

Staphylococcus aureus e bastonetes Gram negativos isolados de leite de vacas com mastite clínica e subclínica

Danilo de Carvalho, Vera Lúcia Mores Rall

Introdução

A mastite é uma inflamação da glândula mamária, geralmente causada por infecção bacteriana, causando grandes perdas econômicas na bovinocultura leiteira, devido à redução na produção de leite e de sua qualidade, aumento do uso de medicamentos e morte dos animais (MELCHIOR et al., 2006). É a causa mais freqüente de terapia antimicrobiana em vacas, sendo difícil de ser erradicada, independente da susceptibilidade *in vitro* dos antibióticos utilizados, dependendo do micro-organismo envolvido (VASUDEVAN et al., 2003, CLUTTERBUCK et al., 2007)

Existem muitos micro-organismos responsáveis pela mastite bovina e os mais frequentes são *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* (MENZIES e RAMANOON, 2001).

Assim, o objetivo desse trabalho foi o isolamento de *Staphylococcus aureus* e bastonetes gram negativos (enterobactérias e não fermentadores), a partir de amostras de leite de vacas com mastite subclínica.

Materiais e Métodos

1. Obtenção das amostras de leite

As amostras foram disponibilizadas por um laboratório veterinário, localizado no município de Botucatu, SP. De cada animal diagnosticado com mastite, foi disponibilizada uma amostra de leite composta dos quatro tetos, para realização do exame microbiológico. A mastite foi diagnosticada utilizando o “California Mastitis Test” (CMT), segundo SCHALM & NOORLANDER (1957).

Foram coletadas 116 amostras de leite em frascos plásticos esterilizados e mantidos sob refrigeração até o momento da coleta

2. Isolamento e identificação de *Staphylococcus aureus* (Lancette & Bennett, 2001)

Para o isolamento de estafilococos, foi utilizado o método da semeadura em superfície, onde o volume de 0,1ml das diversas diluições da amostra foi depositado em placas de Petri com ágar Baird-Parker, suplementado com telurito de potássio e solução de gema de ovo, espalhando-se o inóculo com o auxílio de um bastão de vidro em “L”. Em seguida, as placas foram incubadas a 35°C por 48 horas. Após a incubação, foi realizada a contagem das colônias características, que apresentavam cor negra e halo. Destas, até três colônias foram repicadas para tubos com ágar tripticase soja (TSA) inclinado e incubadas por 24 horas a 35°C. No teste da produção de catalase, uma porção do crescimento foi transferida para uma lâmina de vidro, com a adição uma gota de água oxigenada 30%. Como controle positivo, foi utilizada uma cepa de *S. aureus* e como controle negativo, uma de *Streptococcus* sp. O teste positivo é revelado pela liberação de bolhas. A seguir, foi realizar o teste da coagulase em tubo, onde 0,5ml de plasma de coelho foi acrescido de um volume igual de uma cultura da cepa teste em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI), crescida por 24 horas a 35°C. Os tubos foram incubados a 35°C por até 24 horas. O teste foi considerado positivo quando ocorreu a coagulação da mistura.

A separação entre as duas espécies (*S. aureus* e *S. intermedius*) foi realizada pela prova de Voges-Proskauer (VP) (*S. aureus* positivo) e β -galactosidase.

3. Isolamento e Identificação de Bastonetes Gram Negativos

Foi transferido 0,1ml da amostra para o meio XLD e SS e espalhado com o auxílio de uma alça em L. As placas foram incubadas por 24h a 35°C. Todos os diferentes tipos de colônias foram semeados em Agar TSA, a partir do qual foram realizados testes bioquímicos, para identificação.

A partir do TSI, as cepas foram classificadas em enterobactérias ou bastonetes Gram negativos não fermentadores. As enterobactérias foram submetidas aos testes de EPM, MiLi, citrato e ,quando necessário, ao API 20E (Biomeriéux).

Os bastonetes Gram negativos não fermentadores foram identificados com o auxílio do ao API 20NE (Biomeriéux).

Resultados e discussão

Entre as 116 amostras, 38 (32,8%) foram positivas, ocorrendo *Staphylococcus aureus* em 22 (19%), *E. coli* em 11(9,5%) e *Pseudomonas aeruginosa* em 5 (4,3%).

A mastite causada por *S. aureus* foi ocorreu em maior número àquelas causadas por outras bactérias, ocorrendo em 19% das amostras analisadas. O resultado confirma estudos anteriores que apontam o *S. aureus* como o principal causador da mastite bovina. A mastite, clínica ou subclínica, causada por *S. aureus* é reconhecida como uma das principais doenças que afetam o gado leiteiro (BRAMLEY, 1992), causando perdas financeiras de, aproximadamente, 2 bilhões de dólares (VASUDEVAN et al., 2003). Em 2001, Vieira da Motta et al. encontraram 39,7% de positividade para mastite subclínica, a partir de 362 amostras de leite de vaca com mastite, no interior do estado do Rio de Janeiro. Valores semelhantes foram observados De Freitas e Magalhães (1990), no Rio de Janeiro, com 37,65% de positividade.

A *Escherichia coli* foi observada em 9,5% das amostras. A gravidade da mastite bovina por *E. coli* pode ser influenciada pela carga microbiana intramamaria (KORNALIJNSLIJPER et al., 2004; VANGROENWEGHE et al., 2004). O crescimento de *E. coli* na glândula mamária depende da capacidade das bactérias em utilizar os nutrientes disponíveis na secreção da glândula e de contornar as defesas celulares da glândula mamária, que se baseiam principalmente na fagocitose (RAINARD e RIOLLET, 2006). A infecção da glândula mamaria por *E. coli* provavelmente é resultado de contaminação fecal.

A mastite por *P. aeruginosa* não é muito comum, ocorrendo em 4,3% dos casos. Entretanto, já foram descritos surtos de mastite com manifestações clínicas graves, hiperagudas, nas primeiras semanas pós-parto. A mastite bovina por *Pseudomonas* spp. está intimamente relacionada à água

contaminada utilizada na lavagem dos tetos, dos insufladores (teteiras), da canalização do equipamento de ordenha, ou mesmo em cânulas contaminadas durante a terapia intramamária (QUINN et al., 2005; SANTOS e FONSECA, 2007). Nos casos documentados a glândula mamária apresentou-se hiperêmica, edemaciada e sensível à palpação. O leite revelou a presença de grumos, pus e estava amarelado a escurecido (RADOSTITS et al., 2007; SELA et al., 2007). Essa bactéria apresenta multirresistência aos principais grupamentos de antimicrobianos convencionais, devido a mutações que determinam linhagens resistentes às drogas derivadas do anel β -lactâmico e fluorquinolonas (Paul et al., 1997

Apesar da baixa incidência, a mastite por *P. aeruginosa* gera grande preocupação para os profissionais da área de inspeção de alimentos e de qualidade do leite, pois conceitualmente, este grupo de patógenos caracteriza-se pela multiplicação em temperaturas entre 20 a 40°C, embora sejam hábeis em multiplicar-se às temperaturas de refrigeração indicadas para o armazenamento de alimentos (abaixo de 8°C).

Mesmo não sendo identificada nos resultados a *Klebsiella pneumoniae*, já foi relatada em diferentes países em surtos graves ou em casos isolados de mastite bovina aguda ou superaguda, principalmente nas duas primeiras semanas de lactação. As infecções mamárias são frequentemente associadas com a madeira ou serradura contaminada usada no ambiente dos animais (WENZ et al, 2001; MUNOZ et al, 2006; RADOSTITS et al, 2007). As vacas que sofrem de mastite por *K. pneumoniae* podem desenvolver um prognóstico desfavorável ou perderem a capacidade de produzirem leite.

Embora a produção de biofilme não tenha sido avaliada, as três espécies isoladas podem ser altamente produtora dessa substância, podendo explicar suas prevalências nos casos de mastite, pois o biofilme protege a bactéria de antibióticos e do sistema imune.

Referências

BRADLEY, A. J. Bovine mastitis: an evolving disease. **Vet. J.**, v. 164, p. 116-128, 2002.

BRAMLEY, A.J. Mastitis. In: ANDREWS, A.H.; BLOWEY, R.W.; BOYD, H.; EDDY, R.G. (Eds.), *Bovine Medicine: Diseases and Husbandry of Cattle*. **Blackwell Scientific Publication**, Boston, p. 289–300, 1992.

CLUTTERBUCK, A.L.; WOODS, E.J.; KNOTTENBELT, D.C.; CLEGG, P.D.; Coliform Subcommittee of the Research Committee of the National Mastitis Council. Coliform mastitis - A review -. **J. Dairy Sci.**, v. 62, p. 1-22, 1979

CONTRERAS, A. et al. Prevalence and etiology of non-clinical intramammary infection in Murciano-Granadina goats. **Small Rumin. Resear.**, v.17, p. 71-78, 1995.

DESHPANDE, L., PFALLER, M.A., JONES, R.N., *In vitro* activity of ceftiofur tested against clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* including extended-spectrum beta-lactamase producing strains. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 15, p. 271–275, 2000.

HOGAN, J., SMITH, K.L. Coliform mastitis. **Vet. Res.**, v. 34, p. 507-519, 2003.

KORNALIJNSLIJPER, J.E., DAEMEN, A.J.J.M., VAN WERVEN, T., NIEWOLD, T.A., RUTTEN, V.P.M.G., NOORDHUIZEN-STASSEN, E.N. Bacterial growth during the early phase of infection determines the severity of experimental *Escherichia coli* mastitis in dairy cows. **Vet. Microbiol.**, v. 101, p. 177–186, 2004.

MELCHIOR, M.B.; FINK-GREMMELS, J.; GAASTRA, W. Comparative assessment of the antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in biofilm versus planktonic culture. **J. Vet. Med. B**, v. 53, p. 326–332, 2006.

MENZIES, P.I.; RAMANOON, S.Z. Mastitis of sheep and goats. **Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract.**, v. 17, p. 333–358, 2001.

MUNOZ, M.A.; AHLSTROM, C.; RAUCH, B.J. et al. Fecal shedding of *Klebsiella pneumoniae* by dairy cows. **J. Dairy Sci.**, v. 89, p. 3425-3430, 2006.

PAUL, S.; BEZBARUAH, R.L.; ROY, M.K. Multiple antibiotic resistance (MAR) index and its reversion in *Pseudomonas aeruginosa*. **Lett. Appl. Microbiol.**, v.24, p.169-171, 1997.

PODSCHUN, R., ULLMANN, U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 11, p. 589–603, 1998.

QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E. et al. Microbiologia veterinária e doenças infecciosas. Porto Alegre: Artmed, 512 p. 2005

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; HINCHCLIFF, K.W. et al. Veterinary medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats. Philadelphia: **W.B. Saunders**, v. 10, p. 724-725, 2007.

RAINARD, P., RIOLLET, C., Innate immunity of the bovine mammary gland. **Vet. Res.**, v. 37, p. 359-368. 2006.

SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade Do leite. São Paulo: Manole, 314 p. 2007.

SCHALM, O.W.; NOORLANDER, D.D. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.130, p.199-204, 1957.

SELA, S., HAMMER-MUNTZ, O., KRIFUCKS, O., PINTO, R., WEISBLIT L., LEITNER, G. Phenotypic and genotypic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from mastitis outbreaks in dairy herds. **J. Dairy Res.**, 74 (in press, doi:10.1017/ S0022029907002610), 2007

Toledo, M.R.; FONTES, C.F.; *Trabulsi*, L.R. EPM – Modificação do meio de Rugai e Araújo para a realização simultânea dos testes de produção de gás a partir da glicose, H₂S, urease e triptofano desaminase. **Revista de Microbiologia**. V.13, n. 4, p. 309-315, 1982.

VANGROENWEGHE, F., et al. Increase of *Escherichia coli* inoculum doses induces faster innate immune response in primiparous cows. **J. Dairy Sci.**, v. 87, p. 4132-4144, 2004.

VASUDEVAN, P.; NAIR, M.K.M.; ANNAMALAI, T.; VENKITANARAYANAN, K.S. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. **Vet. Microbiol.**, v. 92, p. 179–185, 2003.

WENZ, J., BARRINGTON, G., GARRY, F., MCSWEENEY, K., DINSMORE, R., GOODELL, G., CALLAN, R. Bacteremia associated with naturally occurring acute coliform mastitis in dairy cows. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 219, p. 976–981, 2001.