens</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	- <i>Staphylococcus aureus</i>	- <i>Staphylococcus aureus</i>
Adelaide*	48	- <i>Staphylococcus aureus</i>	- <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Citrobacter freundii</i> -
Magnolia*	25	<i>Escherichia coli</i>	-	-
Melissa *	133	-	<i>Escherichia coli</i>	-
Elisângela*	149	-	-	<i>Enterobacter cloacae</i>
Primavera				
Cabocla	793	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Brasil	269	-	<i>Escherichia coli</i>	-
Rifaine	423	-	<i>Escherichia coli</i>	-
		-	-	<i>Staphylococcus aureus</i>
Carioca	1071	-	<i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	- -
Laica	1429	- <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	- <i>Staphylococcus aureus</i>

Mineira	1618	-	<i>E.coli/ K. pneumoniae</i>	-
		<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Marisa	815	-	<i>E.coli/ K. pneumoniae</i>	-
		<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-
Belgica	360	-	<i>E.coli/ K. pneumoniae</i>	-
		<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-
Jangada	730	-	-	<i>Enterobacter asburiae</i>
		<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-
Gaucha	242	-	<i>Escherichia coli</i>	-
		<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Floresta*	12	-	<i>Escherichia coli</i>	<i>E.coli/ K. oxytoca</i>
		-	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Novela*	15	-	<i>Escherichia coli</i>	-
		<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-
Gaiola*	1	-	<i>Escherichia coli</i>	-
		<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-
Monalisa*	139	-	<i>Serratia marcescens</i>	-
		ECP	-	-
Siriema*	74	-	<i>Escherichia coli</i>	<i>E.coli/ K. oxytoca</i>
Pretinha *	120	-	-	<i>Escherichia coli</i>
Lua*	10	-	<i>Escherichia coli</i>	-
Quatá*	46	-	<i>Escherichia coli</i>	-
Estrela*	12	-	<i>Escherichia coli</i>	-
Dondoca*	17	-	<i>Escherichia coli</i>	-
Astra*	171	-	<i>Escherichia coli</i>	-
Verão		Coleta 1	Coleta 2	Coleta 3
Beijo*	89	-	-	<i>Escherichia coli</i>
Outono		Coleta 1	Coleta 2	Coleta 3
Brucutu	5731	<i>Escherichia coli</i>		
		<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Meia noite	262	<i>Escherichia coli</i>		
		<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>

*Valores de CCS < 200.000 céls/mL

ANEXO C- Número Mais Provável de coliformes totais e termotolerantes em amostras de água coletadas em cinco pontos distintos da propriedade de acordo com as estações do ano.

Estação	Origem da Água	Coliformes Totais (NMP/100mL)	Coliformes Termotolerantes (NMP/100mL)
Inverno	Poço	130	350
	Açude	110	26
	Bebedouro	2	2
	Torneira	1600	300
	Riacho	32	300
Primavera	Poço	300	30
	Açude*	-	-
	Bebedouro	1600	1600
	Torneira	900	11
	Riacho	1600	1600
Verão	Poço	1600	23
	Açude	1600	50
	Bebedouro	1600	110
	Torneira	1600	50
	Riacho	1600	1600
Outono	Poço	1600	500
	Açude	1600	80
	Bebedouro	300	17
	Torneira	900	80
	Riacho	1600	280

*Na primavera o açude secou