

CARACTERIZAÇÃO DO *STAPHYLOCOCCUS* COAGULASE NEGATIVO ISOLADOS DE QUARTOS MAMÁRIOS DE VACAS COM MASTITE SUBCLÍNICA

CHARACTERIZATION OF COAGULASE NEGATIVE *STAPHYLOCOCCUS* ISOLATED FROM THE MAMMARY QUARTERS OF THE COWS WITH SUBCLINICAL MASTITIS

Marlice Teixeira Ribeiro¹ Wanderlei Ferreira de Sá² Leda Aroni Melchíades³
Vânia Maria de Oliviera Veiga⁴ Iveraldo Santos Dutra⁵

RESUMO

O presente trabalho foi desenvolvido na Zona da Mata - MG, durante três meses. De quatro rebanhos utilizados, trabalhou-se com 16 animais mestiços e 19 holandeses. O objetivo foi caracterizar *Staphylococcus* coagulase negativos, isolados de quartos mamários de vacas, que inicialmente reagem à prova do "California Mastitis Test" (CMT), em quatro testes consecutivos, a intervalo de uma semana. A caracterização das 116 amostras encontradas, correspondentes a *Staphylococcus* coagulase negativo, foram: *S. epidermidis* (71,55%), *S. hyicus* subsp. *chromogenes* (6,03%), *S. simulans* (6,03%), *S. warneri* (4,31%), *S. hominis* (3,45%), *S. cohnii* (3,45%), *S. sciuri* (3,45%) e *S. haemolyticus* (1,73%).

Palavras-chave: mastite, *Staphylococcus* coagulase negativo, mastite subclínica.

SUMMARY

The present work was carried out in the region of "Zona da Mata-MG", Brazil, during three months. Sixteen crossbreed cows and nineteen Holstein-Friesian cows from four herds were used. The work aimed to characterize coagulase negative *Staphylococcus* spp. from those animals. The mammary quarters which reacted positive with the California Mastitis test on four consecutive weeks were sampled. A total of 166 strains were isolated. The identified species and the percentage of isolation were as follows: *S. epidermidis* (71.55%), *S. hyicus* subsp. *chromogenes* (6.03%), *S. simulans* (6.03%), *S. warneri* (4.31%), *S. hominis* (3.45%), *S. cohnii* (3.45%), *S. sciuri* (3.45%) and *S. haemolyticus* (1.73%).

Key words: mastitis, coagulase negative *Staphylococcus*, subclinical mastitis.

¹Farmacêutico Bioquímico, M.Sc., Microbiologia Veterinária, Técnico Especializado da EMBRAPA/CNPGL, Rodovia MG 133-42. 36155-000 Coronel Pacheco, MG.

²Médico Veterinário, Doutor, Pesquisador da EMBRAPA/CNPGL.

³Farmacêutico Bioquímico, M.Sc., Microbiologia Veterinária, Severiano Sarmiento, 156/304, Passos. 36026-420 Juiz de Fora, MG.

⁴Médico Veterinário, M.Sc., Pesquisador da EMBRAPA/CNPGL.

⁵Médico Veterinário, Doutor, Professor no Departamento de Apoio da UNESP-Araçatuba. 05340-901 Araçatuba, SP.

INTRODUÇÃO

A mastite é uma inflamação da glândula mamária, associada freqüentemente à presença de bactérias patogênicas, que levam a uma alteração na composição físico-química do leite e determinam um aumento do nível de células somáticas, especialmente os leucócitos. É muito comum nas vacas leiteiras, atingindo um ou mais quartos mamários.

Segundo LANGENEGGER et al. (1981), a intensidade com que a mastite subclínica afeta a produção do leite, em quantidade e qualidade, varia de acordo com a natureza do(s) agente(s) etiológico(s) envolvido(s), com a resposta imunitária do animal, evolução e duração das infecções e propagação da mastite no rebanho. Com relação a outros agentes etiológicos da mastite, espécies do gênero *Staphylococcus* causam menores danos à produção de leite, embora seu controle seja difícil ao nível de rebanho.

FERREIRO, (1980); LANGENEGGER et al. (1981), OLIVEIRA, (1989) consideram o *Staphylococcus aureus* como o agente etiológico predominante em relação a outras bactérias que causam a mastite em rebanhos bovinos brasileiros. Este foi mencionado como principal patógeno da glândula mamária de bovinos no Brasil, enquanto o *Staphylococcus epidermidis* e demais espécies coagulase negativos são reconhecidos como não patogênicos, não somente no País, como, também, nos estudos de BRAMLEY (1978), WARD (1981) e WATTS (1984).

Staphylococcus coagulase negativo (SCN) foram isolados de quartos mamários com mastite subclínica e também de amostras de leite de úberes normais, constituindo-se no mais numeroso grupo de microrganismos presentes na teta e pele do úbere das vacas (CULLEN & HERBERT, 1967; DEVRIESE, 1979).

DEVRIESE & KEYSER (1980) verificaram que algumas bactérias, tais como: *S. epidermidis*, *S. hyicus* subsp. *chromogenes* e *S. simulans*, formariam um grupo "M" mais freqüentemente encontrado em amostras provenientes de quartos com sinais de inflamação e aumento da contagem de células somáticas do leite. DEVRIESE (1984) adicionou ao grupo "M" a espécie *S. warneri*, que predomina no canal da teta.

Numa revisão a respeito dos agentes etiológicos da mastite, WATTS (1988) mencionou 23 espécies para o gênero *Staphylococcus*, caracterizadas por diversos autores. Destas espécies, 14 foram isoladas da glândula mamária de bovinos por DEVRIESE (1979), BABA et al. (1980), DEVRIESE & KEYSER (1980), GARCIA et al. (1980) e WATTS & NICKERSON (1986).

O objetivo deste trabalho foi o de caracterizar *Staphylococcus* coagulase negativos isolados de quartos mamários de bovinos, inicialmente reagentes à prova do "California Mastitis Test", em quatro testes consecutivos, a intervalos de uma semana.

MATERIAL E MÉTODOS

Quatro rebanhos bovinos localizados na Zona da Mata, em Minas Gerais, foram utilizados no presente estudo, durante três meses consecutivos.

Preliminarmente foi realizado o "California Mastitis Test" (CMT) (SCHALM & NOORLANDER, 1957), em 612 quartos mamários de 153 animais. A partir de escores positivos (++ e +++) no CMT e isolamento bacteriano, foram selecionados 16 animais mestiços e 19 holandeses, de ordenha manual e mecânica, respectivamente. Nesta ocasião foram considerados, portanto, animais que apresentaram pelo menos um quarto mamário reagente ao CMT com isolamento correspondente a SCN.

Quatro CMT(s) consecutivos, acompanhados de exames bacteriológicos, foram realizados, com intervalos de sete dias aproximadamente.

Após lavar e secar as tetas, a desinfecção foi feita com gaze embebida em álcool 70°GL. O leite foi colhido em tubos estéreis e incubados a 37°C por 18 horas. O isolamento foi realizado em ágar sangue de carneiro, para verificação da morfologia, aspecto da colônia e produção de pigmentos (COX, 1984, KLOOS, 1990). A obtenção de culturas puras foi por meio da semeadura da amostra em BHI (Difco) e ágar Baird-Parker. Foi realizada coloração de Gram em bactérias provenientes de todos os três meios de cultura.

Para caracterização bioquímica das cepas, adotou-se o procedimento de BIER (1978), GARCIA et al. (1980) e HARVEY (1985).

Para o estudo da fermentação de carboidratos, com vistas à identificação das espécies de *Staphylococcus*, foram obedecidas as recomendações do "Subcommittee on Taxonomy of Staphylococci and Micrococci", conforme recomendações do manual Bergey's (KLOOS & SCHLEIFER, 1986). As amostras foram inoculadas nos tubos contendo o carboidrato numa concentração final de 1% e incubados a 37°C por 24 horas.

Os carboidratos utilizados foram: manita, lactose, rafinose, dulcitol, celobiose, maltose, galactose, trealose e sorbitol. A identificação das espécies foi de acordo com SCHELEIFER, (1986).

Para o estudo da presença de coagulase utilizando plasma de coelho; produção de ácidos em aerobiose em presença de sorbitol, adonitol, dulcitol;

lipase e gelatinase, procedeu-se conforme DEVRIESE, (1979). A resistência à bacitracina foi verificada para confirmação do gênero *Staphylococcus*.

RESULTADOS

A caracterização de amostras de *Staphylococcus*, em estudo longitudinal associado com o CMT das mastites subclínicas dos animais, em que foram inicialmente identificadas como SCN, está descrita na Tabela 1, onde também estão explícitos os resultados das provas bioquímicas, fisiológicas e de sensibilidade frente à novobiocina, para espécies de *Staphylococcus* propostas por SCHLEIFER (1986).

Das amostras testadas, 116 corresponderam aos SCN, sendo 71,55% de *S. epidermidis*, 6,03% de *S. hyicus* subsp. *chromogenes* e *S. simulans*, 4,31% de *S. warneri*, 3,45% para cada uma das espécies: *S. hominis*, *S. cohnii* e *S. sciuri* e, finalmente, 1,73% de *S. haemolyticus* (Tabela 2).

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Os variados quadros de mastite subclínica causados por SCN, são, em alguns casos, de caráter acentuado; em outros, brandos. A dificuldade de diferenciar os SCN da única espécie, *S. epidermidis*, até então considerada como o único *Staphylococcus* coagulase negativo envolvido em casos de mastite, tem motivado o desenvolvimento de estudos para melhor caracterizar as espécies que apresentam semelhanças fisiológicas entre si.

A espécie mais freqüentemente isolada foi o *S. epidermidis*, seguida de *S. hyicus* subsp. *chromogenes*, *S. simulans*, *S. warneri*, *S. hominis*, *S. cohnii*, *S. sciuri* e *S. haemolyticus*, concordando com as observações de DEVRIESE (1979).

DEVRIESE (1979) utilizou a celobiose para diferenciar os *S. xilosus* negativos dos *S. sciuri* positivos. Os resultados para as quatro amostras de *S. sciuri* isoladas foram positivos.

Pelos dados da Tabela 1, observaram-se cepas de *S. haemolyticus* e *S. sciuri* negativas para urease, concordando com DEVRIESE (1984), que também verificou resultados negativos para todas as cepas de *S. sciuri*, e de grande variação, em relação ao teste, para as cepas de *S. haemolyticus*.

Para DEVRIESE (1979), a atividade de fosfatase é típica de *S. haemolyticus* e *S. simulans*. Foi verificado que as duas cepas de *S. haemolyticus* encontradas foram fosfatases negativas.

Tabela 1. Percentuais de amostras positivas nas provas bioquímicas e fisiológicas frente a antimicrobianos, de espécies de *Staphylococcus* coagulase negativos.

Provas Realizadas	Espécies * \ N° de amostras							
	1	2	3	4	5	6	7	8
PIGMENTOS	0	0	100	100	100	0	0	100
HEMÓLISE	0	0	0	0	0	100	0	100
GLICOSE	100	100	100	100	100	100	100	100
ACETOÍNA	100	100	0	100	100	0	100	0
COAGULASE	0	0	0	0	0	0	0	0
MALTOSE	100	0	71,4	100	0	75	100	0
MANITA	62,6	57,1	100	0	0	100	0	0
GALACTOSE	100	100	100	100	75	0	100	0
TREALOSE	0	100	100	100	75	0	100	100
SORBITOL	0	0	0	0	0	0	0	0
LACTOSE	48,2	100	100	0	75	0	0	100
RAFINOSE	0	0	0	0	0	0	0	0
DULCITOL	0	0	0	0	0	0	100	0
CELOBIOSE	0	0	0	0	0	0	100	0
ADONITOL	0	0	0	0	0	0	0	0
SUCROSE	100	100	100	100	100	0	100	100
XILOSE	100	0	0	0	0	0	0	0
ARABINOSE	0	0	0	0	0	0	100	0
UREASE	100	100	100	100	100	0	0	0
FOSFATASE	100	14,3	100	0	0	100	100	0
Red. NIT.**	100	100	100	0	100	0	100	100
GELATINASE	83	100	100	100	0	0	100	100
LIPASE	0	0	0	0	0	0	0	100
FIBRIN.***	0	0	0	0	0	0	0	0
DNase	0	0	0	0	0	0	100	0
TDA	13,3	0	0	60	0	0	0	0
TIO****	100	100	100	100	100	100	100	100

* 1) *S. epidermidis*; 2) *S. simulans*; 3) *S. hyicus* subsp. *chromogenes*; 4) *S. warneri*; 5) *S. hominis*; 6) *S. cohnii*; 7) *S. sciuri*; 8) *S. haemolyticus*;

** Redução de Nitratos; *** Fibrinolisinase; **** Tioglicolato.

Tabela 2. Prevalência de *Staphylococcus* coagulase negativo (SCN) isolados nas amostras de leite dos quartos mamários dos rebanhos estudados.

Espécies de <i>Staphylococcus</i>	%
<i>S. epidermidis</i>	71,55
<i>S. simulans</i>	6,03
<i>S. hyicus</i> subsp. <i>chromogenes</i>	6,03
<i>S. warneri</i>	4,31
<i>S. hominis</i>	3,45
<i>S. cohnii</i>	3,45
<i>S. sciuri</i>	3,45
<i>S. haemolyticus</i>	1,73

GARCIA et al. (1980) verificaram que somente 16,66% das cepas de *S. epidermidis* foram positivas para gelatinase. Estes resultados contrastam com os obtidos no presente trabalho, onde se verificaram 69 cepas positivas, conforme Tabela 1, correspondendo a 83,13% do total de amostras dessa espécie.

Baseando-se na caracterização das espécies de *Staphylococcus*, suas características bioquímicas, fisiológicas e de sensibilidade frente aos antibacterianos, isolados nos testes de CMT, dos quartos mamários com mastite subclínica, conclui-se que:

1. *S. hyicus* subsp *chromogenes*, *S. simulans*, *S. epidermidis*, *S. sciuri*, *S. warneri*, *S. hominis*, *S. haemolyticus* e *S. cohnii*, espécies de *Staphylococcus* coagulase negativo, foram isoladas nas amostras de leite dos bovinos.

2. Dentre as espécies de *Staphylococcus* coagulase negativo identificadas, *S. epidermidis* foi a de maior prevalência.

3. Os testes de verificação da produção de ácidos por rafinose, adonitol e sorbitol não contribuíram para a diferenciação das espécies de *Staphylococcus*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BABA, E., FUCATA, T., MATSUMOTO H. Zoological studies on coagulase negative *staphylococci* in and around the udder. **Bulletin of University of Osaka Prefecture Series B**, v. 32, p. 70-75, 1980.
- BRAMLEY, A.J. The effect of subclinical *Staphylococcus epidermidis* infection of the lactating bovine udder on its susceptibility to infection with *Staphylococcus agalactiae* or *Escherichia coli*. **British Veterinary Journal**, London, v. 134, p. 146-151, 1978.
- BIER, O. **Bacteriologia e Imunologia**. 19. ed. São Paulo: Melhoramentos, 1978, 1062 p.
- COX, H.V., NEWMAN, S.S., ROY, A.F.; et al. Species of *Staphylococcus* isolated from animal infections. **Cornell Veterinary**, Ithaca, v. 74, p. 124-135, 1984.
- CULLEN, G.A.; HERBERT, C.N. Some ecological observations on microorganisms inhabiting bovine skin, teat canals and milk. **British Veterinary Journal**, London, v. 4, p. 123, 1967.
- DEVRIESE, L.A. Identification of clumping-factor-negative *Staphylococci* isolated from cow's udders. **Research in Veterinary Science**, London, v. 27, p. 313-320, 1979.
- DEVRIESE, L.A., KEYSER, H. Prevalence of different species of coagulase negative *Staphylococci* on teats and in milk samples from dairy cows. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 47, p. 155-158, 1980.
- DEVRIESE, L.A. Simplified system for biotyping *Staphylococcus aureus* strains isolated from different animal species. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford v. 56, p. 215-220, 1984.
- FERREIRO, L. Padrões de susceptibilidade de *Staphylococcus aureus* isolados no leite em rebanhos da Califórnia USA e do Rio Grande do Sul, Brasil. **Arquivo Escola Veterinária da UFMG**, Belo Horizonte, v. 3, n. 32, p. 393-406, 1980.
- GARCIA, M.L., MORENO, B., BERGDOLL, M.S. Characterization of *Staphylococci* isolated from mastitic cows in Spain. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 3, p. 548-553, 1980.
- HARVEY, J., GILMOUR, A. Application of current methods for isolation and identification of *Staphylococci* in raw bovine milk. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 59, p.207-221, 1985.
- KLOOS, W.E., SCHEIFER, H.K. Genus IV. *Staphylococcus*. In: Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Scharpe, M.E. et al. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, Baltimore: Williams & Wilkins, p. 1013-1035, 1986.
- KLOOS, W.E. Systematics and the natural history of *Staphylococci*. 1. **Journal of Applied Bacteriology Supplement**, Oxford, v. 69, p. 25-37, 1990.
- LANGENEGGER, J., VIANE, M.C.E., BAHIA, M.G. Efeito do agente etiológico da mastite subclínica sobre a produção de leite. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 2, p. 47-52, 1981.
- OLIVEIRA, V.M. de **Avaliação técnico-econômica do controle da mamite bovina**. Belo Horizonte, MG., 1989. 65 p. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária) - Curso de Pós Graduação em Medicina Veterinária, Escola de Veterinária da UFMG, 1989.
- SCHALM, O.W., NOORLANDER, D.D. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. **Journal American Veterinary Medicine Research**, Schaumburg, v. 130, p. 199-204, 1957.
- SCHLEIFER, K.H. The family *Micrococcaceae*. In: SNEAT, P.H.A., MAIR, N., HOLT, T.G. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Willians & Wilkins, 1986. v. 2. p. 1003.
- SUBCOMITTEE ON TAXONOMY OF *STAPHYLOCOCCI* AND *MICROCOCCI* International Committee on Nomenclature of bacteria. Minutes of first meeting. Institute Bull. **Bacteriological Nomenclature Taxonomy**, v. 15, p. 107-108, 1965.
- WARD, G.E., MALD, J.E., LYON, R.H. Mannitol agar for microbiology diagnosis of bovine mastitis. **Journal American Veterinary Medical Association**, Chicago, v. 178, p. 1061-1064, 1981.
- WATTS J.L., NICKERSON, S.C.A. Comparison of the STAPH-ident and STAPH-Trac systems to conventional methods in the identification of *Staphylococci* isolated from bovine udders. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 12, p. 179-187, 1986
- WATTS, J.L., PANKEY, W., NICKERSON, S.C. Evaluation of the Staphase systems for identification of *staphylococci* from bovine intramammary infections. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 9, p. 448-452, 1984.
- WATTS, J.L. Etiological agents of bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 16, p. 1-66, 1988.