



**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE STAPHYLOCOCCUS COAGULASE  
NEGATIVOS ISOLADOS DE MASTITE BOVINA**  
**Phenotypic characterization of coagulase negative staphylococci isolated from  
bovine mastitis**

Carla Christine LANGE<sup>1</sup>  
Maria Aparecida Vasconcelos P. BRITO<sup>1</sup>  
Fabiana Santos da SILVA<sup>2</sup>  
Mariana Caroline Tocantins ALVIM<sup>3</sup>

**1. Introdução**

Bactérias do gênero *Staphylococcus* estão entre os principais agentes etiológicos da mastite bovina. Entre as espécies mais frequentemente isoladas, *S. aureus* é um patógeno primário, responsável por infecções clínicas e subclínicas e altas contagens de células somáticas (CCS) no leite (NMC, 2004). As demais espécies de *Staphylococcus*, em sua maioria não produtoras de coagulase, compreendem cerca de 40 espécies e subespécies (BANNERMAN, 2003). A presença de *Staphylococcus* coagulase negativos (SCN) na glândula mamária está, geralmente, associada a quadros moderados de inflamação. Entretanto, em rebanhos com baixa CCS essas bactérias contribuem para o aumento da CCS do leite total do rebanho (SCHUKKEN et al., 2009).

O desenvolvimento de diferentes técnicas de biologia molecular viabilizou a busca de métodos mais eficazes de identificação e caracterização de microrganismos. O sequenciamento do gene do 16S RNA ribossomal tem sido extensivamente usado com finalidade taxonômica e filogenética. Em estudo recente conduzido por Lange et al. (2011a), espécies de *Staphylococcus* isoladas de mastite bovina foram identificadas com sucesso pelo sequenciamento do rDNA 16S. Os estudos foram ampliados, culminando com a identificação de seis espécies de *Staphylococcus* de mastite pelo sequenciamento do rDNA 16S, além de *S. aureus* (LANGE et al., 2011b). Como o sequenciamento de ácidos nucleicos é uma técnica restrita a alguns laboratórios, o objetivo deste estudo foi testar um esquema

<sup>1</sup>Pesquisador, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora/MG

<sup>2</sup>Estudante do Curso de Biologia do Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora (CES-JF)

<sup>3</sup>Bióloga, Mestranda da Universidade Federal de Viçosa

simplificado de caracterização fenotípica para a identificação destas seis espécies de SCN, que pudesse ser utilizado na rotina de diagnóstico da mastite bovina.

## 2. Material e métodos

### 2.1. Isolados bacterianos

Foram analisados 70 *Staphylococcus* spp. coagulase negativos isolados de quartos mamários individuais de fêmeas bovinas oriundas de rebanhos localizados na Zona da Mata de Minas Gerais. As bactérias foram identificadas em espécies em estudo anterior (LANGE et al., 2011b) pelo sequenciamento parcial do gene rDNA 16S: *S. chromogenes* (n=31), *S. sciuri* (n=11), *S. haemolyticus* (n=7), *S. epidermidis* (n=7), *S. simulans* (n=7) e *S. hyicus* (n=7).

### 2.2. Caracterização fenotípica

As seguintes características fenotípicas dos isolados foram analisadas: aparência da colônia, presença de hemólise, produção de coagulase em tubo, resistência à novobiocina, presença de hemólise sinérgica com *S. intermedius* (CAMP), produção de acetoina (teste de Voges-Proskauer – VP) e de desoxirribonuclease (DNase), utilização de trealose e manitol e presença de citocromo-oxidase. Os testes foram realizados de acordo com Thorberg e Brändström (2000) e Bannerman (2003). Cepas-padrão da American Type Culture Collection (ATCC) foram usadas como controles positivos e negativos dos testes.

## 3. Resultados e discussão

Os resultados dos testes fenotípicos realizados com os 70 isolados de SCN estão resumidos na Tabela 1. *S. chromogenes* apresentou colônias de coloração creme ou amarelada, muitas vezes com aspecto mucóide. A maioria dos isolados produziu DNase. *S. sciuri* apresentou colônias brancas ou amarelas, estas últimas com aspecto mucóide. Todos os isolados apresentaram resistência à novobiocina e quatro isolados apresentaram reação positiva no teste da oxidase. A resistência à novobiocina diferenciou *S. sciuri* das outras cinco espécies analisadas neste estudo.

*S. haemolyticus* apresentou colônias com coloração creme ou amarela e hemólise fraca. A maioria dos isolados produziu acetoina e todos produziram



DNase. *S. epidermidis* apresentou colônias pequenas, brancas ou acinzentadas. A maioria dos isolados produziu acetoina. *S. simulans* apresentou colônias brancas e a maioria dos isolados utilizou manitol e trealose. *S. hyicus* apresentou colônias grandes e brancas. A maioria dos isolados produziu DNase e três isolados foram coagulase positivos, sendo este último um resultado esperado, por se tratar de uma espécie coagulase-variável (TAPONEN et al., 2012).

Embora o fator CAMP com *S. intermedius* tenha sido observado em alguns isolados, os resultados não foram considerados na análise final porque a bactéria-padrão não apresentou beta-hemólise. As características analisadas neste estudo podem sugerir a identidade do isolado, mas não fornecem uma identificação definitiva do mesmo.

**Tabela 1** - Características fenotípicas analisadas em 70 isolados de *Staphylococcus* coagulase negativos de mastite bovina

| Identificação*         | Nº | Hem          | Coag         | VP           | CAMP         | Man          | Tre          | DNase        | Oxi          | Novo         |
|------------------------|----|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| <i>S. chromogenes</i>  | 31 | -<br>(31/31) | -<br>(31/31) | -<br>(30/31) | -<br>(26/31) | -<br>(26/31) | -<br>(25/31) | +<br>(29/31) | -<br>(31/31) | S<br>(31/31) |
| <i>S. sciuri</i>       | 11 | -<br>(11/11) | -<br>(11/11) | -<br>(11/11) | -<br>(11/11) | -<br>(11/11) | -<br>(11/11) | -<br>(7/11)  | +<br>(4/11)  | R<br>(11/11) |
| <i>S. haemolyticus</i> | 7  | +<br>(7/7)   | -<br>(7/7)   | +<br>(6/7)   | +<br>(6/7)   | -<br>(7/7)   | -<br>(6/7)   | +<br>(7/7)   | -<br>(7/7)   | S<br>(7/7)   |
| <i>S. epidermidis</i>  | 7  | -<br>(7/7)   | -<br>(7/7)   | +<br>(6/7)   | -<br>(4/7)   | -<br>(7/7)   | -<br>(7/7)   | -<br>(6/7)   | -<br>(7/7)   | S<br>(7/7)   |
| <i>S. simulans</i>     | 7  | -<br>(7/7)   | -<br>(7/7)   | -<br>(6/7)   | -<br>(5/7)   | +<br>(4/7)   | +<br>(7/7)   | -<br>(5/7)   | -<br>(7/7)   | S<br>(7/7)   |
| <i>S. hyicus</i>       | 7  | -<br>(7/7)   | -<br>(4/7)   | -<br>(6/7)   | -<br>(7/7)   | -<br>(6/7)   | -<br>(5/7)   | +<br>(6/7)   | -<br>(7/7)   | S<br>(7/7)   |
| Total:                 | 70 |              |              |              |              |              |              |              |              |              |

\* Por sequenciamento do rDNA 16S (Lange et al., 2011b). – reação negativa; + reação positiva; Hem-hemólise; Coag-coagulase; VP-produção de acetoina; CAMP-hemólise sinérgica com *S. intermedius*; Man-manitol; Tre-trealose; DNase-desoxirribonuclease; Oxi-oxidase; Novo-novobiocina

#### 4. Conclusões

As características fenotípicas analisadas não foram suficientes para a identificação das seis espécies de *Staphylococcus* coagulase negativas isoladas de mastite bovina, podendo apenas auxiliar na identificação de isolados destas espécies.

## Agradecimentos

À Embrapa e Fapemig pelo apoio financeiro (MP 01.09.01.003.05.02 e CVZ APQ 00165/11). Ao CNPq, pela bolsa PIBIC concedida à Fabiana Santos da Silva.

## ABSTRACT

Phenotypic characteristics of 70 coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis were analyzed. These characteristics were colonial appearance, presence of hemolysis, coagulase and acetoin production, DNase activity, CAMP reaction with *S. intermedius*, acid production from mannitol and trehalose, presence of the cytochrome oxidase system and sensitivity to novobiocin. The phenotypic characteristics analyzed were not sufficient to identify the six species of coagulase-negative *Staphylococcus*. They can however help in the identification of isolates of these species.

## Referências bibliográficas

BANNERMAN, T.L. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; JORGENSEN, J.H.; PFALLER, M.A.; YOLKEN, R.H. (Ed.). **Manual of Clinical Microbiology**. 8.ed. Washington: ASM, 2003. p.384-404.

LANGE, C.C.; BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; ARCURI, E.F.; SOUZA, G.N.; MACHADO, M.A.; DOMINGUES, R.; SALIMENA, A.P.S. Uso de PCR e sequenciamento do rDNA 16S para identificação de bactérias do gênero *Staphylococcus* isoladas de mastite bovina. **Pesq. Vet. Bras.**, v.31, p.36-40, 2011a.

LANGE, C.C.; BRITO, M.A.V.P.; SILVA, F.S.; ALVIM, M.C.T.; REIS, D.R.L.; DOMINGUES, R. Identificação de estafilococos coagulase negativos isolados de mastite bovina por sequenciamento do rDNA 16S. Anais do 26. Congresso Brasileiro de Microbiologia., 2011b.

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

SCHUKKEN, Y.H.; GONZÁLEZ, R.N.; TIKOFSKY, L.L.; SCHULTE, H.F.; SANTISTEBAN, C.G.; WELCOME, F.L.; BENNETT, G.J.; ZURAKOWSKI, M.J.; ZADOKS, R.N. CNS mastitis: Nothing to worry about? **Vet. Microbiol.**, v.134, p.9-14, 2009.

TAPONEN, S.; SUPRÉ, K.; PIESSENS, V.; VAN COILLIE, E.; DE VliegHER, S.; KOORT, J.M.K. *Staphylococcus agnetis* sp. nov., a coagulase-variable species from bovine subclinical and mild clinical mastitis. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** v.62, p.162-165, 2012.

THORBERG, B.-M.; BRÄNDSTRÖM, B. Evaluation of two commercial systems and a new identification scheme based on solid substrates for identifying coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis. **J. Vet. Med. B**, v.47, p.683-691, 2000.





ISSN 2176-0810

**Anais do  
29º Congresso Nacional de Laticínios**

**16 a 19 de Julho de 2012**  
Juiz de Fora - Minas Gerais



AGRICULTURA,  
PECUÁRIA E  
ABASTECIMENTO

