



## **Streptococcus e gêneros relacionados como agentes etiológicos de mastite bovina**

*Streptococcus* and related genera as etiological agents of bovine mastitis

Emília Maricato Pedro dos Santos<sup>1</sup>, Maria Aparecida Vasconcelos Paiva Brito<sup>2</sup>,  
Carla Lange<sup>2</sup>, José Renaldi Feitosa Brito<sup>2</sup> & Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira<sup>3</sup>

### RESUMO

Entre os agentes etiológicos de mastite bovina, destacam-se as bactérias do gênero *Streptococcus* e gêneros relacionados, como os *Enterococcus*. Esses microrganismos podem causar tanto mastite contagiosa, como é o caso de *Streptococcus agalactiae*, quanto mastite ambiental, causada pelas demais espécies de *Streptococcus* e *Enterococcus*. Mudanças na taxonomia e nomenclatura deste grupo de microrganismos têm ocorrido nas últimas duas décadas, resultado da aplicação de técnicas moleculares que auxiliam no processo de diferenciação de gêneros e espécies bacterianas. Alterações também têm ocorrido no padrão de infecção intramamária nos rebanhos leiteiros em que foram controladas as mastites causadas por agentes contagiosos. Nesses rebanhos, as infecções causadas por patógenos do ambiente são atualmente o alvo dos programas de controle da mastite. O presente artigo apresenta uma revisão dos principais gêneros e espécies bacterianas do grupo dos cocos gram-positivos catalase-negativos que já foram relacionadas com infecções da glândula mamária de bovinos. Esses incluem, além dos gêneros mencionados acima, os gêneros *Aerococcus*, *Lactococcus* e *Gemella*; e dentro do gênero *Streptococcus*, as espécies *S. agalactiae*, *S. uberis*, *S. bovis*, *S. dysgalactiae*, *S. parauberis*, *S. equi*, *S. porcinus*, *S. canis*, *S. pluranimalium*, *S. parasanguinis* e *S. iniae*.

**Descritores:** cocos gram-positivos catalase-negativos, *Aerococcus*, *Enterococcus*, *Gemella*, *Lactococcus*, mastite bovina.

### ABSTRACT

Gram-positive, catalase-negative cocci are frequently isolated from bovine mammary glands. Members of this group of bacteria include the contagious pathogen *Streptococcus agalactiae* and other streptococci and enterococci which are classified as environmental pathogens in relation to mastitis etiology. Many changes in the taxonomy and nomenclature of this group of microorganisms occurred in the last two decades as a result of the application of molecular techniques that helped delineate differences in bacterial genera and species. Changes were also observed in relation to the pattern of udder infection in dairy herds as a result of the control of the contagious pathogens. In these herds, environmental pathogens are the target of the modern mastitis control programs. In this paper, available information about the most important bovine mastitis-related streptococci and related genera are reviewed. The most relevant information found was related to the genera *Aerococcus*, *Enterococcus*, *Gemella*, *Lactococcus*, and *Streptococcus*. Due to their wider distribution, special emphasis was given to the following streptococci species: *S. agalactiae*, *S. bovis*, *S. canis*, *S. dysgalactiae*, *S. equi*, *S. iniae*, *S. parasanguinis*, *S. parauberis*, *S. pluranimalium*, *S. porcinus*, and *S. uberis*.

**Keywords:** Gram-positive, catalase negative cocci, *Aerococcus*, *Enterococcus*, *Gemella*, *Lactococcus*, bovine mastitis.

## I. INTRODUÇÃO

### II. COCOS GRAM-POSITIVOS, CATALASE-NEGATIVOS

#### 1. Gênero *Streptococcus*

##### 1.1 *Streptococcus agalactiae*

##### 1.2 *Streptococcus uberis* e *Streptococcus parauberis*

##### 1.3 Grupo *Streptococcus bovis*

##### 1.4 *Streptococcus dysgalactiae*

##### 1.5 *Streptococcus equi*

##### 1.6 *Streptococcus porcinus*

##### 1.7 *Streptococcus canis*

##### 1.8 *Streptococcus pluranimalium*

##### 1.9 Outros estreptococos

#### 2. Gênero *Aerococcus*

#### 3. Gênero *Enterococcus*

#### 4. Gênero *Lactococcus*

### III. IDENTIFICAÇÃO DE COCOS GRAM-POSITIVOS, CATALASE-NEGATIVOS

## IV. CONCLUSÕES

### I. INTRODUÇÃO

Mudanças na taxonomia e nomenclatura do gênero *Streptococcus* e gêneros relacionados vêm ocorrendo com frequência nas últimas décadas. Tais mudanças são o resultado principalmente da aplicação dos métodos de identificação, incluindo tanto os testes fisiológicos tradicionais, quanto os métodos moleculares [17,30,35,43,45,49]. As mudanças na nomenclatura levaram à criação do termo “cocos gram-positivos catalase-negativos” para o grupo, pois desta maneira nenhum gênero é excluído [20]. Muitos microrganismos pertencentes a esse grupo têm sido isolados do leite total de rebanhos e são envolvidos em casos de infecções subclínicas e formas clínicas da mastite.

A análise da literatura sobre a etiologia da mastite bovina revela que na maioria dos casos não se faz a diferenciação desses microrganismos, porque se considera que todos os isolados com características de “cocos gram-positivos catalase-negativos” pertencem ao gênero *Streptococcus*. Essas lacunas do conhecimento resultam na perda de informações importantes sobre a etiologia e a epidemiologia das infecções da glândula mamária, e na falta de aprofundamento das pesquisas que poderiam conduzir a métodos mais efetivos para o controle da mastite e outras enfermidades das vacas leiteiras, especialmente. Essa revisão

teve o objetivo de reunir e sintetizar essas informações que estão dispersas em várias publicações, visando minimizar as dificuldades para a identificação desse importante grupo de microrganismos.

### II. COCOS GRAM-POSITIVOS, CATALASE-NEGATIVOS

Os estreptococos são considerados o segundo grupo de microrganismos em importância na etiologia da mastite dos ruminantes, sendo precedidos pelo grupo dos estafilococos. Quatro espécies, *Streptococcus agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. bovis* e *S. uberis* são encontradas na maioria dos rebanhos. Entretanto, tem sido reconhecido que o gênero *Streptococcus* inclui pelo menos 50 espécies, que por sua vez incluem muitos patógenos para o homem e animais domésticos, mesmo depois das alterações promovidas na década de 1980, quando o gênero *Streptococcus* foi desdobrado em outros três, nomeadamente, *Enterococcus*, *Lactococcus* e *Streptococcus* [34]. A descrição de novas espécies relacionadas à mastite bovina vem acompanhando a proposição de novas espécies para o gênero *Streptococcus*. Alguns exemplos incluem os patógenos de bovinos, *S. parauberis* e *S. pluranimalium*, e *S. parasanguinis*, descrito em ovelhas [14,26,66]. Mais recentemente, uma nova subespécie, *Streptococcus equi* subsp. *ruminatorum*, isolada de casos de mastite caprina e ovina, foi proposta por Fernandez *et al.* [25].

Atualmente fazem parte do grupo dos cocos gram-positivos catalase-negativos os seguintes gêneros: *Abiotrophia*, *Aerococcus*, *Dolosicoccus*, *Dolosi-granulum*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Facklamia*, *Gemella*, *Globicatella*, *Granulicatella*, *Helcococcus*, *Ignavigranum*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* e *Vagococcus* [53]. Os gêneros *Streptococcus* e *Enterococcus* são encontrados com maior frequência causando infecções em animais. Outros gêneros como *Helcococcus* e *Tetragenococcus* ainda não foram descritos em animais. Um ou mais dos gêneros *Aerococcus*, *Enterococcus*, *Gemella*, *Lactococcus*, *Streptococcus* e *Vagococcus* foram identificados no leite total de rebanhos bovinos tanto no Brasil, quanto em outros países [5,6,56,67]. Rossito *et al.* [52] identificaram a espécie *Gemella morbillorum* (1 isolado) de mastite bovina na Região Central da Califórnia.

### 1. Gênero *Streptococcus*

Os estreptococos são colonizadores transitórios da pele e residentes de mucosas e podem ser isolados como parte integrante da microbiota normal dos tratos respiratório, gastrointestinal e genital de várias espécies animais [53]. Os estreptococos que causam mastite bovina são classificados nos grupos dos microrganismos contagiosos (*S. agalactiae*) e ambientais (os demais), porque estes apresentam maior capacidade de sobreviver e multiplicar em sítios extramamários incluindo, por exemplo, várias regiões do corpo do animal e outras fontes do ambiente de produção [17,29]. Além de exercerem um importante papel como patógenos da mastite, os estreptococos contribuem para as altas contagens de bactérias do leite total de rebanhos [67].

Os fatores de virulência presentes nas diversas espécies de *Streptococcus* incluem proteínas de superfície, polissacarídeos capsulares, exotoxinas, enzimas (hemolisina, fibrinolisin, etc.) e o fator CAMP (Christie-Atkins-Munch-Petersen) [36]. A identificação de alguns desses fatores, como o CAMP por exemplo, é usada como um dos critérios decisivos na identificação das espécies do gênero.

#### 1.1 *Streptococcus agalactiae*

É um patógeno importante responsável tanto por infecções no homem quanto no gado leiteiro. O reservatório bovino é o úbere infectado, mas não existem dados definitivos comprovando a transmissão de isolados entre o homem e os animais. Foi encontrada

uma correlação entre o consumo de leite cru e o aumento do risco de infecção por *S. agalactiae* no homem, e a tipagem molecular indicou origem bovina para amostras humanas associadas à doença neonatal [3,4]. Dogan *et al.* [16] verificaram que os sorotipos moleculares V (48,1%) e III (19,2%) predominavam entre isolados de *S. agalactiae* originados de hospedeiros humanos, seguidos pelos sorotipos Ia e Ib (13,5% cada um) e II (5,8%). Esses dados diferiram dos isolados predominantes no material obtido de bovinos: III (53%) e II (14,5%). Resultados comparáveis foram descritos no Brasil para amostras de origem bovina, em que predominou o sorotipo III (77,6%), seguido pelos sorotipos II, Ia, Ib e VI [18]. No Canadá, Martinez *et al.* [42] analisaram a diversidade genética de *S. agalactiae* em amostras de origem humana (mulheres assintomáticas) e de bovinos, e verificaram que nos isolados bovinos predominou o sorotipo III e entre os isolados humanos, o sorotipo V. No estudo de Dogan *et al.* [16], porém, dois dos 83 isolados de origem bovina eram indistinguíveis dos isolados de origem humana, por meio de uma combinação das técnicas de ribotipagem e sorotipagem, sugerindo uma possível transmissão homem-animal de *S. agalactiae*.

Em outro estudo conduzido no Brasil, isolados de mastite bovina foram comparados com outros de origem humana. Observou-se que os subtipos associados ao homem e aos bovinos diferiam na distribuição dos genes específicos associados com virulência (*bca*, *lmb* e *scpB*), sugerindo que distintas populações de *S. agalactiae* circulam entre o homem e os bovinos [19]. Em estudo semelhante realizado recentemente, isolados de *S. agalactiae* de mastite bovina foram caracterizados por métodos moleculares e comparados com 103 isolados de origem humana coletados na mesma época, revelando que alguns destes isolados apresentaram padrões de PFGE (“Pulsed Field Gel Electrophoresis”) idênticos ou muito similares com o clone humano do tipo V, além de possuírem o mesmo padrão de ribotipagem. A relação genética entre os isolados foi confirmada por MLST (“Multilocus Sequence Typing”). Estes dados suportam a hipótese de que alguns isolados de *S. agalactiae* de origem bovina estão intimamente relacionados com isolados humanos, e podem infectar o homem, e vice-versa [48].

A infecção intramamária causada por *S. agalactiae* é associada à elevada contagem de células somáticas no leite de animais e de rebanhos [57,59,67]. Embora praticamente erradicado dos rebanhos de vá-

rios países, *S. agalactiae* continua a ser um dos mais importantes agentes de mastite bovina no Brasil, tendo sido isolado de diferentes regiões do País em porcentagens que variaram de 3,2% a 33%, e também de mastite bubalina [5,7,11,24,27,31,38,39,47]. Em um estudo conduzido em 48 propriedades leiteiras da Zona da Mata e Campo das Vertentes do Estado de Minas Gerais, *S. agalactiae* foi isolado em 60% delas [5].

*Streptococcus agalactiae* possui características bioquímicas bem definidas, o que permite sua identificação com segurança empregando um pequeno número de testes. É classificado no grupo B de Lancefield, produz hemólise do tipo beta, apresenta fator CAMP e hidrolisa o hipurato de sódio; não hidrolisa a esculina, nem cresce em presença de bile-esculina [36].

### 1.2 *Streptococcus uberis* e *Streptococcus parauberis*

*Streptococcus uberis* é um importante agente de infecções subclínicas e episódios clínicos de mastite bovina em todo o mundo. No Reino Unido é responsável por 33% de todos os casos de mastite clínica e na Dinamarca por 23% dos casos de mastite [57]. No Brasil, foi registrado seu isolamento de mastite bovina e bubalina [7,10,11,27,38,39,55].

*Streptococcus uberis* apresenta hemólise do tipo alfa, hidrolisa tanto a esculina quanto o hipurato de sódio, porém não cresce em presença de bile-esculina [36]. Produz uma co-hemolisina chamada de fator Ueberis, semelhante ao fator CAMP produzido por *S. agalactiae*, que é responsável pelo teste de CAMP positivo [41].

*Streptococcus parauberis* apresenta características bioquímicas semelhantes a *S. uberis*, dificultando a diferenciação entre essas espécies por testes fenotípicos convencionais [36]. Khan *et al.* [35] relataram que a única diferença entre as duas espécies foi a produção da enzima  $\beta$ -D-glucuronidase por *S. uberis*. Sondas de hibridização espécie-específicas foram desenvolvidas para ambos os microrganismos [20]. McDonald *et al.* [43] diferenciaram *S. parauberis* de *S. uberis* usando o método de análise de 16S-23S rRNA por PCR-RFLP (“Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism”). Quarenta e sete, de um total de 57 isolados identificados como *S. uberis* por testes bioquímicos convencionais, foram confirmados como *S. uberis*. Seis isolados foram identificados como *S. parauberis*, com base em seus padrões únicos de RFLP. Os demais (quatro) isolados

foram mais relacionados às espécies *S. iniae* (2) e *Aerococcus viridans* (2).

Vários potenciais fatores de virulência foram identificados em *S. uberis*, incluindo a lactoferrina e outros, que auxiliariam o microrganismo a evitar os mecanismos de defesa do hospedeiro e facilitariam sua adesão às células epiteliais e a colonização do tecido mamário [57]. Um desses fatores, uma nova proteína produzida por *S. uberis* e designada SUAM (“*S. uberis* adhesion molecule”), é responsável pela aderência da bactéria às células epiteliais mamárias do animal [49].

A confirmação do isolamento de *S. uberis* ou *S. parauberis* de infecções humanas não está documentada; todas as amostras suspeitas reportadas de casos humanos foram identificadas como *Globicatella sanguinis* [20].

### 1.3 Grupo *Streptococcus bovis*

Neste grupo estão incluídos os microrganismos descritos como *S. bovis*, *S. equinus* (*S. bovis*), *S. gallolyticus* (*S. bovis* I), *S. pasteurianus* (*S. bovis* II.2), *S. infantarius* (*S. bovis* II/1) e *S. lutetiensis*, isolados tanto do homem, como de animais, entre eles bovinos e eqüinos. Esse grupo vem sofrendo alterações de ordem taxonômica e a nomenclatura das espécies ainda não está bem definida [20].

*Streptococcus bovis* é freqüentemente isolado de bovinos e eqüinos e é a espécie de *Streptococcus* predominante no rúmen [57]. Tem sido isolado de casos de mastite bovina e bubalina [7,15,28,37,52,55]. Watts [65] descreveu as características de *S. equinus/S. bovis* a partir de 17 isolados de leite de bovinos com mastite, concluindo que a designação de espécie *S. equinus* teria prioridade sobre *S. bovis*.

*Streptococcus bovis* pode apresentar sorologia do grupo D na classificação de Lancefield, ser alfa ou não-hemolítico, hidrolisar a esculina, porém não o hipurato de sódio, e crescer em presença de bile-esculina, podendo ser facilmente confundido com o gênero *Enterococcus* [2]. O teste de produção da enzima pirrolidona arilamidase (PYR) permite diferenciar a espécie *S. bovis* (PYR negativo) do gênero *Enterococcus* (PYR positivo) [23].

O epíteto *gallolyticus* derivou da habilidade destes microrganismos em descarboxilar o ácido gálico. Amostras de *S. gallolyticus* foram isoladas de humanos e de diversas espécies animais, silvestres e do-

mésticas, entre elas suínos, cães e bovinos, incluindo amostras de mastite bovina [15,57].

#### 1.4 *Streptococcus dysgalactiae*

A espécie *S. dysgalactiae* foi dividida em duas subespécies, *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* e *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*. Esta última originou-se da reclassificação de *S. equisimilis* após a constatação da similaridade genética dos dois organismos [20]. Amostras de *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* de origem bovina são sempre alfa-hemolíticas ou não-hemolíticas, enquanto a segunda subespécie apresenta hemólise beta [36].

*Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* é um dos patógenos mais comuns de mastite bovina e causa grandes perdas econômicas. É capaz de sobreviver na boca, vagina e pele de animais saudáveis, bem como nas camas e pastagens. O isolamento de *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* no homem ainda não foi documentado, mas sabe-se que possui fatores de virulência similares a *S. pyogenes* [20,57]. Na classificação de Lancefield pode pertencer ao grupo C ou L, pode ser alfa, beta ou não-hemolítico, e não hidrolisa a esculina, nem o hipurato de sódio [36].

*Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* é um importante patógeno de suínos e eqüinos. Alguns isolados de animais produzem bacteriocinas [57]. Bactérias desta espécie com antígenos dos grupos A, C, G e L foram isoladas de infecções humanas [20].

No Brasil, *S. dysgalactiae* foi isolado de mastite bovina em porcentagens que variaram de 3 a 9,2% [24,27,39,47,55]. O isolamento de *S. dysgalactiae* de mastite bubalina foi descrito por Costa *et al.* [11] e por Carvalho [7] em porcentagens mais elevadas, 46,1 e 51,7%, respectivamente. Neste último estudo foram isoladas as duas subespécies, *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* (2 isolados) e *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (13 isolados).

#### 1.5 *Streptococcus equi*

*Streptococcus equi* subsp. *equi* e *S. equi* subsp. *zooeconomicus* são espécies associadas aos eqüinos. Pertencem ao grupo C na classificação de Lancefield e apresentam hemólise do tipo beta [36]. *Streptococcus equi* subsp. *equi* causa adenite (garrotilho) em eqüinos. Até o momento não se tem notícias do isolamento desta bactéria em humanos [20]. *Streptococcus equi* subsp. *zooeconomicus* pode causar infecções no homem, e em várias outras espécies animais incluindo suínos, cães, gatos, ovinos e bovinos, e também está

envolvido em casos de mastite bovina [1,12,20,57,58]. É isolado com frequência do trato respiratório superior de eqüinos sadios; após situações de estresse ou infecção por vírus, pode causar infecção secundária com sinais clínicos semelhantes aos do garrotilho [57]. Ambas as subespécies foram isoladas de mastite bovina [65]. Las Heras *et al.* [40] relataram um surto de mastite clínica causado por *S. equi* subsp. *zooeconomicus* que acometeu 13 dentre 58 ovelhas lactantes. Os animais infectados não se recuperaram após tratamento com antibióticos, a produção de leite caiu drasticamente, e os úberes secaram cinco dias após o início dos sintomas. Os isolados apresentaram as mesmas características bioquímicas, exibiram o mesmo perfil de sensibilidade a antibióticos e também exibiram o mesmo padrão molecular pela eletroforese em campo pulsado (PFGE), indicando uma fonte única de contaminação para todos os animais.

#### 1.6 *Streptococcus porcinus*

Essa espécie pertence aos grupos sorológicos E, P, U ou V e está amplamente distribuída entre os animais. *Streptococcus porcinus* do grupo E está associado a várias doenças em suínos, e é o agente etiológico da linfadenite estreptocócica suína [57]. Esta bactéria também foi reportada em infecções humanas, geralmente associada a problemas envolvendo o trato genital feminino [21]. Em meio de cultura com sangue, *S. porcinus* produz uma extensa área de hemólise característica, que o diferencia de *S. agalactiae*, que produz uma zona de hemólise mais reduzida ao redor da colônia. Pode apresentar reação sorológica cruzada com estreptococos do grupo B (*S. agalactiae*) [62]. Foi isolado de casos de mastite bovina e bubalina [7,55,65].

#### 1.7 *Streptococcus canis*

Esse microrganismo foi descrito por Devriese *et al.* [13]. Pertence ao grupo sorológico G, é beta-hemolítico e produz o fator CAMP [36]. É isolado, com frequência, de cães e gatos, e pode ser considerado uma causa infreqüente de mastite bovina. Surto de mastite em rebanhos bovinos associados com aumento da contagem de células somáticas ou alta prevalência de animais com mastite subclínica foram relatados em Israel e na Alemanha [9,33]. A identificação de *S. canis* em amostras de leite de vacas com mastite foi também realizada nos Estados Unidos e no Brasil [55,65]. Cães e gatos podem atuar como fontes de infecção para o gado, como foi demonstrado recentemente por Tikofsky & Zadocks [63]. *S. canis* também foi isolado de ani-

mais silvestres, como ratos, coelhos e raposas, e causa infecções oportunistas nestas espécies, o que indica a possibilidade de existência de várias fontes de infecção para a vaca leiteira, especialmente na ausência de medidas higiênicas adequadas [57,63].

### 1.8 *Streptococcus pluranimalium*

Devriese *et al.* [14] descreveram uma nova espécie de *Streptococcus* denominada *S. pluranimalium*, isolada de bovinos, aves, caprinos e felinos. As amostras de origem bovina foram isoladas de tonsilas de bezerras, do cérvix e da vagina de vacas e de amostras de leite de mastite subclínica [20]. Estudos desenvolvidos por Santos [55] e Carvalho [7], que investigaram, respectivamente, amostras de leite de vacas e de búfalas com mastite, isolaram três estirpes de *S. pluranimalium*, sendo provavelmente os primeiros relatos de isolamento deste patógeno no Brasil.

### 1.9 Outros estreptococos

Várias outras espécies de estreptococos têm sido isoladas de leite bovino, ovino, caprino e bubalino. Fernandez-Garayzabal *et al.* [26] relataram o isolamento em cultura pura de *S. parasanguinis* no leite de ovelhas com reação ao CMT (“California mastitis test”), um indicativo da presença de mastite subclínica. Essa espécie tem sido isolada da garganta, sangue e urina humana, mas não existem outros relatos disponíveis de casos de mastite em animais. McDonald *et al.* [43] relataram a identificação de *S. iniae* pelo método PCR-RFLP, em dois isolados de casos de mastite bovina, previamente identificados bioquimicamente como *S. uberis*. *Streptococcus iniae* é um patógeno zoonótico, responsável por infecções graves e invasivas em vários tipos de peixes e em seres humanos [22,46]. Fernandez *et al.* [25] propuseram a designação de *S. equi* subsp. *ruminatorum* como uma nova subespécie, com base na biotipagem fenotípica e métodos taxonômicos moleculares (sequenciamento do gene 16S rRNA, estudos de pareamento DNA-DNA e ribotipagem).

### 2. Gênero *Aerococcus*

*Aerococcus* são cocos gram-positivos que formam tétrades. Apesar de não possuírem a enzima catalase, algumas amostras podem apresentar uma reação fracamente positiva no teste. Supõe-se que a hidrólise do peróxido de hidrogênio ocorra pela presença da enzima peroxidase, que produz efervescência menor do que a causada com a enzima catalase [21].

Poucos estudos apontam os microrganismos pertencentes ao gênero *Aerococcus* como patógenos relevantes na clínica médica e veterinária, mas alguns isolados podem ser erroneamente classificados como *Streptococcus uberis*, pelos métodos microbiológicos tradicionais. McDonald *et al.* [43] relataram que dois isolados previamente classificados como *S. uberis* foram identificados como sendo estreitamente relacionados com *A. viridans* pelo sequenciamento de 16S rRNA. Até o início da década de 90, *A. viridans* era a única espécie isolada de infecções humanas mas, recentemente, foram descritas quatro outras espécies pertencentes ao gênero: *A. urinae*, *A. christensenii*, *A. urinaehominis* e *A. sanguicola* [53]. Este gênero foi isolado de mastite bovina em diferentes estudos [15,28, 52,65].

### 3. Gênero *Enterococcus*

O gênero *Enterococcus* foi formado a partir da reclassificação de *Streptococcus faecalis* e *Streptococcus faecium* e atualmente possui 22 espécies [60]. Características intrínsecas de *Enterococcus* permitem que eles cresçam e sobrevivam em ambientes pouco favoráveis. São organismos ubíquos, podendo ser encontrados no solo, água, plantas, alimentos, animais e insetos. *Enterococcus* são microrganismos comensais que atuam como patógenos oportunistas, podendo ser causa de infecção hospitalar no homem. *Enterococcus faecalis* é uma bactéria comumente isolada do trato gastrointestinal humano [60].

Algumas propriedades dos *Enterococcus* foram sugeridas como potenciais fatores de virulência: produção de hemolisina, citotoxina capaz de lisar eritrócitos do homem, de coelho e de cavalo e produção de substâncias de agregação e de aderência [23].

Como encontram-se disseminados no ambiente da fazenda, podem contaminar a glândula mamária das vacas no período entre ordenhas ou durante o período seco. O gênero foi isolado de mastite bovina [7,15,28,52,55,65]. *Enterococcus gallinarum* foi isolado de casos de mastite subclínica em bubalinos no Brasil [8]. Bactérias do gênero *Enterococcus* são caracteristicamente mais resistentes aos antimicrobianos, especialmente quando comparados às espécies do gênero *Streptococcus* [52].

### 4. Gênero *Lactococcus*

A dificuldade para distinguir o gênero *Lactococcus* de *Streptococcus* ou *Enterococcus* foi provavel-

mente a causa da identificação errônea desse gênero no passado. A diferenciação entre os gêneros *Lactococcus* e *Enterococcus* com base em testes bioquímicos pode ser difícil, sendo indicado, em caso de dúvida, a utilização de sonda de hibridização específica para *Enterococcus* [53]. Bactérias do gênero *Lactococcus* são consideradas patógenos oportunistas, tendo sido isoladas de infecções humanas (endocardites, abscessos, feridas) e de animais [21]. Existem diversos relatos de isolamento de espécies de *Lactococcus* de mastite em bovinos e bubalinos [7,8,15,28,51,52,55,61]. Pot *et al.* [51] identificaram as espécies *L. garvieae*, *L. lactis* subsp. *lactis* e *L. raffinolactis* de amostras de leite de vacas que apresentavam alta contagem de células somáticas. Vela *et al.* [64] constataram uma grande diversidade fenotípica (13 diferentes biotipos) e genética, por PFGE (19 pulsotipos), em amostras de *L. garvieae*. Nesse estudo, em que se compararam isolados obtidos de diversos países e de diferentes fontes (trutas, leite bovino e bubalino, água e seres humanos), foram incluídas amostras brasileiras originadas de leite bubalino e de material clínico humano. Os resultados sugeriram a existência de diversas fontes de infecção para essa classe de patógenos.

### III. IDENTIFICAÇÃO DE COCOS GRAM-POSITIVOS, CATALASE-NEGATIVOS

O arranjo celular evidenciado pela coloração de Gram é usado para auxiliar na diferenciação dos diferentes gêneros de cocos gram-positivos catalase-negativos. Observam-se agrupamentos celulares em pares ou cadeias nos gêneros *Streptococcus*, *Globicatella*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus* e *Leu-*

*conostoc*. Arranjos celulares em tétrades são encontrados em *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Gemella*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus* e *Helcococcus* [21].

A identificação dos gêneros é feita determinando-se características fisiológicas dos isolados, e os principais testes para esta finalidade são, além do arranjo celular: sensibilidade à vancomicina, produção de gás, presença da enzima pirrolidoniil arilamidase e leucina aminopeptidase, crescimento em 6,5% de NaCl, em meio contendo bile-esculina, a 10°C e 45°C, motilidade e tipo de hemólise (Tabela 1). A diferenciação entre *Enterococcus* e *Lactococcus* nem sempre é possível utilizando-se apenas os testes listados na Tabela 1 [21]. Em torno de 45% dos *Lactococcus* apresentaram algum crescimento a 45°C, não podendo ser diferenciados dos *Enterococcus* por este teste. Uma alternativa é a utilização de outros testes fenotípicos, como a utilização de manitol, sorbitol, arabinose, rafinose, tolerância ao telurito e utilização de piruvato, ou então a utilização de testes moleculares, como o uso de sonda genética.

O gênero *Streptococcus* é o mais comumente isolado de infecções da glândula mamária [15,52,65]. Como são microrganismos fastidiosos, é indicada a adição de sangue ou soro para incentivar o seu crescimento [54]. As diferentes espécies de *Streptococcus* são identificadas combinando-se testes bioquímicos e sorológicos [36]. As principais características usadas para discriminar as espécies de *Streptococcus* isoladas de mastite bovina estão sumarizadas na Tabela 2. A identificação de espécies de *Streptococcus* pode ser feita também utilizando-se sondas genéticas ou por meio da reação em cadeia da polimerase [32,36,44,50].

**Tabela 1.** Características fenotípicas de cocos gram-positivos catalase-negativos isolados de mastite bovina.

	Arranjo	Van	Gás	PYR	LAP	NaCl	BE	10°C	45°C	Mot	Hem
<i>Streptococcus</i>	cadeias	S	-	- <sup>1</sup>	+	-	- <sup>2</sup>	-	- <sup>3</sup>	-	α /β /-
<i>Enterococcus</i>	cadeias	V	-	+	+	+	+	+	+	V	α /β /-
<i>Lactococcus</i>	cadeias	S	-	+	+	V	+	+	-	-	α /-
<i>Vagococcus</i>	cadeias	S	-	+	+	+	+	+	-	+	α /-
<i>Gemella</i>	tétrades	S	-	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Aerococcus</i>	tétrades	S	-	+	-	+	+	-	-	-	α

Abreviaturas: V, variável; Van, sensibilidade à vancomicina; Gás, produção de gás; PYR, presença da enzima pirrolidoniil arilamidase; LAP, presença da enzima leucina aminopeptidase; NaCl, crescimento em 6,5% de NaCl; BE, crescimento em meio contendo bile-esculina; 10°C e 45°C, crescimento a 10°C e 45°C; Mot, motilidade; Hem, tipo de hemólise.

<sup>1</sup>algumas espécies de *Streptococcus* podem ser PYR+; <sup>2</sup>*S. bovis* é BE+; <sup>3</sup>*S. bovis* pode crescer a 45°C.

Fonte: adaptado de Barrow & Feltham [2] e Facklam & Elliot [21].

**Tabela 2.** Características diferenciais das principais espécies de *Streptococcus* isoladas de mastite bovina.

	Soro	Hem	Hip	Esc	Arg	VP	PA	$\beta$ G	AP	Rib	Man	Sor	Lac	Tre	Inu	Raf
<i>S. agalactiae</i>	B	$\beta$ CAMP+	+	-	+	+	-	V	+	+	-	-	V	+	-	-
<i>S. equi</i> subsp. <i>equi</i>	C	$\beta$	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i>	C	$\beta$	-	V	+	-	-	+	+	V	-	+	+	-	-	-
<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	C, L	$\alpha$ , $\beta$ , - <sup>a</sup>	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-
<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	C, G	$\beta$	-	V	+	-	-	+	+	+	-	-	V	+	-	-
<i>S. canis</i>	G	$\beta$ CAMP+ <sup>b</sup>	-	V	+	-	-	-	+	+	-	-	V	+	-	-
<i>S. porcinus</i>	E, P, U, V, -	$\beta$ CAMP+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	V	+	-	-
<i>S. uberis</i>	-, E	$\alpha$	+	+	+	+	+	+	V	+	+	+	+	+	+	-
<i>S. parauberis</i>	-, E	$\alpha$	V	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	V	V
<i>S. bovis</i>	V	$\alpha$ , -	-	+	NT	+	-	NT	NT	-	V	NT	+	V	-	+
<i>S. pluranimalium</i>	ND	$\alpha$	+	+	+	-	V	V	V	V	V	V	V	+	-	V

Abreviaturas: Soro, grupo sorológico; Hem, hemólise; Hip, hipurato de sódio; Esc, esculina; Arg, arginina; VP, produção de acetoina; PA, pyrrolydonyl amilamidase; bG, b-glucuronidase; AP, fosfatase alcalina; Rib, ribose; Man, manitol; Sor, sorbitol; Lac, lactose; Tre, trealose; Inu, inulina; Raf, rafinose; V, variável; NT, não-testado; ND, dado não disponível.

<sup>a</sup>Amostras bovinas nunca são beta-hemolíticas. <sup>b</sup>Somente amostras caninas são CAMP-positivas.

Fonte: adaptado de Barrow & Feltham [2], Devriese *et al.* [14] e Kilian [36].

#### IV. CONCLUSÕES

Há uma diversidade de microrganismos pertencentes ao grupo dos cocos gram-positivos catalase-negativos envolvidos na etiologia da mastite bovina. No Brasil existem poucas informações sobre a ocorrência deste grupo de microrganismos nos rebanhos leiteiros, pois na maioria dos trabalhos sobre a etiologia da mastite bovina não foi feita a diferenciação destes organismos. Entretanto, ocasionalmente, esses microrganismos têm sido identificados em reb

anhos bovinos e bubalinos do Brasil.

O controle da mastite requer um entendimento básico da natureza e da distribuição dos agentes etiológicos específicos. Esquemas de controle de agentes como *Staphylococcus aureus* e *S. agalactiae* foram propostos depois do desenvolvimento de métodos de identificação acurados e estudos epidemiológicos. O

controle dos estreptococos ambientais tem sido mais difícil por causa de sua ampla distribuição e descrição imprecisa das espécies, o que tem dificultado estudos epidemiológicos.

A diferenciação de *S. agalactiae* dos demais estreptococos pode ser realizada facilmente com a utilização de poucos testes microbiológicos. Entretanto, para a classificação dos demais cocos gram-positivos catalase-negativos em gêneros e espécies é necessária a realização de um número maior de testes, que não são normalmente feitos no diagnóstico microbiológico de rotina. A identificação destes e de outros agentes de mastite pode levar ao delineamento de programas de controle mais racionais e efetivos, à redução dos custos com a terapia e à melhoria da qualidade do leite.

**Agradecimentos.** À FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais), Edt 07/2003, pelo apoio financeiro. Ao CNPq, pela bolsa concedida a Emília Maricato Pedro dos Santos.

#### REFERÊNCIAS

- 1 **Balter S., Benin A., Pinto S.W.L., Teixeira L.M., Alvin G.G., Luna E., Jackson D., LaClaire L., Elliott J., Facklam R. & Schuchat A. 2000.** Epidemic nephritis in Nova Serrana, Brazil. *Lancet*. 355: 1776-1780.
- 2 **Barrow G.I. & Feltham R.K.A. 1993.** Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria. 3rd edn. Cambridge: Cambridge University Press, 331p.
- 3 **Becker H. 1994.** *Streptococcus agalactiae* (group B streptococci). In: International Dairy Federation (Ed). *The significance of pathogenic microorganisms in raw milk*. Brussels: IDF, pp. 43-54.



- 4 Bisharat N., Crook D.W., Leigh J., Harding R.M., Ward P.N., Coffey T.J., Maiden M.C., Peto T. & Jones N. 2004. Hyperinvasive neonatal group B *Streptococcus* has arisen from a bovine ancestor. *Journal of Clinical Microbiology*. 5: 2161-2167.
- 5 Brito M.A.V.P., Brito J.R.F., Ribeiro M.T. & Veiga V.M. 1999. Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 51: 129-135.
- 6 Brito M.A.V.P., Brito J.R.F., Souza H.M. & Vargas O.L. 1998. Avaliação da sensibilidade da cultura de leite do tanque para isolamento de agentes contagiosos da mastite bovina. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 18: 39-44.
- 7 Carvalho L.B. 2005. Padrão de infecção intramamária em rebanhos bubalinos na região do Alto São Francisco. 37f. Belo Horizonte, MG. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Programa de Pós-graduação da Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.
- 8 Carvalho M.G., Vianni M.C., Elliot J.A., Reeves M., Facklam R.R. & Teixeira L.M. 1997. Molecular analysis of *Lactococcus garviae* and *Enterococcus gallinarum* isolated from water buffalos with subclinical mastitis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 418: 401-404.
- 9 Chaffer M., Friedman S., Saran A. & Younis A. 2005. An outbreak of *Streptococcus canis* mastitis in a dairy herd in Israel. *New Zealand Veterinary Journal*. 53: 261-264.
- 10 Costa E.O., Ribeiro A.R., Watanabe E.T. & Melville P.A. 1998. Infectious bovine mastitis caused by environmental organisms. *Journal of Veterinary Medicine*. 45: 65-71.
- 11 Costa E.O., Watanabe E.T., Ribeiro A.R., Garino J.R., Horiuti A.M. & Baruselli P.S. 2000. Mastite bubalina: etiologia, índices de mastite clínica e subclínica. *Napgama*. 1: 12-15.
- 12 Devriese L.A. 1991. Streptococcal ecovars associated with different animal species: epidemiological significance of serogroups and biotypes. *Journal of Applied Bacteriology*. 71: 478-483.
- 13 Devriese L.A., Hommez J., Kilpper-Baelz R. & Schleifer K-H. 1986. *Streptococcus canis* sp. nov.: a species of group G streptococci from animals. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 36: 422-425.
- 14 Devriese L.A., Vandamme P., Collins M.D., Alvarez N., Pot B., Hommez J., Butaye P. & Haesebrouck F. 1999a. *Streptococcus pluranimalium* sp. nov., from cattle and other animals. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 49: 1221-1226.
- 15 Devriese L.A., Hommez J., Laevens H., Pot B., Vandamme P. & Haesebrouck F. 1999b. Identification of aesculin-hydrolysing streptococci, lactococci, aerococci and enterococci from subclinical intramammary infections in dairy cows. *Veterinary Microbiology*. 70: 87-94.
- 16 Dogan B., Schukken Y.H., Santisteben C. & Boor K.J. 2005. Distribution of serotypes and antimicrobial resistance genes among *Streptococcus agalactiae* isolates from bovine and human hosts. *Journal of Clinical Microbiology*. 43: 5899-5906.
- 17 Douglas V.L., Fenwick S.G., Pfeiffer D.U., Williamson N.B. & Holmes C.W. 2000. Genomic typing of *Streptococcus uberis* isolates from cases of mastitis, in New Zealand dairy cows, using pulsed-field gel electrophoresis. *Veterinary Microbiology*. 75: 27-41.
- 18 Duarte R.S., Miranda O.P., Bellei B.C., Brito M.A.V.P. & Teixeira L.M. 2004. Phenotypic and molecular characteristics of *Streptococcus agalactiae* isolates recovered from milk of dairy cows in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*. 42: 4214-4222.
- 19 Duarte R.S., Bellei B.C., Miranda O.P., Brito M.A. & Teixeira L.M. 2005. Distribution and antimicrobial resistance and virulence-related genes among Brazilian group B streptococci recovered from bovine and human sources. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 49: 97-103.
- 20 Facklam R.R. 2002. What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clinical Microbiology Reviews*. 15: 613-630.
- 21 Facklam R.R. & Elliott J.A. 1995. Identification, classification, and clinical relevance of catalase-negative, Gram-positive cocci, excluding the streptococci and enterococci. *Clinical Microbiology Reviews*. 8: 479-495.
- 22 Facklam R., Elliott J., Shewmaker L. & Reingold A. 2005. Identification and characterization of sporadic isolates of *Streptococcus iniae* isolated from humans. *Journal of Clinical Microbiology*. 43: 933-937.
- 23 Facklam R.R. & Teixeira L.M. 1998. *Enterococcus*. In: Collier L., Balows A. & Sussman M. (Eds). *Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections*. 9th edn. London: Edward Arnold, v.2. pp. 669-682.
- 24 Fernandes J.C.T., Moojen, V. & Ferreiro L. 1973. Agentes etiológicos das mastites bovina na bacia leiteira de Porto Alegre, RS, Brasil. *Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS*. 1: 41-46.

- 25 Fernandez E., Blume V., Garrido P., Collins M.D., Mateos A., Domingues L. & Fernandez-Garayzabal J.F. 2004. *Streptococcus equi* subsp. *ruminatorum* subsp. nov., isolated from mastitis in small ruminants. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*. 54: 2291-2296.
- 26 Fernandez-Garayzabal J.F., Fernandez E., Las Heras A., Pascual C., Collins M.D. & Dominguez L. 1998. *Streptococcus parasanguinis*: new pathogen associated with symptomatic mastitis in sheep. *Emerging Infectious Diseases*. 4: 645-647.
- 27 Ferreiro L., Ferreiro C.L.R., Bangel Jr. J.J., Soares H.C., Moojen V. & Fernandes J.C.T. 1985. Mastite bovina na grande Porto Alegre, RS - Brasil. I. Agentes etiológicos isolados durante o período 1982-1985. *Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS*. 13: 81-88.
- 28 Fortin M., Messier S., Paré J. & Higgins R. 2003. Identification of catalase-negative, non-beta-hemolytic, gram-positive cocci isolated from milk samples. *Journal of Clinical Microbiology*. 41: 106-109.
- 29 Fox K.L. & Gay J.M. 1993. Contagious mastitis. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*. 9: 475-487.
- 30 Gillespie B.E. & Oliver S.P. 2005. Simultaneous detection of mastitis pathogens, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, and *Streptococcus agalactiae* by multiplex real-time polymerase chain reaction. *Journal of Dairy Science*. 88: 3510-3518.
- 31 Harrop M.H.V., Pereira L.J.G., Brito J.R.F. & Mello A.M.B. 1995. Incidência de mastite bovina na bacia leiteira da Zona do Agreste Meridional de Pernambuco. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 10: 65-67.
- 32 Hassan A.A., Khan I.U., Abdulmawjood A. & Lämmler C. 2001. Evaluation of PCR methods for rapid identification and differentiation of *Streptococcus uberis* and *Streptococcus parauberis*. *Journal of Clinical Microbiology*. 39: 1618-1621.
- 33 Hassan A.A., Akineden O. & Usleber, E. 2005. Identification of *Streptococcus canis* isolated from milk of dairy cows with subclinical mastitis. *Journal of Clinical Microbiology*. 43: 1234-1238.
- 34 Innings A., Krabbe M., Ullberg M. & Herrmann B. 2005. Identification of 43 *Streptococcus* species by pyrosequencing analysis of the *mpB* gene. *Journal of Clinical Microbiology*. 43: 5983-5991.
- 35 Khan I.U., Hassan A.A., Abdulmawjood A., Lämmler C., Wolter W. & Zschöck M. 2003. Identification and epidemiological characterization of *Streptococcus uberis* isolated from bovine mastitis using conventional and molecular methods. *Journal of Veterinary Science*. 4: 213-223.
- 36 Kilian M. 1998. *Streptococcus* and *Lactobacillus*. In: Collier L., Balows A. & Sussman M. (Eds). *Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections*. 9th edn. London: Edward Arnold, v.2. pp. 634-667.
- 37 Kothe R.V., Sherikar A.A. & Mukherjee S.R. 1993. Isolation and identification of pathogenic bacteria and fungi associated with mastitis in buffaloes. *Indian Journal of Comparative Microbiology, Immunology and Infectious Diseases*. 14: 3-4.
- 38 Langenegger J., Viani M.C.E. & Bahia M.G. 1981. Efeito do agente etiológico da mastite subclínica sobre a produção de leite. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 1: 47-52.
- 39 Langoni H., Domingues P.F., Pinto M.P. & Listoni, F.J.P. 1991. Etiologia e sensibilidade bacteriana da mastite bovina subclínica. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 43: 507-515.
- 40 Las Heras A., Vela A.I., Fernandez E., Legaz E., Dominguez L. & Fernandez-Garayzabal J.F. 2002. Unusual outbreak of clinical mastitis in dairy sheep caused by *Streptococcus equi* subsp. *zooeconomicus*. *Journal of Clinical Microbiology*. 40: 1106-1108.
- 41 Lopes M.F., Merquior V.L.C., Peralta J.M. & Teixeira L.M. 1995. Partial characterization of the cohemolytic factor produced by *Streptococcus uberis* and comparison with the CAMP-factor. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 12: 205-212.
- 42 Martinez G., Harel J., Higgins R., Lacouture S., Daignault D. & Gottschalk M. 2000. Characterization of *Streptococcus agalactiae* isolates of bovine and human origin by randomly amplified polymorphic DNA analysis. *Journal of Clinical Microbiology*. 38: 71-78.
- 43 McDonald W.L., Fry B.N. & Deighton M.A. 2005. Identification of *Streptococcus* spp. causing bovine mastitis by PCR-RFLP of 16S-23S ribosomal DNA. *Veterinary Microbiology*. 111: 241-246.
- 44 Meiri-Bendek I., Lipkin E., Friedmann A., Leitner G., Saran A., Friedman S. & Kashi Y. 2002. A PCR based method for the detection of *Streptococcus agalactiae* in milk. *Journal of Dairy Science*. 85: 1717-1723.
- 45 Merl K., Abdulmawjood A., Lämmler C. & Zschöck M. 2003. Determination of epidemiological relationships of *Streptococcus agalactiae* isolated from bovine mastitis. *FEMS Microbiology Letters*. 226: 87-92.
- 46 Miller J.D. & Neely M.N. 2005. Large scale screen highlights the importance of capsule for virulence in the zoonotic pathogen *Streptococcus iniae*. *Infection and Immunity*. 73 : 921-934.
- 47 Nader Filho A., Schocken-Iturrino R.P., Rossi Jr. O.D., & Cembranelli E.M. 1985. Prevalência e etiologia da mastite bovina na Região de Ribeirão Preto, São Paulo. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 5: 53-56.

- 48 Oliveira I.C.M., Mattos M.C., Pinto T.A., Ferreira-Carvalho B.T., Benchetrit L.C., Whiting A.A., Bohnsack J.F. & Figueiredo A.M.S. 2006. Genetic relatedness between group B streptococci originating from bovine mastitis and a human group B streptococcus type V cluster displaying an identical pulsed-field gel electrophoresis pattern. *Clinical Microbiology & Infection*. 12: 887-893.
- 49 Oliver S.P. & Gillespie B.E. 2004. Molecular methods and mastitis research with particular reference to *Streptococcus uberis*. In: *Proceedings of the Symposium on Molecular Methods in Milk Quality* (Ithaca, U.S.A.). pp. 13-18.
- 50 Phuektes P., Mansell P.D. & Browning G.F. 2001. Multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and streptococcal causes of bovine mastitis. *Journal of Dairy Science*. 84: 1140-1148.
- 51 Pot B., Devriese L.A., Ursi D., Vandamme P., Haesebrouck F. & Kersters K. 1996. Phenotypic identification and differentiation of *Lactococcus* strains isolated from animals. *Systematic and Applied Microbiology*. 19: 213-222.
- 52 Rossito P.V., Ruiz L., Kikuchi Y., Glenn K., Luiz K., Watts J.L. & Cullor J.S. 2002. Antibiotic susceptibility patterns for environmental streptococci isolated from bovine mastitis in central California dairies. *Journal of Dairy Science*. 85: 132-138.
- 53 Ruoff K.L. 2003. *Aerococcus*, *Abiotrophia*, and other infrequently isolated aerobic catalase-negative, Gram-positive cocci. In: Murray P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Pfaller, M.A. & Tenover F.C. (Eds). *Manual of Clinical Microbiology*. 8th edn. Washington: American Society for Microbiology, pp.434-444.
- 54 Ruoff K.L., Whiley R.A. & Beighton D. 2003. *Streptococcus*. In: Murray P.R., Baron E.J., Jorgensen J.H., Pfaller M.A. & Tenover F.C. (Eds). *Manual of Clinical Microbiology*. 8th edn. Washington: American Society for Microbiology, pp.405-421.
- 55 Santos E.M.P. 2004. Identificação e susceptibilidade antimicrobiana de *Streptococcus* e gêneros relacionados isolados de mastite bovina. 81f. Belo Horizonte, MG. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Programa de Pós-graduação da Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.
- 56 Sawant A.A., Pillai S.R. & Jayarao B.M. 2002. Evaluation of five selective media for isolation of catalase-negative Gram-positive cocci from bulk tank milk. *Journal of Dairy Science*. 85: 1127-1132.
- 57 Segura M. & Gottschalk M. 2004. Extracellular virulence factors of streptococci associated with animal diseases. *Frontiers in Bioscience*. 9: 1157-1188.
- 58 Sharp M.W., Prince M.J. & Gibbens J. 1995. *Streptococcus zooepidemicus* infection and bovine mastitis. *Veterinary Record*. 137: 128.
- 59 Souza G.N., Brito J.R.F., Moreira E.C., Brito M.A.V.P. & Silva M.V.G.B. 2005. Fontes de variação para contagem de células somáticas em vacas leiteiras. In: Carvalho L.C., Zoccal R., Martins P.C., Arcuri P.B. & Moreira M.S.P. (Eds). *Tecnologia e gestão na atividade leiteira*. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, pp.121-135.
- 60 Teixeira, L.M. & Facklam, R.R. 2003. *Enterococcus*. In: Murray P.R., Baron E.J., Jorgensen J.H., Pfaller M.A. & Tenover F.C. (Eds). *Manual of Clinical Microbiology*. 8th edn. Washington: American Society for Microbiology, pp.422-433.
- 61 Teixeira L.M., Merquior V.L.C., Vianni M.C.E., Carvalho M.G.S., Fracalanza S.E.L., Steigerwalt A.G., Brenner D.J., & Facklam R.R. 1996. Phenotypic and genotypic characterization of atypical *Lactococcus garvieae* strains isolated from water buffalos with subclinical mastitis and confirmation of *L. garvieae* as a senior subjective synonym of *Enterococcus seriolicida*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 46: 664-668.
- 62 Thompson T. & Facklam R. R. 1997. Cross-reactions of reagents from Streptococcal Grouping Kits with *Streptococcus porcicus*. *Journal of Clinical Microbiology*. 35: 1885-1886.
- 63 Tikofsky L.L. & Zadoks R.N. 2005. Cross-infection between cats and cows: origin and control of *Streptococcus canis* mastitis in a dairy herd. *Journal of Dairy Science*. 88: 2707-2813.
- 64 Vela A.I., Vazquez J., Gibello A., Blanco M.M., Moreno M.A., Liebana P., Albendea C., Alcalá B., Mendez A., Domínguez L. & Fernández-Garayzabal J.F. 2000. Phenotypic and genetic characterization of *Lactococcus garvieae* isolated in Spain from lactococcosis outbreaks and comparison with isolates of other countries and sources. *Journal of Clinical Microbiology*. 38: 3791-3795.
- 65 Watts J.L. 1988. Characterization and identification of streptococci isolated from bovine mammary glands. *Journal of Dairy Science*. 71: 1616-1624.
- 66 Williams A.M. & Collins M.D. 1990. Molecular taxonomic studies on *Streptococcus uberis* types I and II. Description of *Streptococcus parauberis* sp. nov. *Journal of Applied Bacteriology*. 68: 485-490.
- 67 Zadoks R.N., Gonzalez R.N., Boor K.J. & Schukken Y.H. 2004. Mastitis-causing streptococci are important contributors to bacterial counts in raw bulk tank milk. *Journal of Food Protection*. 67: 2644-2650.