

OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO DE ESTAFILOCOCOS COAGULASE NEGATIVOS EM MASTITE SUBCLÍNICA BOVINA NO NORTE DO PARANÁ, BRASIL^a

VANERLI BELOTI^b
ERNST ECKEHARDT MULLER^c
JANE MEGID^c
LINDOLFO COELHO ROCHA^d
ELENA METTIFOGO^e
JULIO CESAR DE FREITAS^c

BELOTI, V.; MULLER, E.E.; MEGID, J.; ROCHA, L.C.; METTIFOGO, E.; FREITAS, J.C. — Ocorrência e caracterização de Estafilococos coagulase negativos em mastite subclínica bovina no Norte do Paraná, Brasil.

RESUMO

Foram examinadas 493 vacas da raça holandesa através do "California Mastitis Test" (CMT) na região Norte do Paraná, com o objetivo de estudar a ocorrência de estafilococos coagulase negativos em mastite subclínica bovina. Destas, 150 (30,4%) foram positivas em um ou mais quartos, perfazendo um total de 225 amostras de leite. Em 98 (43,5%) das culturas foram isolados estafilococos sendo 40 (40,8%) coagulase negativos. Do total de animais pesquisados 37 (7,5%) apresentaram estafilococos coagulase negativos. Nas provas bioquímicas convencionais e pelo API Staph System foram identificados a nível de espécie 29 (72,5%) e 30 (75,0%) culturas respectivamente. Pelos dois esquemas houve uma predominância de *S. hyicus*, *S. chromogenes* e *S. epidermidis*.

PALAVRAS-CHAVE: Mastite; Estafilococos; Leite

1 - INTRODUÇÃO

A mastite ocorre sob duas formas principais: clínica e subclínica. A doença subclínica é a mais comum, chegando a 97% dos casos (Ahl et al, 1989) reduzindo progressivamente a produção de leite, alterando a sua composição química bem como diminuindo a vida produtiva da vaca (Langenegger et al, 1981). Nos EUA, Seykora & Mc Daniel (1985) estimam as perdas anuais pela mastite em 2 bilhões de dólares e Miller & Dorn (1987) calculam os custos da doença em 187,13 dólares por vaca/ano.

A ocorrência da mastite em várias bacias leiteiras do Brasil foi estudada entre outros por Langenegger et al (1970); Harrop et al (1975); Müller et al (1978) e Nader et al (1983, 1984). Em relação aos agentes etiológicos já foram relacionados cerca de 43 microrganismos pertencentes a 25 gêneros, predominando o *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* (Santos & Moreira, 1977; Mac Donald, 1979; Nader et al, 1984 e Langenegger et al, 1986). Em trabalhos mais recentes vem sendo encontrado um número cada vez mais significativo de estafilococos coagulase negativos, predominando o *S. epidermidis*, *S. hyicus*, *S. sciuri*, *S. simulans*, *S. xylosus* e *S. haemolyticus* (Hodges et al, 1984; Langlois et al, 1984; Watts et al, 1984; Rather et al, 1986 e Watts & Owens, 1987).

Com o número crescente de novas espécies a identificação das mesmas na rotina laboratorial vem sendo dificultada.

Os esquemas de Schleifer & Kloos (1975); Kloos & Schleifer (1975); Kloos et al (1976) e Devriese et al (1978) normalmente utilizados requerem grandes quantidades de meios de cultura, são demorados e dispendiosos, limitando-os na prática. Sistemas de testes bioquímicos miniaturizados foram desenvolvidos para uma rápida identificação das diferentes espécies de estafilococos (API Staph System, API Staph Ident e DMS Staph Trac System).

Este trabalho tem por objetivo verificar a ocorrência de estafilococos coagulase negativos nas mastites subclínicas e identificar as espécies mais comuns.

2 - MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram examinadas 493 vacas da raça holandesa em diferentes propriedades da região Norte do Paraná.

Deteção das mastites subclínicas

O diagnóstico presuntivo da mastite subclínica na propriedade foi realizado através do "California Mastitis Test (CMT)", segundo Schalm & Noorlander (1957).

Colheita das amostras

Dos quartos positivos ao CMT, foram colhidas amostras de leite em tubos estéreis com tampa de rosca. A colheita foi precedida de rigorosa anti-sepsia dos tetos com

a - Pesquisa financiada pelo CONCITEC e Coordenadoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Estadual de Londrina.

b - Aluna do Curso de Mestrado em Microbiologia - Centro de Ciências Biológicas e Docente do Departamento de Medicina Veterinária Prev. Patol. Animal e Zootecnia - CCA/Universidade Estadual de Londrina.

c - Departamento de Med. Vet. Prev. Patol. Anim. Zootecnia - CCA/Universidade Estadual de Londrina.

d - Bolsista do CNPq.

e - Acadêmica Curso de Especialização - Sanidade Animal - CCA/Universidade Estadual de Londrina.

álcool iodado (Langenegger et al, 1981). As amostras foram transportadas ao laboratório acondicionadas em recipientes com gelo.

Isolamento e identificação

As amostras de leite foram semeadas em placas de ágar sangue ovino (AS) e incubadas por 24 hs a 37°C, sendo a identificação da família *Micrococcaceae* realizada através das características morfológicas e tintoriais das colônias e pela prova da catalase (Blobel & Schliesser, 1980).

A diferenciação entre os gêneros *Staphylococcus* e *Micrococcus* foi realizada pela prova da lisostafina segundo Lachica et al (1971).

As amostras identificadas como estafilococos foram testadas quanto à produção de coagulase (Meyer, 1966) e as negativas identificadas bioquimicamente através de:

a) Provas convencionais segundo Schleifer & Kloos (1975); Kloos & Schleifer (1975); Kloos et al (1976) e Schleifer et al (1983) para a identificação de *S. epidermidis*, *S. cohnii*, *S. haemolyticus*, *S. xylosum*, *S. warneri*, *S. capitis*, *S. hominis*, *S. simulans*, *S. sciuri* e *S. lentus* e ainda Devriese et al (1978, 1985) para o *S. hyicus* e *S. chromogenes*: hemólise em sangue ovino, oxidase, "Clumping-Factor", redução do nitrato, fosfatase alcalina, utilização aeróbica de celobiose, melezitose, salicina, xilose, rafinose, sacarose, trealose, frutose, sorbitol, manose, lactose, ramnose, maltose, galactose, manitol, melibiose, inositol, ribitol, arabinose, dulcitol, glicose anaeróbica e crescimento anaeróbico em tioglicolato.

b) API Staph (API System - Montalieu, Vercieu, France), constituído pelos seguintes testes: utilização de glicose, frutose, manose, maltose, lactose, trealose, manitol, xilitol, melibiose, rafinose, xilose, sacarose, alfa-metilglicosamida, N-acetilglucosamina, redução do nitrato, produção de acetil-metilcarbinol, fosfatase alcalina, arginina desidrolase e urease. O inóculo, tempo de incubação e a leitura foram realizadas segundo as recomendações do fabricante.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 493 vacas pesquisadas pelo CMT, 150 (30,4%) apresentaram resultado positivo em um ou mais quartos, perfazendo um total de 225 amostras de leite. Deste total foram isolados estafilococos em 98 (43,5%) amostras, sendo 58 (59,2%) coagulase positivos e 40 (40,8%) coagulase negativos. Em relação ao total de animais examinados 37 (7,50%) apresentaram estafilococos coagulase negativos em um ou mais quartos.

Erskine et al (1986), examinando 690 animais isolaram estafilococos coagulase negativos em 24,9% das vacas com alta contagem de células somáticas. Rather et al

(1986) identificaram em 142 amostras de leite 84 (59,2%) estafilococos sendo 23 (27,4%) *S. aureus* e 61 (72,6%) de coagulase negativos.

Pelas provas bioquímicas convencionais foi possível identificar 29 (72,5%) das 40 amostras de estafilococos coagulase negativos estudadas, sendo 10 (25,0%) amostras de *S. hyicus*, 06 (15,0%) *S. chromogenes*, 06 (15,0%) *S. epidermidis*, 02 (5,0%) *S. simulans*, 02 (5,0%) *S. warneri*, 01 (2,5%) *S. xylosum*, 01 (2,5%) *S. cohnii* e 01 (2,5%) *S. hominis*. Em 05 (12,5%) amostras não foi possível uma diferenciação conclusiva entre *S. warneri* e *S. haemolyticus* (tabela 1).

Pelo API Staph, basicamente desenvolvido para caracterizar amostras de origem humana (Brun et al, 1978 e Commell, 1980), foram identificadas 30 (75,0%) das 40 amostras: 09 (22,5%) *S. hyicus*, 06 (15,0%) *S. epidermidis*, 03 (7,5%) *S. chromogenes*, 03 (7,5%) *S. xylosum*, 03 (7,5%) *S. haemolyticus*, 02 (5,0%) *S. capitis*, 01 (2,5%) *S. cohnii*, 01 (2,5%) *S. warneri*, 01 (2,5%) *S. sciuri* e 01 (2,5%) *S. simulans* (Tabela 1).

Podemos observar que neste trabalho a identificação das espécies *S. hyicus* e *S. epidermidis* foi mais precisa tanto pelo sistema convencional quanto pelo API Staph. Neste estudo observamos que em 21 (52,5%) amostras houve concordância na identificação pelos dois sistemas, sendo de 100% para o *S. epidermidis* e de 90,0% para o *S. hyicus* (Tabela 1).

Apesar da dificuldade de caracterizar bioquimicamente as espécies de estafilococos coagulase negativos isolados de infecções intramamárias, os resultados obtidos se aproximam aos encontrados na literatura. Hodges et al (1984) analisaram 63 amostras de estafilococos coagulase negativos pelo sistema de Kloos e Schleifer e encontraram 19 (30,1%) *S. hyicus*, 17 (26,9%) *S. haemolyticus*, 04 (6,3%) *S. epidermidis*, 03 (4,7%) *S. hominis*, 01 (1,5%) *S. capitis* e 19 (30,1%) culturas não foram classificadas pelo sistema de identificação utilizado. Langlois et al (1984) examinaram 581 estafilococos e identificaram 131 (22,5%) *S. aureus*, 24 (4,1%) *S. epidermidis*, 230 (39,5%) *S. hyicus*, 66 (11,3%) *S. simulans*, 45 (7,7%) *S. hominis*, 23 (3,9%) *S. xylosum* e 14 (2,4%) *S. warneri* entre outros. Watts et al (1984) examinando 54 culturas de estafilococos coagulase negativos identificaram 10 (18,5%) *S. chromogenes*, 10 (18,5%) *S. simulans*, 09 (16,6%) *S. hyicus*, 07 (12,9%) *S. epidermidis*, 06 (11,1%) *S. warneri*, 05 (9,2%) *S. haemolyticus*, 03 (5,5%) *S. xylosum*, 01 (1,8%) *S. cohnii* e 03 (5,5%) não classificadas. Watts & Owens (1987) trabalhando com 353 amostras de coagulase negativos, identificaram em 82,1% *S. epidermidis*, *S. hyicus* e *S. chromogenes*.

Os resultados obtidos mostram a importância dos estafilococos coagulase negativos na mastite subclínica bovina e confirmam a dificuldade de identificação a nível de espécie na rotina laboratorial.

TABELA 1 – IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DE 40 AMOSTRAS DE ESTAFILOCOCOS COAGULASE NEGATIVOS ISOLADOS DE MASTITE SUBCLÍNICA BOVINA

Espécies	Esquema de Identificação				Espécies igualmente identificadas pelo API Staph * e provas convencionais **	
	API Staph *		Provas convencionais **		Nº	%
	Nº	%	Nº	%		
<i>S. epidermidis</i>	6	15,00	6	15,00	6	100
<i>S. simulans</i>	1	2,50	2	5,00	1	50,00
<i>S. xyloso</i>	3	7,50	1	2,50	1	33,33
<i>S. cohnii</i>	1	2,50	1	2,50	0	0,00
<i>S. warneri</i>	1	2,50	2	5,00	0	0,00
<i>S. haemolyticus</i>	3	7,50	0	0,00	0	0,00
<i>S. hominis</i>	0	0,00	1	2,50	0	0,00
<i>S. capitis</i>	2	5,00	0	0,00	0	0,00
<i>S. hyicus</i>	9	22,50	10	25,00	9	90,00
<i>S. chromogenes</i>	3	7,50	6	15,00	2	33,33
<i>S. sciuri</i>	1	2,50	0	0,00	0	0,00
<i>S. warneri/S. haemolyticus</i> ***	0	0,00	5	12,50	0	0,00
Não identificáveis	10	25,00	6	15,00	2	20,00
TOTAL	40	100	40	100	21	52,50

* API System – Montalieu, Vercieu, France

** Segundo Schleifer & Kloos (1975); Kloos & Schleifer (1975); Kloos et al (1976); Schleifer et al (1983) e Devriese et al (1978 e 1985)

*** Amostras não diferenciadas conclusivamente.

BELOTI, V.; MULLER, E.E.; MEGID, J.; ROCHA, L.C.; METTIFOGO, E.; FREITAS, J.C. – Occurrence and characterization of coagulase - negative staphylococci from subclinical mastitis in dairy cattle, Paraná, Brazil.

SUMMARY

A total of 493 hollanders cows were examined through California Mastitis Test (CMT) in the North region of Paraná, with target of studying the occurrence of coagulase negative staphylococci on subclinical bovine mastitis. From these ones, 150 (30.4%) were positives in one or more quarters, making up a total of 225 milk samples. In 98 (43.5%) cultures, were isolated staphylococci, being 40 (40.8%) coagulase negative. From the total of animals, 37 (7.5%) showed staphylococci coagulase negative. In the biochemical conventional proves and by API Staph System were identified, in a species level, 29 (72.5%) and 30 (75.0%) cultures respectively. In both of the schemes there was a predominance of *S. hyicus*, *S. chromogenes* and *S. epidermidis*.

KEY-WORDS: Mastitis; Staphylococci; Milk

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - AHL, A.S.; GIBSON, C.D.; KIRK, J.H.; KANEENE, J.B.; AHL, J.G. Cost of mastitis and its prevention in four dairy cattle herds on St. Croix, US Virgin Islands. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* v. 194, n. 10, p. 1418-1421. 1989.
- 2 - BLOBEL, H. & SCHLISSER, T. *Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren*. Veb Gustav Fischer Verlag - Jena 756 p. 1980.
- 3 - BRUN, Y.; FLEURETTE, J. & FOREY, F. Micromethod for biochemical identification of coagulase-negative staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* v. 8, n. 5, p. 503-508. 1978.
- 4 - DEVRIESE, L.A.; HAJEK, V.; OEDING, P.; MEYER, S.R. & SCHLEIFER, K.H. *Staphylococcus hyicus* (Sompolinsky, 1953) comb. nov. and *Staphylococcus hyicus* subsp. *chromogenes* subsp. nov. *Int. J. System. Bacteriol.* v. 28, n. 4, p. 482-490. 1978.
- 5 - DEVRIESE, L.A.; SCHLEIFER, K.H. & ADEGOKE, G.O. Identification of coagulase-negative staphylococci from farm animals. *J. Appl. Bacteriol.* v. 58, p. 45-55. 1985.
- 6 - ERSKINE, R.J.; EBERHART, R.J.; HUTCHINSON, L.J.; SPENCER, S.B. & CAMPBELL, M.A. Incidence and types of clinical mastitis in dairy herds with high and low somatic cell counts. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* v. 192, n. 6, p. 761-765. 1988.
- 7 - GEMMELL, C.G. & DAWSON, J.E. Identification of

- coagulase-negative staphylococci with the API Staph System. *J. Clin. Microbiol.* v. 16, n. 5, p. 874-877. 1982.
- 8 - HARROP, M.H.V.; PEREIRA, L.J.V.; BRITO, J.R.F.; MELO, A.M.B. Incidência de mastite bovina na bacia leiteira na zona de Agreste Meridional de Pernambuco. *Pesquisa Agropecuária Brasileira, Serv. Vet.* v. 10, p. 65-67. 1975.
- 9 - HODGES, R.T.; JONES, Y.S. & HOLLAND, J.T.S. Characterization of staphylococci associated with clinical and subclinical bovine mastitis. *N.Z. Vet. J.* v. 32, p. 141-145. 1984.
- 10 - KLOOS, W.E. & SCHLEIFER, K.H. Isolation and characterization of staphylococci from human skin. II. Descriptions of four new species: *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus hominis* and *Staphylococcus simulans*. *Int. J. System. Bacteriol.* v. 25, n. 1, p. 62-79. 1975.
- 11 - KLOOS, W.E.; SCHLEIFER, K.H. & SMITH, R.F. Characterization of *Staphylococcus sciuri* sp. nov. and its subspecies. *Int. J. System. Bacteriol.* v. 26, n. 1, p. 22-37. 1976.
- 12 - LACHICA, R.V.F.; HOEPRICH, P.D. & GENIGEORGIS, C. Nuclease production and lysostaphin susceptibility of *Staphylococcus aureus* and other catalase-positive cocci. *Appl. Microbiol.* v. 21, p. 823-826. 1971.
- 13 - LANGENEGGER, J.; COELHO, N.M.; LANGENEGGER, G.H. & CASTRO, R.P. Estudo da incidência de mastite bovina na bacia leiteira do Rio de Janeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira, Serv. Vet.* v. 8, p. 49-52. 1970.
- 14 - LANGENEGGER, J.; VIANI, M.C.E. & BAHIA, M.G. Efeito do agente etiológico da mastite subclínica sobre a produção de leite. *Pesq. Vet. Bras.* v. 1, n. 2, p. 47-52. 1981.
- 15 - LANGENEGGER, J.; FIGUEIREDO, H.P. & REZENDE, E.F. Eficácia terapêutica do cefacefrile frente aos microrganismos dos gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus* isolados de mastite subclínicas. *A hora veterinária.* v. 30, p. 24-27. 1986.
- 16 - LANGLOIS, R.; HARMON, J.P. & AKERS, K. Biochemical identification of *Staphylococcus* species of bovine origin. *J. Dairy Sci.* v. 67, n. 1, p. 177. 1984.
- 17 - McDONALD, J.S. Bovine mastitis: Introductory remarks. *J. Dairy Sci.* v. 62, p. 117-118. 1979.
- 18 - MEYER, W. Über die Brauchbarkeit des Koagulase testes mit verschiedenen Plasmaarten zur Differenzierung von *Staphylococcus aureus* Stämmen. *Zbl. Bakt., I. Abt., Orig.* v. 209, p. 465-81. 1966.
- 19 - MILLER, G.Y. & DORN, C.R. An economic summary of the National Animal Health Monitoring System data in Ohio, 1986-87, in Proceedings. *91st Annu Meet VS Anim. Health Assoc.* p. 154-172. 1987.
- 20 - MULLER, E.E.; HUMMING NETO, O.; SOUZA Jr., J.M.; MARQUES, F.A.C.; MACUCO, A.L.; GIACOMETTI, W.D. Estudo da prevalência de mastite bovina. *Semina.* v. 1, n. 1, p. 47-48. 1978.
- 21 - NADER FILHO, A.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P. & ROSSI, Jr., O.D. Mastite subclínica em rebanhos produtores de leite tipo B. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.* v. 35, n. 5, p. 621-630. 1983.
- 22 - NADER FILHO, A.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P. & ROSSI, Jr., O.D. Mastite subclínica em rebanhos produtores de leite gordura 3,2. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.* v. 36, n. 5, p. 549-558. 1984.
- 23 - RATHER, P.N.; DAVIS, A.P. & WILKINSON, B.J. Slime production by bovine milk *Staphylococcus aureus* and identification of coagulase negative staphylococcal isolates. *J. Clin. Microbiol.* v. 23, n. 5, p. 858-862. 1986.
- 24 - SANTOS, E.C. & MOREIRA, H.H. Influência de mastite induzida por enterotoxina estafilocócica na produção de leite bovino. *Arqs. Esc. Vet. UFMG.* v. 29, n.1, p. 181-187. 1977.
- 25 - SCHALM, O.W. & NOORLANDER, D.O. Experiments and observation leading to development of the California Mastitis Test. *J. Am. Vet. Assoc.* v. 130, p. 199-204. 1957.
- 26 - SCHLEIFER, K.H. & KLOOS, W.E. Isolation and characterization of staphylococci from human skin. I. Amented descriptions of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* and descriptions of three new species: *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus xylosum*. *Int. J. System. Bacteriol.* v. 25, n. 1, p. 50-61. 1975.
- 27 - SCHLEIFER, K.H.; GEYER, V.; KILPPER-BALZ, R. & DEVRIESE, L.A. Elevation of *Staphylococcus sciuri* subsp *lentus* (Kloos et al) to species status: *Staphylococcus lentus* (Kloos et al), comb. nov. *System. Appl. Microbiol.* v. 4, p. 382-387. 1983.
- 28 - SEYKORA, A.J. & McDANIEL, B.T. Udder and teat morphology related to mastitis resistance; a review. *J. Dairy Sci.* v. 68, p. 2087-2093. 1985.
- 29 - WATTS, J.L.; PANKEY, J.W. & NICKERSON, S.C. Evaluation of the Staph-Ident and STAPHase Systems for identification of staphylococci from bovine intramammary infections. *J. Clin. Microbiol.* v. 20, n. 3, p. 448-452. 1984.
- 30 - WATTS, J.L. & OWENS, W.E. Synergistic hemolysis associated with coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mammary glands. *J. Clin. Microbiol.* v. 25, n. 11, p. 2037-2039. 1987.

Recebido para publicação em 20/2/1991.

End. correspondência:
Departamento de Medicina Veterinária Prev. Patol. Anim. e Zootecnia - CCA/Universidade Estadual de Londrina.