

FINGERPRINTING POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS PARA IDENTIFICAÇÃO DE AGENTES CAUSADORES DA MASTITE BOVINA

**Juliana Regina Barreiro¹, Daniele Cristine Beuron¹, Julianne de Rezende Naves¹,
Juliano Leonel Gonçalves¹, Cristina Simões Cortinhas¹, Elmeson Ferreira de Jesus¹,
Christina Ramires Ferreira², Marcos Veiga dos Santos¹**

¹Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – VNP/USP – A. Duque de Caxias Norte, 225, 13635-900 – Pirassununga, SP, mveiga@usp.br.

²Laboratório ThoMSon de Espectrometria de Massas, Instituto de Química, Universidade de Campinas - UNICAMP Campinas, 13083-970, São Paulo,

RESUMO

A mastite é uma das principais doenças de vacas leiteiras em todo o mundo. O diagnóstico de rotina pode ser feito por meio de cultura microbiológica, cujo procedimento é demorado. A espectrometria de massas, utilizando matriz assistida por dessorção e ionização por tempo-de-vôo (MALDI-TOF MS) vem sendo usada para identificar e caracterizar microrganismos de forma rápida, utilizando protocolo de extração de amostra de fácil execução. Esta técnica permite a identificação de bactérias com alta confiabilidade e velocidade a partir de extrato bruto bacteriano ou bactérias lisadas. Com o uso de MALDI-TOF MS, 33 isolados bacterianos do leite obtidos de diferentes vacas leiteiras foram analisadas e os resultados foram comparados com aqueles obtidos pelo método microbiológico. A metodologia de MALDI-TOF MS apresentou confiabilidade para a identificação bacteriana de bactérias isoladas em 24 h de cultivo em casos de mastite subclínica, possibilitando emprego imediato de medidas de controle da mastite e controle da qualidade do leite na indústria de laticínios.

INTRODUÇÃO

A mastite (do grego *mastos*) bovina é uma doença de grande importância econômica. A maioria das mastites não apresenta sinais físicos de processo inflamatório agudo, sendo crônicas ou incipientes, no entanto, causam elevados prejuízos econômicos e servem de fonte de infecção. A resposta inflamatória ocorre em resposta à invasão bacteriana, fúngica, ou infecções por algas da glândula mamária (Radostits *et al.*, 2002).

O leite é uma mistura complexa, nutritiva e estável de gordura, proteínas e outros componentes, os quais se encontram suspensos ou solubilizados em água (Gianola *et al.*, 2004). Segundo Dingwell *et al.*, (2004), a qualidade do leite está diretamente relacionada à diversos fatores, como saúde, alimentação e manejo dos animais, com a qualidade da mão-de-obra, manejo adequado dos equipamentos e utensílios utilizados durante a ordenha e transporte até a indústria. Todos esses fatores influenciam a composição e as características sensoriais, certificando ou não a qualidade do produto.

O diagnóstico da mastite clínica pode ser feito por meio da sintomatologia, como inflamação do úbere, secreção láctea com grumos, sangue, pus, entre outras alterações visuais. Entretanto, para diagnosticar a mastite subclínica é necessária a utilização de exames complementares baseados no conteúdo celular ou alterações da composição do leite. Além disso, existe a necessidade da cultura microbiológica e isolamento dos agentes etiológicos envolvidos, visando o uso de métodos de tratamento e estratégias de controle e profilaxia adequados (Dias, 2007).

Segundo Radostits *et al.*, (2002), o diagnóstico clínico de mastite é simples, visto que qualquer vaca com úbere inflamado, difuso ou focalmente, ou dolorido em um ou mais quartos, mas secretando leite com sangue, pus, grumos apresenta mastite. Entretanto, mastites subclínicas crônicas, que podem reduzir a capacidade funcional da glândula mamária, causando prejuízos econômicos, não são diagnosticadas pelos métodos rotineiros de exame clínico: inspeção do animal, leite e palpação.

A técnica de espectrometria de massas com fonte de ionização do tipo dessorção e ionização por matriz assistida à laser – MALDI (do inglês *matrix assisted laser desorption/ionization*) tem sido utilizada de modo crescente em microbiologia clínica humana para a identificação de microrganismos devido à sua capacidade de analisar moléculas de massas elevadas, misturas complexas de biomoléculas, e ainda por apresentar alta sensibilidade mesmo em reduzida quantidade de amostra (Siuzdak, 2006). Essa técnica possui um tipo de ionização branda, que permite a dessorção de peptídeos e proteínas a partir de cultivos bacterianos ou extratos bacterianos (Ruelle *et al.*, 2004). Os íons são separados e detectados de acordo com a massa molecular e número de cargas. Cada pico de massa corresponde a um fragmento molecular desprendido da superfície celular durante a dessorção à laser (Holland *et al.*, 2006; Siuzdak, 2006).

A técnica de MALDI-MS possui alta sensibilidade a mudanças mínimas de composição química; de forma que a reprodutibilidade de espectros é um fator crítico na comparação de espectros bacterianos (Zhang *et al.*, 2004). Com a utilização desse método, pode-se identificar bactérias pela comparação do espectro de massas (obtido em poucos

segundos), com espectros referência de cepas por meio de análise estatística multivariada. Desta forma, tem-se um diagnóstico para o patógeno da mastite com mais rapidez do que os métodos convencionais.

MASTITE: CONCEITOS, MÉTODOS DIAGNÓSTICOS E PRINCIPAIS AGENTES

Mais de 80 diferentes espécies de microrganismos foram identificadas como agentes causadores de mastite bovina, sendo que as espécies mais frequentemente isoladas são *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium sp*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* e *Escherichia coli* (Holtenius, 2004). Santos *et al.*, (2004) relatou que a colonização da glândula mamária bovina por bactérias patogênicas resulta em eventos que conduzem a alterações na composição do leite, seguida pelo aumento marcante no número de células somáticas.

Santos & Fonseca (2007) afirmam que a mastite inicia-se quando os microrganismos invadem a glândula mamária atravessando o canal do teto e multiplicam-se no interior dos tecidos. A invasão microbiana pode ocorrer por diversas formas, como a colonização da pele e do canal do teto entre as ordenhas, flutuações de vácuo durante a ordenha que introduzem os microrganismos para dentro do teto e introdução de cânulas contaminadas no momento do tratamento intramamário. Após a invasão, ocorre intensa migração de leucócitos do sangue para o leite, com o objetivo de eliminar o agente patogênico, além de alterações da permeabilidade vascular e outros sinais de inflamação. Os autores também citam quatro fatores principais que envolvem a ocorrência da mastite, como a resistência da vaca, o agente patogênico, o ambiente e o estágio de lactação.

Um programa de controle da mastite tem como objetivos eliminar infecções existentes, monitorar a saúde da glândula mamária e minimizar a incidência de novas infecções (Dohoo & Leslie, 1991; Santos & Fonseca, 2007). Detectar a infecção intramamária é de grande importância para manter o padrão de qualidade do leite e a saúde do rebanho. Os principais métodos de diagnóstico da mastite são: condutividade elétrica (EC), contagem de células somáticas (CCS), Califórnia Mastitis Test (CMT), teste da caneca, Wisconsin Mastitis Test (WMT) e cultura microbiológica (Santos & Fonseca, 2007; Kamphuis *et al.*, 2008).

Medidas de controle da mastite incluem o uso do *pré-dipping* e *pós-dipping* (imersão dos tetos em solução desinfetante), terapia de vaca seca com antibiótico de longa duração, segregação e descarte de animais com mastite crônica e controle ambiental. O *pós-dipping* previne novas infecções intramamárias causadas por patógenos contagiosos, já a terapia de vaca seca visa eliminação de casos de mastite subclínica e prevenção de novos casos durante o período seco. Medidas como a redução da exposição do animal ao agente, o aumento da

resistência da vaca (por meio da dieta, vacinação e prevenção ao estresse) diminuem a incidência de mastite causada por patógenos ambientais (Sargeant *et al.*, 2001).

A mastite pode resultar na substituição de células epiteliais secretoras por tecido conjuntivo, ocasionando queda na produção de leite. Durante a infecção ocorre migração de células somáticas para o interior dos alvéolos, sendo que durante este processo pode ocorrer destruição de células epiteliais (Sommerhauser *et al.*, 2003).

O aumento da CCS é dos principais métodos de diagnóstico indireto da mastite subclínica, já que é um bom indicador da probabilidade de ocorrência de uma infecção intramamária. Quanto maior a CCS maior é a probabilidade de que a vaca esteja infectada. O leite de um quarto não infectado apresenta CCS < 100.000 cel/ml, enquanto a CCS de um quarto infectado é geralmente > 200.000 cel/ml, indicando a ocorrência de mastite subclínica ou que o quarto está se recuperando da infecção. O CMT é um dos testes mais conhecidos e práticos para o diagnóstico da mastite subclínica. Seu princípio baseia-se na estimativa da contagem de células somáticas no leite. O resultado do teste é avaliado em função do grau de gelatinização ou viscosidade da mistura de partes iguais de leite e reagente, sendo o teste realizado em bandeja apropriada e ao pé da vaca. Os resultados são expressos em cinco escores: negativo, traços, um, dois e três cruces, os quais apresentam boa correlação com a CCS (Esslemont & Kossaibati, 2002; Santos & Fonseca, 2007).

Segundo Berglund *et al.*, (2007) a infecção intramamária é a principal causa do aumento da CCS. Prestes *et al.*, (2002) mencionaram que microrganismos contagiosos (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus sp.* coagulase negativa, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Corynebacterium bovis*) levam ao aumento da CCS, por outro lado, os microrganismos ambientais (*Escherichia coli*, *Klebsiella sp.*, *Enterobacter sp.*, *Streptococcus uberis* e *Pseudomonas aeruginosa*) podem ou não alterar os valores da CCS devido às diferenças das respostas imunológicas e do agente etiológico envolvido na infecção intramamária.

A cultura bacteriológica do leite é considerado um teste qualitativo e para que um resultado seja positivo é preciso o isolamento de pelo menos um microrganismo viável, no entanto, qualquer contaminação externa pode gerar resultado falso-positivo ou erros na preparação das amostras e dos meios de cultura podem gerar resultados falso-negativos. Por ser considerado um teste caro e demorado como exame de rotina na fazenda; outros testes de diagnóstico da mastite devem ser empregados (Urech *et al.*, 1999).

O diagnóstico microbiológico e a identificação dos agentes infecciosos de amostras do leite de tanque é um método auxiliar no monitoramento das mastites contagiosas, entretanto, apresenta algumas limitações como o tempo necessário para o diagnóstico, a identificação dos

agentes e os procedimentos de conservação e transporte das amostras. O diagnóstico molecular, baseado na técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR), possibilita a identificação do agente sem a necessidade do mesmo estar viável na amostra (Santos, 2006).

A infecção por *S. aureus* apresenta geralmente caráter subclínico e resposta imune branda, condição que contribui para sua habilidade de estabelecer infecções intramamárias crônicas (Bannerman *et al.*, 2004). Além disso, o *S. aureus* possui grande capacidade de invasão, instalando-se em partes profundas da glândula mamária. A taxa de cura desse tipo de infecção durante a lactação tende a ser bastante reduzida. Tratamentos de maior duração foram associados a maiores chances de cura, porém é necessário avaliar o custo-benefício de tal tratamento. Visando maximizar a cura o tratamento durante a lactação deve ser realizado em animais jovens com infecção recente tendo apenas um quarto do úbere comprometido (Hensen *et al.*, 2000).

Os *Staphylococcus coagulase negativa* vivem na pele do teto e podem infectar a glândula mamária. As infecções causadas por este patógeno resultam em elevação moderada da CCS. Casos clínicos são comumente observados (Costa *et al.*, 1995) e tanto a taxa de cura espontânea quanto a resposta ao tratamento antibiótico ocorrem frequentemente. Vacas adultas e novilhas apresentam alta prevalência de mastite causada por esse tipo de agente após o parto, com rápido declínio dos casos após a segunda semana de lactação (Santos & Fonseca, 2007).

A principal fonte de eliminação dos *Streptococcus agalactiae* e *Staphylococcus aureus*, dentro do rebanho, é a própria glândula mamária infectada. Porém, os microrganismos ambientais, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae* e coliformes; quando isolados de amostras de leite, do tanque especialmente, podem ser oriundos de outras fontes externas e não específicas do leite (Brito *et al.*, 1998).

A infecção por *S. agalactiae* frequentemente se apresenta na forma subclínica com acentuado aumento da contagem de células somáticas. Entretanto, a infecção causada por essa bactéria apresenta boa resposta ao tratamento antibiótico intramamário durante a lactação. Vacas infectadas por *S. agalactiae* apresentaram maior taxa de cura durante a lactação, quando comparadas com outros tipos de patógeno (Wilson *et al.*, 1999). Vacas com mastite por esse patógeno tornam-se reservatórios da bactéria no rebanho e a ordenha é considerada o momento de maior transmissão da bactéria. Essa espécie bacteriana reside somente no úbere de vacas infectadas e elimina elevado número de bactérias no leite, podendo influenciar a contagem bacteriana total (CBT) do leite do tanque. Devido ao limitado habitat do *S. agalactiae* e a maior taxa de cura seguida de tratamento, algumas fazendas optam por erradicar o patógeno do rebanho. O programa de controle de *S. agalactiae* é baseado em

cultura microbiológica e tratamento antibiótico de todos os quartos do úbere infectados pelo patógeno. Vacas não responsivas a segunda fase de tratamento devem ser separadas do rebanho ou descartadas (Santos & Fonseca, 2007).

Infecções causadas por *Streptococcus* ambientais têm natureza variada devido a distintas características de dois constituintes desse grupo, *S. uberis* e *S. dysgalactiae*. Diferentes linhagens de *S. uberis* apresentam não somente padrão epidemiológico ambiental como também padrão contagioso. O *S. dysgalactiae* também mostra padrões alternados e o aumento de sua prevalência nos rebanhos leva à necessidade de mais trabalhos sobre essa espécie bacteriana (Santos & Fonseca, 2007). Na rotina de isolamento microbiológico, os *Enterococcus* spp. são muitas vezes classificados como parte do grupo dos *Streptococcus* ambientais (ou não *agalactiae*). As bactérias do gênero *Enterococcus* spp. são mais resistentes aos antimicrobianos e sobrevivem em ambientes pouco favoráveis, o que pode afetar a prevalência e a taxa de cura dos estreptococos (Santos *et al.*, 2007).

Casos de mastite causada por bactérias Gram negativas envolvem principalmente *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp. Os casos clínicos desse grupo de bactérias, em geral, apresentam-se de forma aguda. A destruição da bactéria pelo sistema imune causa a exposição de fatores estimulantes da inflamação que desencadeiam os típicos sinais clínicos da infecção (Bannerman *et al.*, 2004). A quantidade de estímulo ao sistema imune determina a severidade da infecção, e em cerca de 40% dos casos severos o animal pode apresentar bacteremia (Wenz *et al.*, 2001).

Outra bactéria causadora da mastite frequentemente isolado de casos clínicos é *Corynebacterium* sp. (Costa *et al.*, 1995). O canal do teto parece ser um dos principais locais de ocorrência desse agente, ainda que a infecção possa se localizar na cisterna da glândula. Com relação à patogenicidade, o *Corynebacterium* spp. é considerado um patógeno de significância limitada, apresentando-se na forma de casos subclínicos e leves, mas é altamente contagioso, fato que aumenta sua frequência de isolamento nas mastites. O *Arcanobacterium pyogenes* é conhecido por causar mastites severas com extensa destruição do tecido mamário. Esse microrganismo é encontrado nas membranas mucosas dos animais, mas age como patógeno oportunista causando infecções piogênicas. Nas mastites, o *Arcanobacterium pyogenes* apresenta baixa resposta ao tratamento de antibióticos (Santos & Fonseca, 2007).

ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A espectrometria de massas (MS) é uma técnica analítica que permite a identificação da composição química de um determinado composto isolado, ou de diferentes compostos em misturas complexas, por meio da determinação de suas massas moleculares na forma iônica,

(ou seja, com carga elétrica líquida, positiva ou negativa), baseada na sua movimentação através de um campo elétrico ou magnético. Esta movimentação é determinada pela razão entre a massa de um determinado composto (analito) e sua carga líquida, designada por m/z (*mass-to-charge ratio*). Assim, conhecendo o valor de m/z de uma molécula é possível inferir sobre a composição química elementar, e com isso determinar sua estrutura. A espectrometria de massas pode ser utilizada em análises quantitativas, mas é em análises qualitativas que ela tem se destacado, como na identificação de compostos em misturas e, principalmente, na caracterização estrutural de compostos desconhecidos, que pode ser alcançado através da formação de íons-molécula e de seus respectivos íons-fragmentos (Souza, 2008).

Devido a sua elevada sensibilidade, exatidão e resolução proporcionadas por essa técnica na identificação das massas das proteínas, ela pode ser considerada a principal ferramenta analítica no campo da proteômica. Métodos tradicionais exigem grande número de amostras biológicas e diversas etapas de purificação de proteínas são exigidas para sua análise. O uso da MS proporcionou o desenvolvimento de métodos rápidos e eficientes de separação (Fernandez-Lima *et al.*, 2005).

Um espectrômetro de massas é composto por três módulos principais: fonte de íons, analisadores de massas e os detectores (Figura 1). Fontes de íons é parte do espectrômetro responsável pelo processo de ionização das moléculas, ou seja, transformação de moléculas neutras em íons; os analisadores de massas são parte do espectrômetro responsável pela separação dos íons de acordo com seu m/z , realizado através de aplicações de campos elétricos e magnéticos; e os detectores representando a parte final de um espectrômetro de massas, responsável pela detecção e amplificação dos íons.

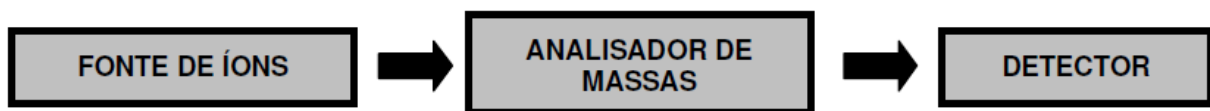


Figura 1: Representação esquemática de um espectrômetro de massas.

A ionização é o processo físico/químico de conversão de um átomo ou molécula em um íon, adicionando ou removendo partículas carregadas, como elétrons ou outros íons. Este processo funciona de maneira diferente dependendo se um íon positivo ou negativo está sendo

produzido. Um íon de carga positiva é produzido quando um elétron ligado a um átomo (ou molécula) absorve energia suficiente para escapar da barreira elétrica que o limitava, desfazendo assim o vínculo com o núcleo, sendo expelido para fora da eletrosfera. A quantidade de energia necessária é chamada de potencial de ionização. Um íon negativamente carregado é produzido quando um elétron livre choca com um átomo e é então capturado, ficando no interior da barreira do potencial elétrico. Em alguns casos, um próton pode ser adicionado ou subtraído da molécula, rendendo os íons $[M^+H]^+$ ou $[MH]^-$, respectivamente. Em outros casos, os íons são formados através da interação com adutores, como metais alcalinos (por exemplo, Li^+ , Na^+ , K^+), formando íons positivos, ou então com anions como Cl^- , rendendo íons com cargas negativas (Dass, 2007; Hoffmann & Stroobant, 2007).

Tendo em vista que os processos de ionização são fundamentais para a espectrometria de massas, diversas fontes de ionização foram desenvolvidas ao longo da sua história, como Ionização Eletrônica (EI), Ionização Química (CI), Ionização por Bombardeamento Rápido de Átomos (FAB), Ionização por Dessorção a Laser Assistida por Matriz (MALDI), Ionização por Spray de Elétrons (ESI), Ionização Química a Pressão Atmosférica (APCI), Ionização por Dessorção de Spray de Elétrons (DESI), entre outras técnicas de ionização.

Segundo Watson & Sparkman (2007) a fonte de ionização é a parte do espectrômetro de massas que produz os íons a partir dos analitos, e realiza sua transferência para a fase gasosa (nos casos onde a ionização não precisa ocorrer direto em amostra voláteis). Estes íons são então levados para dentro do espectrômetro, sob um ambiente de vácuo, e então conduzidos até o detector. A base da espectrometria de massas é a separação destes íons por suas diferenças de m/z . Para atender esta necessidade, foram desenvolvidas diferentes formas para controlar a trajetória desses íons através do espectrômetro, as quais são realizadas por campos elétricos e magnéticos, chamados de analisadores de massas (na realidade são analisadores de íons, ou m/z), e são quase tão diversificados quanto às fontes de íons. Sendo os mais conhecidos os analisadores Quadrupolares (Q – Quadrupole), Armadilha de Íons (IT – Íon Trap, ou QIT – Quadrupole Íon Trap), Tempo-de-Vôo (TOF – Time-of-Flight), Analisadores com Transformada de Fourier (FT – Fourier Transform), Analisadores de Mobilidade de Íons (IM – Íon Mobility), etc.

Os detectores compreendem a porção final dos espectrômetros de massas, sua função é detectar os íons que chegam até eles e amplificar o sinal. Os detectores funcionam pela conversão dos feixes de íons em sinais elétricos, que podem ser armazenados e traduzidos em imagens, entre eles se destacam os detectores Faraday crup, Multiplicadores de Elétrons (EM – Electron Multiplier), Multiplicadores de Fótons, entre outros (Watson & Sparkman, 2007).

A técnica de MS com fonte de ionização do tipo MALDI tem sido amplamente utilizada para a caracterização de microrganismos devido à sua capacidade de analisar moléculas de massas elevadas, misturas complexas de biomoléculas, e ainda por apresentar alta sensibilidade mesmo em reduzida quantidade de amostra (Siuzdak, 2006). Essa técnica possui um tipo de ionização branda, que permite a dessorção de peptídeos e proteínas a partir de cultivos bacterianos ou extratos bacterianos (Ruelle *et al.*, 2004). Os íons são separados e detectados de acordo com sua massa molecular e número de cargas. Cada pico de massa corresponde a um fragmento molecular desprendido da superfície celular durante a dessorção à laser (Holland *et al.*, 2006; Siuzdak, 2006). Utilizando esse método, pode-se identificar bactérias por meio da comparação do espectro de massas (obtido em poucos segundos) com espectros referência de cepas por meio de análise estatística multivariada.

Na ionização por MALDI, a amostra deve ser misturada a uma matriz específica que auxiliará na sua ionização. A amostra é misturada a uma determinada matriz que quando seca, cristaliza-se juntamente com o analito. A transferência de energia por MALDI ocorre por meio da irradiação pulsada de laser, a matriz energizada converte a energia do laser em energia para a excitação do analito, promovendo sua ionização (Figura 2). Esta forma de transferência de energia é eficiente na obtenção de moléculas intactas, já que elas não sofrem incidência direta da excessiva energia do laser, o que poderia causar sua decomposição. Este processo ocorre em uma câmara sob vácuo e os íons então formados na fase gasosa são acelerados por campos eletrostáticos em direção ao analisador (Ardrey, 2003; Hoffmann & Stroobant, 2007; Dass, 2007).

Existe uma grande variedade de matrizes que podem ser utilizadas em MALDI, constituídas principalmente de compostos aromáticos. As fontes de laser também podem variar, no entanto a mais comum é a de N₂, com comprimento de onda de 337 nm. Os íons formados apresentam-se de modo geral protonados monocarregados em modo positivo, desprotonados em negativo. Contudo, é comum de serem formados íons com duas ou mais cargas, ou com adutores como Na⁺ ou K⁺ (Hoffmann & Stroobant, 2007; Dass, 2007).

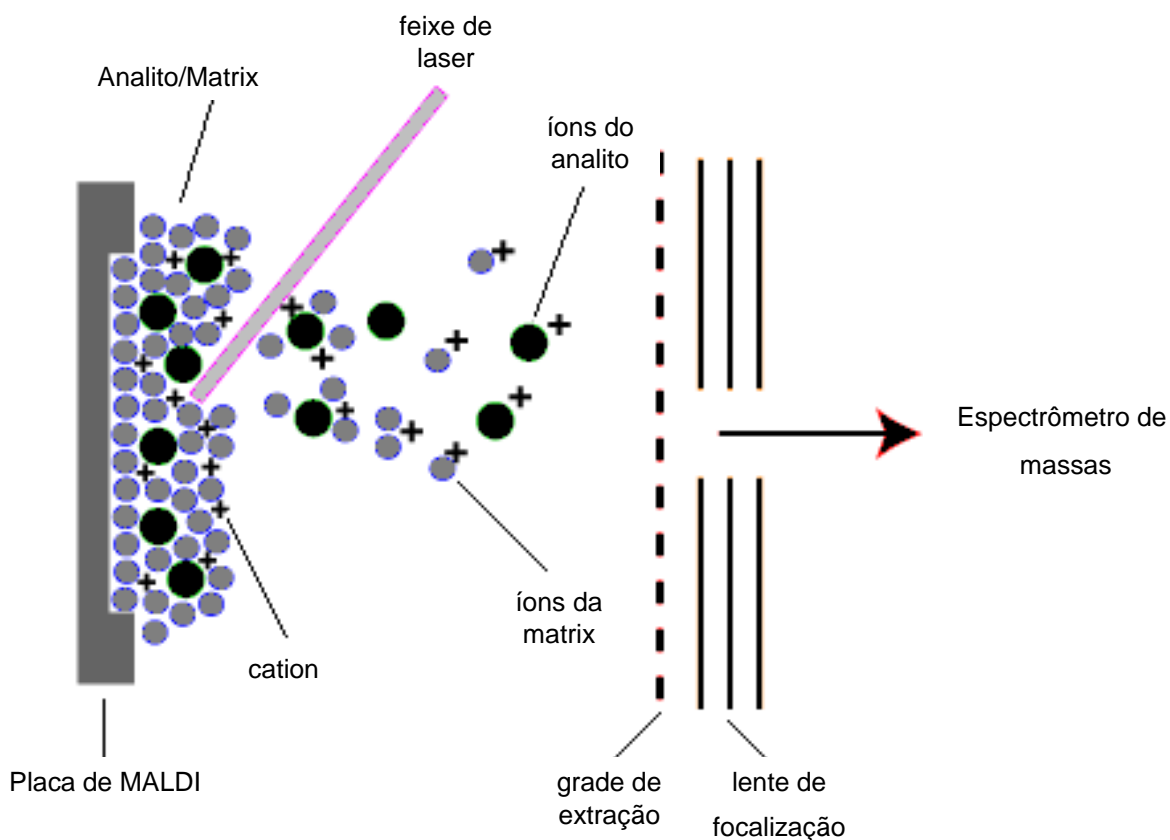


Figura 2 – Ionização por fonte de MALDI.

Fonte: Adaptado de <http://www.chm.bris.ac.uk/ms/images/maldi-mechanism.gif>

Analísadores de tempo-de-vô são baseados no princípio de que os íons com a mesma carga têm energias cinéticas iguais, e velocidade inversamente proporcional à raiz quadrada da sua massa. Então se dois íons com mesma carga, mas com massas diferentes, são acelerados através de um campo elétrico com potencial constante, suas velocidades serão dependentes de suas massas, e eles atingirão o detector com “tempos de vô” diferentes. Assim, o íon de menor valor de m/z (menor massa neste caso) atingirá o detector primeiro, enquanto que o de maior massa levará mais tempo para chegar ao detector (Hoffmann & Stroobant, 2007; Dass, 2007).

O potencial de aplicação da MS para estudos biológicos tem sido bastante estendido devido aos avanços observados nos últimos anos em aplicações nas áreas de genômica, transcriptoma, metabolômica, proteômica, lipidoma e outras plataformas “omics”, e ao desenvolvimento extraordinário dos equipamentos (Hoffmann *et al.*, 2007; Feng *et al.*, 2008). A MS é atualmente a técnica de escolha para identificação de proteínas e para o estudo de modificações protéicas pós-traducionais em diferentes condições fisiológicas. Além disso, a MS vem sendo utilizada no monitoramento e caracterização de diversos processos industriais

como, por exemplo, em processos fermentativos (Royce, 1993) e até mesmo na análise de microorganismos intactos (Claydon *et al.*, 1996; Fenselau & Demirev, 2001).

A discriminação e caracterização de micobactérias foi relatada por MALDI-TOF MS (Hettick *et al.*, 2006). A técnica foi usada também para quimiotaxonomia bacteriana (Claydon *et al.*, 1996; Smole *et al.*, 2002; Ruelle *et al.*, 2004).

A espectrometria de massas também é utilizada na determinação de razões isotópicas. Por exemplo, a análise de uma amostra de NaCl. Em solução os íons Na⁺ e Cl⁻ estarão dissociados, e quando analisados em modo de detecção de íons positivos, será obtido apenas um íon de m/z 23 referente ao Na⁺. Entretanto, quando analisamos esta mesma solução em modo de detecção de íons negativos veremos o aparecimento de dois íons, um de m/z 35 sendo este o íon base (aquele aparece representando 100%) e outro de m/z 37, que deverá representar cerca de 1/3 do íon base. Estes resultados devem-se à relação isotópica apresentada pelos íons analisados (Souza, 2008).

ESPECTROMETRIA DE MASSAS APLICADA À MICROBIOLOGIA

Métodos tradicionais microbiológicos com base na morfologia e as características bioquímicas são demorados, propenso a erros e laboriosos. Portanto, é necessário o desenvolvimento de novos métodos rápidos e eficazes para identificação das espécies bacterianas. A espectrometria de massa é uma poderosa ferramenta de rotina em estudos biológicos e apresenta-se como alternativa aos métodos tradicionais, em especial para identificação bacteriana e de diferenciação. Iliina *et al.*, (2009) utilizaram a espectrometria de massas para identificação de espécies de *Neisseria*, confirmando a utilizada da técnica.

Vários métodos manuais e automatizados baseados nas características fenotípicas têm sido desenvolvidos para a identificação de estafilococos. No entanto, estes sistemas têm suas limitações, principalmente em razão de diferenças fenotípicas entre estirpes da mesma espécie. Ao longo dos últimos 10 anos, muitos métodos genotípicos com base na análise de determinados alvos de DNA foram concebidos para a identificação em nível de espécie mais comum de *Staphylococcus* Coagulase Negativa em isolados. Dubois *et al.*, (2010) utilizaram a matriz assistida por dessorção e ionização por tempo de voo (MALDI-TOF MS), usando "impressões digitais", para a identificação de 152 cepas de *Staphylococcus* de origem clínica e ambiental, também avaliaram a capacidade do sistema Biotyper MALDI (Bruker Daltonique, Wissembourg, França), concluindo que este método é uma excelente alternativa aos métodos tradicionais e pode ser utilizado para a análise das relações clonais e/ou taxonômica.

Carbonelle *et al.*, (2007) descreveram a aplicação do MALDI-TOF-MS para a identificação de *Staphylococcus* coagulase-negativa que acometem humanos. Vinte e três cepas de referência de espécies clinicamente relevantes ou subespécie foram selecionadas, para cada cepa de referência, o perfil de MALDI-TOF-MS foi analisado e comparado com o perfil de 196 cepas testadas. Em todos os casos o conjunto de picos de referência pertencentes a mesma espécie que o da estirpe testada, demonstrando assim que os 23 conjuntos de picos selecionados podem ser utilizados como um banco de dados para a identificação rápida de espécies de *Staphylococcus coagulase-negativo*. Resultados semelhantes foram obtidos por meio de quatro diferentes condições de crescimento.

Nove cepas de bactérias anaeróbicas foram caracterizadas por MALDI-TOF e aplicou-se o método para identificação com sucesso dessas bactérias em amostra de 75 pacientes que apresentaram infecção periodontal. Os autores sugeriram que a técnica de MALDI-TOF MS possa se tornar um método útil para a identificação de bactérias anaeróbicas, especialmente aquelas que não podem ser prontamente identificadas por análise bioquímica. Essa técnica pode se tornar um sistema atrativo até mesmo para a identificação de rotina de amostras clínicas (Stingu *et al.*, 2008).

Streptococcus viridans (VS) são responsáveis por várias doenças sistêmicas, como endocardite, abscessos e septicemia. Porém, a identificação das espécies pelos métodos convencionais, parece ser mais difícil do que identificação de espécies de outros grupos de bactérias. Friedrichs *et al.*, (2007) avaliou o uso de MALDI-TOF para a rápida identificação de 10 espécies diferentes de VS. Um total de 99 isolados clínicos, 10 cepas de referência e 20 estirpes foram analisados. Para avaliar a espectrometria de massa todas as cepas foram identificadas em paralelo por métodos fenotípicos e genotípicos. A comparação dos resultados de identificação das espécies obtidas pelas análises MALDI-TOF MS com os sistemas de identificação fenotípica/genotípica mostrou 100% de consistência em nível de espécie.

Ilina *et al.*, (2010) usaram a técnica de MALDI-TOF MS para identificação de bactérias *Helicobacter pylori*, sendo 17 espécies clínicas e 2 laboratoriais. Apesar da heterogeneidade protéica evidente de *H. Pylori*, espectros de massas coletadas sob várias formas de cultivos foram altamente reprodutíveis. Além disso, todas as amostras clínicas foram identificadas como espécie *H. pylori* por meio de análise comparativa. Teramoto *et al.*, (2007) através da espectrometria de massas utilizando o MALDI obtiveram resultados confiáveis na identificação da *Pseudomonas putida*, afirmando que a classificação pelo método proposto foi semelhante aos resultados do sequenciamento de DNA .

Barreiro *et al.*, (2010) utilizaram o método de MALDI-TOF – MS para identificar 33 bactérias isoladas de amostras de leite de diferentes fazendas leiteiras, as quais foram previamente identificadas pelo protocolo de exame microbiológico de rotina (Figura 3) como *Staphylococcus aureus* (n = 13), *Streptococcus agalactiae* (n = 10) e *Staphylococcus coagulase negativo* (n = 10). Para todas as amostras de *Streptococcus agalactiae*, resultados similares foram observados para a identificação microbiológica e MALDI-TOF MS. Em relação ao *Staphylococcus aureus*, de 13 isolados, 11 apresentaram resultados de mesma identificação (Tabela 1). A partir destes dados, é possível afirmar que MALDI-TOF MS (com base em perfis de proteínas conservadas) (Figura 4), é capaz de identificação de distintas espécies dentro do mesmo gênero bacteriano. O banco de dados Biotyper MALDI (Bruker Daltonik, Alemanha) contém uma coleção ou seqüência de estirpes bacterianas, e tem sido otimizado para uma melhor identificação (Lartigue *et al.*, 2009). Um isolado de *Staphylococcus aureus* foi identificado por MALDI-TOF como *Staphylococcus haemolyticus*, este resultado foi confirmado pelo seqüenciamento de 16S rRNA. A informação obtida por MALDI-TOF MS foi de que a cultura mista de bactérias pode ser identificada, MALDI-TOF indicaram uma impressão digital com íons indicativo de uma cultura mista (Barreiro *et al.*, 2010).

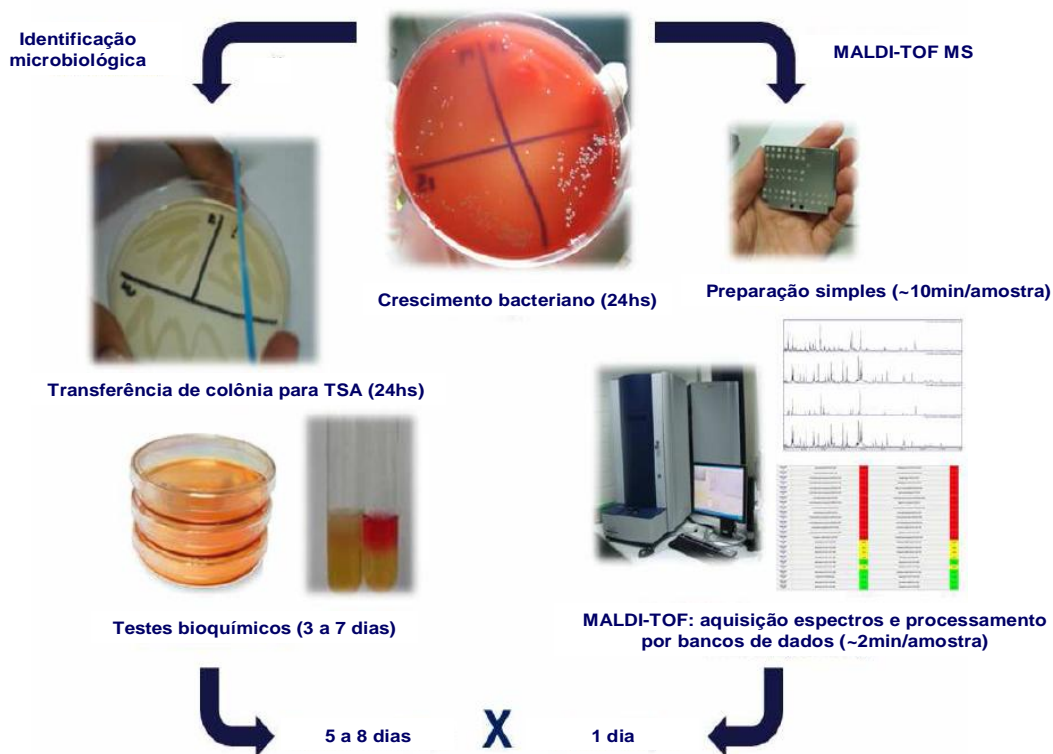


Figura 3: Esquema identificação microbiológica e MALDI-TOF MS.

Tabela 1: Cepas bacterianas isoladas de diferentes amostras de leite de vacas com mastite sub-clínica identificada por exame microbiológico padrão e por ‘fingerprint’ MALDI-TOF MS.

| Nº Amostras | Identificação Microbiológica | MALDI-TOF MS |
|-------------|--|------------------------------------|
| 11 | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| 1 | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Staphylococcus haemolyticus</i> |
| 1 | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Enterococcus faecalis</i> |
| 10 | <i>Streptococcus agalactiae</i> | <i>Streptococcus agalactiae</i> |
| 1 | <i>Staphylococcus coagulase negative</i> | <i>Staphylococcus simulans</i> |
| 2 | <i>Staphylococcus coagulase negative</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| 5 | <i>Staphylococcus coagulase negative</i> | <i>Staphylococcus epidermidis</i> |
| 1 | <i>Staphylococcus coagulase negative</i> | <i>Staphylococcus chromogenes</i> |
| 1 | <i>Staphylococcus coagulase negative</i> | <i>Staphylococcus haemolyticus</i> |

Fonte: Barreiro *et al.*, (2010).

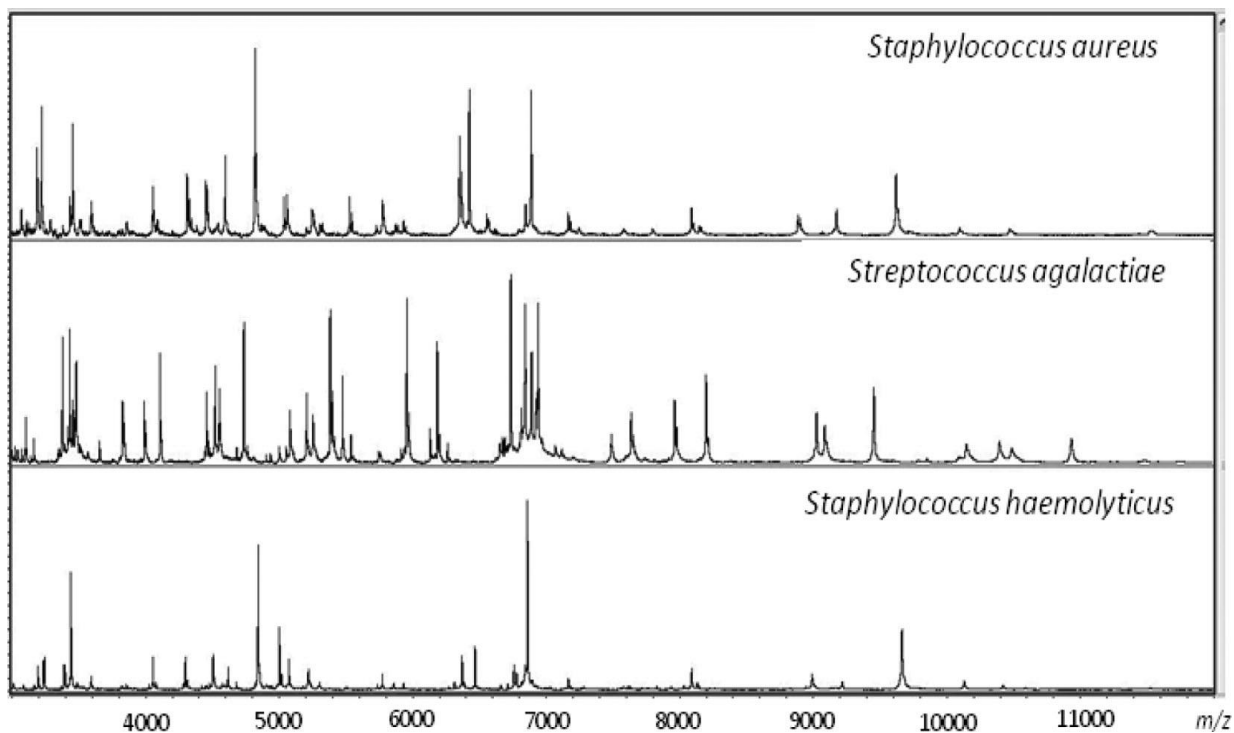


Figura 4: Identificação de microrganismos através da dessorção/ionização por matriz assistida a laser por tempo de voo em espectrometria de massas de três isolados (MALDI- TOF MS). Nota-se as características dos perfis da proteína obtidos por *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus haemolyticus*.

Fonte: Barreiro *et al.*, (2010).

Staphylococcus coagulase negativa são representados por um grande número de espécies de bactérias, que normalmente são agentes causadores de mastite. Rotineiramente, as espécies não são determinadas pelo exame microbiológico, mas essa identificação mais detalhada é facilmente possível por MALDI-TOF MS (Figura 5) (Barreiro *et al.*, 2010). A presença de *S. aureus* no grupo *Staphylococcus coagulase negativo* não era esperado. Em estudos de caracterização molecular (PCR por espaçador intergênico tRNA), de 26 *S. chromogens* (a *Staphylococcus coagulase negativo*) isoladas de mastite subclínica de 44 isolados de rebanhos leiteiros na Bélgica, identificou-se uma estirpe de *S. aureus*, que não mostrou nenhuma reação de coagulase positiva e pode ser detectada somente por meio da caracterização molecular (Catry, 2003).

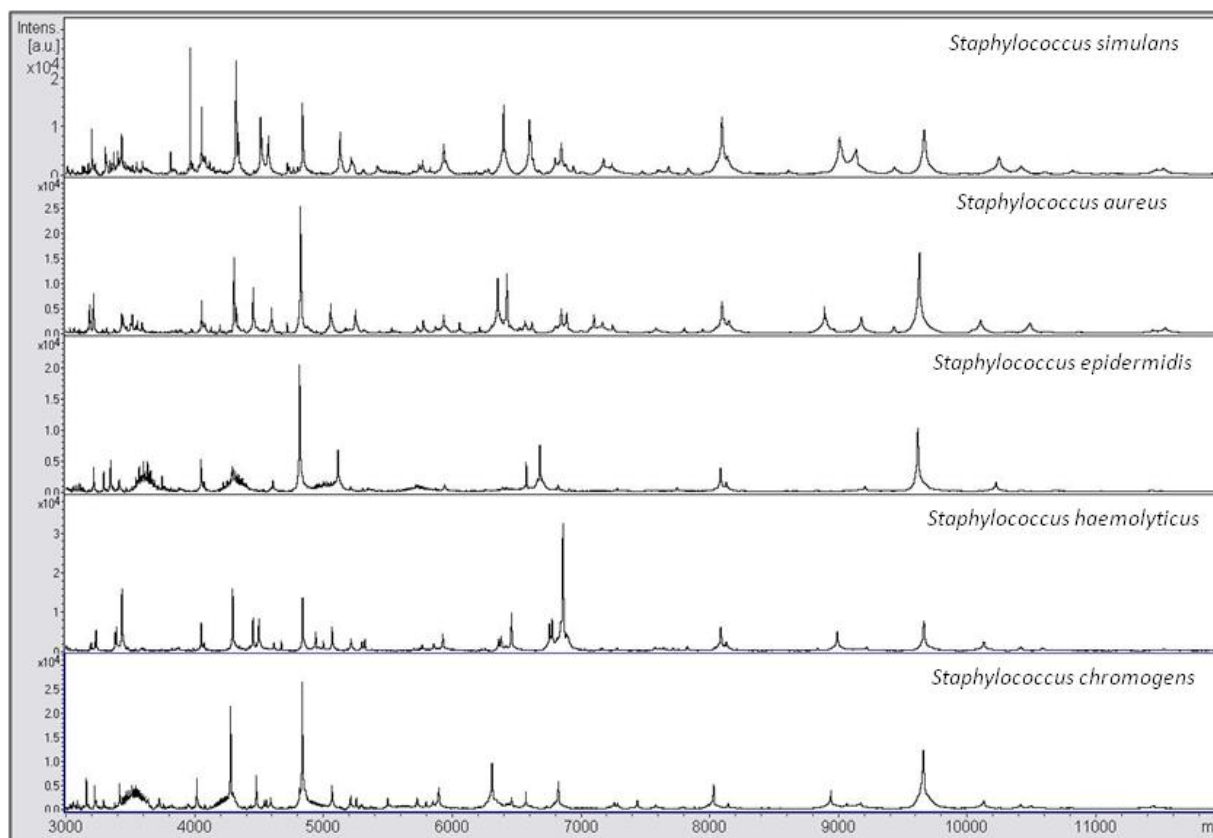


Figura 5: MALDI-TOF MS espectros de *S.coagulase negativos* isolados (de acordo com a Tabela 1). MALDI-TOF MS permite a identificação das espécies de isolados de *S. coagulase negativo*. Fonte: Barreiro *et al.*, (2010).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso de MALDI-TOF MS possibilita detecção rápida de microrganismos causadores de mastite e, portanto, pode auxiliar na escolha de medidas de controle e tratamento mais adequado para a mastite subclínica e clínica. Na indústria de laticínios, MALDI-TOF MS também pode fornecer uma identificação mais rápida, mais barata e confiável de microrganismos presentes no leite para um controle de qualidade microbiológico mais abrangente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

ARDREY, R. E., **Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction**. John Wiley & Sons, Chichester, UK, 2003.

BANNERMAN, D.D.; PAAPE, M.J.; LEE, J.W.; ZHAO, X.; HOPE, J.C.; RAINARD, P. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* elicit differential innate immune responses following intramammary infection. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 11, p. 463-47, 2004.

BARREIRO, J.R., FERREIRA, C.R., KOSTRZEWA, M., MAIER, T., WEGEMANN, B., BÖETTCHER, V., EBERLIN, M.N., SANTOS, M.V. Rapid and Comprehensive Identification of Subclinical Cow Mastitis Pathogens in Milk by MALDI-TOF Mass Spectrometry. **Journal of Dairy Science** (Submetido Julho 2010- Aceito Agosto 2010).

BERGLUND, I.; PETTERSSON, G.; OSTENSSON, K.; SVENNERSTEN-SJAUNJA, K. Quarter Milking for improved detection of increase SCC. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, n. 4, p. 427-432, 2007.

BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; SOUZA, H. M.; VARGAS, O. L. Avaliação da sensibilidade da cultura de leite do tanque para isolamento de agentes contagiosos da mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 18, n. 1, p. 39-44, 1998.

CARBONNELLE, E. ; BERETTI, J. ; COTTYN, S. ; QUESNE, G. ; BERCHE, P. ; NASSIF, X. ; FERRONI, A. Rapid Identification of Staphylococci Isolated in Clinical Microbiology Laboratories by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**. v.45, n.7, p. 2156–2161, 2007.

CLAYDON M.; DAVEY S.; EDWARD-JONES V.; GORDON D. The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. **Nature Biotechnology**, v.14, p.1584–1586, 1996.

COSTA E. O.; MELVILLE, P. A.; RIBEIRO, A. R.; VIANI, F. C.; MASCOLLI, R.; OLIVEIRA, P. J. Mastite bovina: CMT *versus* microbiológico. **Hora Veterinária**, v.15, n. 89, p. 53-54, 1996.

COSTA, E. O.; BENITES, N.R.; MELVILLE, P.A.; PARDO, R. B.; RIBEIRO, A. R.; WATANABE, E.T. Estudo etiológico da mastite clínica bovina. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 17, p. 156-158, 1995.

DASS, C., **Fundamentals of contemporary mass spectrometry**. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, 2007.

DIAS, R. V. C. Principais Métodos de Diagnóstico e Controle da Mastite Bovina. **Acta Veterinaria Brasílica**, v.1, n.1, p.23-27, 2007.

DINGWELL R.T., LESLIE K.E., SCHUKKEN Y.H., SARGEANT J.M., TIMMS L.L., DUFFIELD T.F., KEEFE G.P., KELTON D.F., LISSEMORE K.D. e CONKLIN J. Association of cow and quarter-level factors at drying-off with new intramammary infections during the dry period. **Prev. Vet. Med.** 63:75-89, 2004.

DOHOO, I. R.; LESLIE, K. E. Evaluation of changes in somatic cell counts as indicators of new intramammary infections. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 10, n. 3, p. 225-237, 1991.

DUBOIS, D.; LEYSSENE, D.; CHACORNAC, J. P.; KOSTRZEWA, M.; SCHMIT, P. O.; TALON, R.; BONNET, R.; DELMAS, J. Identification of a variety of *Staphylococcus* species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry . **J. Clin. Microbiol.** 48:941–945, 2010.

ESSLEMONT D. & KOSSAIBATI M. Mastitis: how to get out of the dark ages. **Vet. J.** 164:85-86, 2002.

FERNANDEZ-LIMA, F.A.; PONCIANO,C.R. ; PEDRERO, E. ; DA SILVEIRA, E.F. Acoplamento das espectrometrias de mobilidade iônica e de massa MALDI-TOF. **Revista Brasileira de Aplicações de Vácuo**, v. 24, n. 2, p. 74-80, 2005.

FENG, X.; LIU, X.; LUO, Q.; LIU, B.F. Mass spectrometry in systems biology: an overview. **Mass Spectrometry Reviews**. v. 27, n. 6, p. 635-60, 2008.

FENSELAU, C.; DEMIREV, P.A. Characterization of intact microorganism by MALDI mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**,v. 20, n. 4, p. 157-171, 2001.

GIANOLA, D., HERINGSTAD, B., KLEMETSDAL, G., CHANG, Y. M. Longitudinal analysis of clinical mastitis at different stages of lactation in Norwegian cattle. **Livest. Prod. Sci.** 88:251-261,2004.

FRIEDRICH, C.; RODLOFF, A. C.; CHHATWAL, G. S.; SCHELLENBERGER, W.; ESCHRIC, K. Rapid Identification of Viridans Streptococci by Mass Spectrometric Discrimination. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 8, p. 2392–2397, 2007.

HENSEN, S.M; PAVICIC, M.J.; LOHUIS, J.A.; DE HOOG, J.A.; POUTREL, B. Location of *Staphylococcus aureus* within the experimentally infected bovine udder and the expression of capsular polysaccharide type 5 in situ. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 83, p. 1966-1975, 2000.

HETTICK, J.M.; KASHON, M.L.; SLAVEN, J.E.; MA, Y.; SIMPSON, J.P.; SIEGEL, P.D.; MAZUREK, G.N.; WEISSMAN, D.N. Discrimination of intact mycobacteria at the strain level: a combined MALDI-TOF MS and biostatistical analysis. **Proteomics**, v.6, p.6416–6425, 2006.

HIRSH, D.C.; ZEE, Y.C. **Microbiologia Veterinária**, Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 446p 2003.

HOFFMANN, E.; STROOTBART, V. **Mass Spectrometry – Principles and Applications**. 3rd Edition, Wiley-Interscience, 2007.

HOLLAND, R.D., WILKES, J.G., RAFII, F., SUTHERLAND, J.B., PERSONS, C.C., VOORHEES, K.J., LAY, J.O. JR. Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrixassisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v.10, p.1227– 1232, 2006.

HOLTENIUS K.; PERSSON WALLER K.; ESSEN-GUSTAVSSON B.; HOLTENIUS P.; HALLEN SANDGREN C. Metabolic parameters and blood leukocyte profiles in cows from herds with high or low mastitis incidence. **Vet. J.** 168:65-73, 2004.

ILINA, E. N.; BOROVSOKAYA, A. D.; MALAKHOVA, M. M.; VERESHCHAGIN, V. A.; KUBANOVA, A. A.; KRUGLOV, A. N.; SVISTUNOVA, T. S.; GAZARIAN, A. O.; MAIER, T.; KOSTRZEWA, M.; GOVORUN, V. M.. Direct bacterial profiling by matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry for identification of pathogenic Neisseria. **J. Mol. Diagn.** 11:75–86, 2009.

ILINA, E. N.; BOROVSOKAYA, A. D.; SEREBRYAKOVA, M. V.; CHELYSHEVA, V. V.; MOMYNALIEV, K. T. M.; MAIER, T.; KOSTRZEWA, M.; GOVORUN, V. M. Application of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for the study of *Helicobacter pylori*. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**; v. 24, p. 328–334, 2010.

KAMPHUIS, C.; SHERLOCK, R.; JAGO, J.; MEIN, G.; HOGEVEEN, H. Automatic detection of clinical mastitis is improved by In-line monitoring of somatic cell count. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 12, p. 4560-4570, 2008.

MELLMANN, A., CLOUD, J.; MAIER, T.; KECKEVOET, U.; RAMMINGER, I.; IWEN, P.; DUNN, J.; HALL, G.; WILSON, D.; LASALA, P.; KOSTRZEWA, M.; HARMSEN, D. Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry in comparison to 16SrRNA gene sequencing for species identification of non fermenting bacteria. **J. Clin. Microbiol.** 46:1946–1954, 2008.

PEELER E.J.; GREEN M.J.; FITZPATRICK J.L.; GREEN L.E. The association between quarter somatic-cell counts and clinical mastitis in three British dairy herds. **Prev. Vet. Med.** 59:169-180, 2003.

PRESTES, D. S.; FILAPPI, A.; CECIM, M. Susceptibilidade à Mastite: Fatores que Influenciam - uma Revisão. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, v. 9, n. 1, p. 118-132, 2002.

RADOSTITS, O. M.; BLOOD D.C.; GAY, C.C.. Um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. **Clínica Veterinária**, 1737 p. 2002.

RUELLE, V.; EL MOUALIJ, B.; ZORZI, W.; LEDENT, P.; DE PAUW, E. Rapid identification of environmental bacterial strains by matrixassisted laser desorption/ionization time-offlight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v.18: p. 2013–2019, 2004.

ROYCE, P.N. A discussion of recent developments in fermentation monitoring and control from a practical perspective. **Critical Reviews in Biotechnology**. v. 13, p. 117-149, 1993.

SANTOS, C. D. M. **Staphylococcus sp e Enterobactérias isoladas de mastite recorrente em oito rebanhos da região de Uberlândia-MG: perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos**. Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária - UFU, 2006.

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

SANTOS, J. E. P., Cerri RL, Ballou MA, Higginbotham GE, Kirk JH. Effect of timing of first clinical mastitis occurrence on lactational and reproductive performance of Holstein dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 80, p. 31-45. 2004.

SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. **Principais agentes causadores da mastite. Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite**. Barueri: Manole, 1. ed., cap. 3, p. 24-37, 2007.

SARGEANT, J. M.; LESLIE, K. E.; SHIRLEY, J. E.; PULKRABEK, B. J.; LIM, G. H. Sensitivity and specificity of somatic cell count and California Mastitis Test for identifying intramammary infection in early lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 9, p. 2018-2024, 2001.

SCHEPERS, A. J.; LAM, T.; SCHUKKEN, Y. H.; WILMINK, J. B. M. E.; HANEKAMP, W. J. A. Estimation of variance components for somatic cell counts to determine thresholds for uninfected quarters. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 8, p. 1833-1840, 1997.

SIUZDAK, G. The expanding role of mass spectrometry in biotechnology. 2nd edition, MCC Press, San Diego-EUA. 257p., 2006.

SMOLE, S.C.; KING, L.A.; LEOPOLD, P.E.; ARBEIT, R.D. Sample preparation of gram-positive bacteria for identification by matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight. **Journal of Microbiology Methods**, v.48, p.107– 115, 2002.

SOUZA, M. S. **Aplicações da espectrometria de massas e da cromatografia líquida na caracterização estrutural de biomoléculas de baixa massa molecular**. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciências – Bioquímica, 2008.

SOMMERHAUSER J., KLOPPERT B., WOLTER W., ZSCHOCK M., SOBIRAJ A. e FAILING K. The epidemiology of Staphylococcus aureus infections from subclinical mastitis in dairy cows during a control programme. **Vet. Microbiol.** 96:91-102, 2003.

TERAMOTO, K.; SATO, H.; SUN, L.; TORIMURA, M.; TAO, H.; YOSHIKAWA, H.; HOTTA, Y.; HOSODA, A.; TAMURA, H. Phylogenetic Classification of Pseudomonas putida Strains by MALDI-MS Using Ribosomal Subunit Proteins as Biomarkers. **Analytical Chemistry**. n. 79, p. 8712-8719, 2007.

URECH, E.; PUHAN, Z.; SCHAFFLILBAUM, M. Changes in Milk Protein Fraction as Affected by Subclinical Mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 11, p. 2402-2411, 1999.

WATSON, J. T.; SPARKMAN, O. D.. **INTRODUCTION TO MASS SPECTROMETRY: Instrumentation, Applications and Strategies for Data Interpretation**. Wiley: England, 2007. p. 860.

WENZ, J.R.; BARRINGTON, G.M.; GARRY, F.B.; MCSWEENEY, K.D.; DINSMORE, R.P.; GOODELL, G.; CALLAN, R.J. Bacteremia associated with naturally occurring acute coliform mastitis in dairy cows. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 219, p. 976-981, 2001.

WILSON, D.J.; GONZALEZ, R.N.; CASE, K.L.; GARRISON, L.L.; GRÖHN, Y.T. Comparison of seven antibiotic treatments with no treatment for bacteriological efficacy against bovine mastitis pathogens. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p.1664-1670, 1999.

ZHANG, Z.; WANG, D.; HARRINGTON, P.B.; VOORHEES, K.J.; REES, J. Forward selection radial basis function networks applied to bacterial classification based on MALDI-TOF-MS. **Talanta**, v.63, p.527–532, 2004.