

IDENTIFICAÇÃO DO *Staphylococcus spp*, DE LEITE DE VACAS COM MASTITE SUBCLÍNICA, NAS PROPRIEDADES LEITEIRAS DA ILHA DE SÃO LUIS, SUBMETIDOS AO CALIFÓRNIA MASTITIS TESTS (CMT), E CONFIRMADO A DIFERENTES PROVAS BIOQUÍMICAS.

José Manoel de Moura Filho (PQ)^{1*}; Tais Fernanda Borgonovi (IC)²; Liane Caroline Sousa Nascimento (PG)³; Adeval Alexandre Cavalcante Neto (PG)⁴; Rodrigo Maciel Calvet (PG)¹.

¹ Instituto Federal do Maranhão (IFMA) - Campus Caxias, ² Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Campus Dracena (UNESP). ³ Instituto Federal do Maranhão (IFMA) - Campus Maracanã. ⁴ Instituto Federal do Maranhão (IFMA) - Campus Codó

* manoel.filho@ifma.edu.br

RESUMO

A mastite se destaca como uma das principais doenças da bovinocultura leiteira, causando enormes prejuízos tendo como principais agentes infecciosos bactérias do gênero *Staphylococcus spp*. Desta forma, foi objetivo deste experimento identificar *Staphylococcus spp*, nas propriedades leiteiras da ilha de São Luís, submetidas ao Califórnia Mastitis Tests (CMT), à prova da catalase, hemólise e à prova da coagulase, leite de vacas com mastite subclínica. Das 380 amostras avaliadas pelo CMT, 145 foram positivas ao teste. Destas, 41 (28,28%) apresentaram hemólise, 24 (16,55%) apresentaram-se positivas ao teste de coagulase, e 40 (27,59%)

apresentaram-se fortemente positivas à prova da catalase e 24 (16,55%) amostras positivas ao teste de coagulase. O baixo nível higiênico das propriedades contribuiu para a disseminação de microrganismo nos animais e entre os animais por meio, principalmente, das mãos dos ordenhadores e dos utensílios utilizados para a limpeza dos tetos.

PALAVRAS-CHAVE: CMT, Mastite, Leite.

6. INTRODUÇÃO

Entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. O leite de outros animais deve denominar-se segundo a espécie de que proceda (BRASIL, 2003).

O Brasil é o 6º maior produtor de leite do mundo e cresce a uma taxa anual de 4%, superior à de todos os países que ocupam os primeiros lugares. Respondemos por 66% do volume total de leite produzido nos países que compõem o Mercosul (CARVALHO et al, 2015). No entanto, caracterizando-se por índices de produtividade extremamente baixos, por um rebanho bastante numeroso, grande número de pequenos produtores e pela baixíssima qualidade do produto final nas fazendas. Esta situação deve-se à estrutura de produção com grande parcela desta, oriunda de propriedades que não utilizam recursos tecnológicos mínimos, que garantam um bom padrão para a matéria prima (CARVALHO et al, 2007).

A mastite bovina é uma das doenças que tem maior impacto sobre a atividade da bovinocultura leiteira, principalmente, pelo alto custo para tratar os animais e por descartes de animais de forma antecipada. Epidemiologicamente, a mastite bovina divide-se em mastite contagiosa e ambiental. A mastite contagiosa é definida pela forma de transmissão de animal para animal, possui como reservatório o próprio animal e sua localização é intramamária. A mastite ambiental caracteriza-se pelo fato do patógeno estar localizado no ambiente das vacas leiteiras (PEDRINI e MARGATHO, 2003). Dentre os métodos empregados para diagnóstico de mastite subclínica, a contagem de células somáticas tem se revelado útil por sua elevada sensibilidade, como no CMT, e especificidade, como no Wiscosin Mastitis Test - WMT, além de ser de baixo custo e fácil execução.

Desta forma, foi objetivo desta pesquisa identificar *Staphylococcus spp*, de animais positivos ao CMT para duas e três cruzes (++; +++), submetidos a diferentes provas bioquímicas.

7. MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionadas 8 propriedades nos municípios da Ilha de São Luis - MA, independentemente do tamanho do rebanho e tipo de ordenha, por período de 60 dias, das quais, selecionou-se 95 vacas primíparas e multíparas no terço médio da lactação, mestiças da raça holandesa, que foram avaliadas por meio do exame clínico e do CMT. Coletou-se os três primeiros jatos de leite, de todos os quartos mamários de cada vaca em caneca de fundo preto, perfazendo um total de 380 amostras, para detecção de mastite clínica. A partir de resultado negativo neste teste, foi realizado o CMT (Califórnia Mastitis Testis) para detecção da mastite subclínica, segundo as recomendações descritas por Santos e Fonseca (2007). Foram considerados positivos

apenas os animais que apresentaram duas (++) ou três cruzes (+++), e foram excluídas do estudo vacas recém-paridas (até 10º dia após o parto), vacas na fase de secagem e aquelas submetidas à antibioticoterapia. No momento da colheita fez-se antissepsia dos tetos. Foram colhidos, entre 2 e 5 mL de leite de cada quarto mamário considerado positivo no CMT, em tubos estéreis, que foram devidamente identificados e acondicionados. As amostras foram analisadas no laboratório de Microbiologia de Alimentos e Água da Universidade estadual do Maranhão (UEMA). As amostras foram semeadas em placas de Petri, contendo Ágar sangue e incubadas a 37°C por 24 a 48 horas. Após esse período, procedeu-se a identificação dos microrganismos por meio de suas características morfológicas (CARTER, 1988) e pelo tipo de hemólise das colônias (SILVA et al. 2001). As colônias de *Staphylococcus spp* mostram-se redondas, convexas, com bordas inteiras e opacas, de coloração cinza, branca ou amarelada, butirosa e apresentando hemólise alfa (parcial) ou beta (total) no ágar sangue. As cepas de *Staphylococcus sp* foram repicadas em Ágar Nutriente e incubadas a 37°C por 24 horas. Após o crescimento foram submetidas às provas bioquímicas, segundo Lennette et al. (1985) e Quinn (1999) e classificação, segundo Krieg e Holt (1994). Para identificação do Gênero *Staphylococcus sp* utilizou-se a prova da catalase, observando presença ou ausência de borbulhamento. A prova de catalase consiste em transferir a colônia sugestiva, com auxílio de uma alça de níquel-cromo, previamente flambada, para uma lâmina de vidro, seguido por adição de uma gota de água oxigenada (H₂O₂) 10 volumes, para observação da reação positiva ou negativa. Considerou-se positiva quando houve borbulhamento imediato (liberação de oxigênio molecular), o que classifica a cepa como sendo do gênero *Staphylococcus*.

A prova da coagulase foi usada para classificar a cepa testada em coagulase positiva ou negativa, sendo a presença de coágulo considerada a prova positiva, funcionando como um marcador para diferenciar cepas de *Staphylococcus aureus* das demais espécies do gênero, sendo que a produção dessa enzima caracteriza-se como uma identificação presuntiva de *S. aureus*, e é um forte indício, porém não conclusivo, de que as cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva sejam *S. aureus* (SOARES et al. 1997 citados por CASTRO et al., 2007). As colônias positivas para o teste de catalase foram repicadas para tubos de ensaio (10 x 70 mm) contendo caldo-cérebro-coração (BHI) e incubadas a 37°C por 24 horas. Após o crescimento da cultura, foi feita a prova da coagulase livre, adicionando-se aos tubos de ensaio 0,1 mL de plasma liofilizado de coelho, diluído em 0,4 mL de solução de cloreto de sódio (0,85% estéril) e 0,3 mL do cultivo de BHI. Após a agitação, os tubos foram incubados em banho-maria à temperatura de 37° C e as leituras efetuadas após 1, 2, 3, 4 e 24 horas. Foram considerados positivos para o teste, os tubos que apresentaram qualquer grau de coagulação do plasma.

8. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 380 amostras avaliadas pelo CMT, 145 foram positivas ao teste (38,16%), destas, 41 (28,28%) apresentaram hemólise, 24 (16,55%) apresentaram-se positivas ao teste de coagulase, e 40 (27,59%) apresentaram-se fortemente positivas à prova da catalase e 24 (16,55%) amostras positivas ao teste de coagulase, conforme demonstra a Tabela 1.

Tabela 1 – Prevalência de mastite subclínica conforme diagnóstico pelo teste CMT e provas bioquímicas

Testes	n° de amostras	Positivas	%	Negativas	%
Califórnia Mastitis Test (CMT)	380	145	38,17	235	61,83
Hemólise	145	41	28,28	105	71,72
Coagulase	145	24	16,55	122	83,45
Catalase	145	40	27,59	106	72,41

Freitas e Magalhães (1990), analisando 2725 amostras de leite provenientes de 692 vacas, observaram que 37,65% destas se apresentaram positivas ao CMT. Samara et al. (1996), estudando a ocorrência de mastite subclínica por meio do CMT, em 807 vacas em lactação de 20 propriedades rurais da bacia leiteira de Pitangueiras, estado de São Paulo, observaram que a média de quartos afetados em todos os rebanhos foi de 11,00%, 13,90%, 24,60% e 16,5% no período de 1990 a 1993, respectivamente. Esses resultados corroboram com os resultados encontrados nesta pesquisa (38,17%). No entanto, divergiu dos resultados encontrados por Vargas (2007), que verificou no leite in natura que 100% das amostras foram positivas ao CMT e 7% apresentaram *Staphylococcus sp.*

Santos, 2007, relata que muitos microorganismos podem causar mastites em circunstâncias especiais, mas os mais frequentes e que causam os maiores prejuízos econômicos são *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Streptococcus uberis*. Esta pesquisa comprovou a presença do *Staphylococcus spp*, como agente prevalente nos casos de mastite.

Em estudo realizado em São Luís, Corrêa (1997), detectou a presença de *Staphylococcus aureus* em 100% das amostras examinadas. O microrganismo isolado com maior frequência foi *Staphylococcus coagulase negativo* (19/33=57,6%), seguido por *Staphylococcus aureus* (5/33=15,2%), *Micrococcus sp.* (5/33=15,2%), *Streptococcus α -hemolítico* (3/33=9%) e *Streptococcus galactiae* (1/33=3%). Estes resultados estão de acordo com os encontrados nesta pesquisa (27,9%) para *Staphylococcus coagulase positivo*.

9. CONCLUSÕES

Em todas as propriedades, avaliadas nesta pesquisa, tiveram animais positivos quando submetidos ao CMT. Sendo o principal microorganismo envolvido nos casos de Mastite pertence ao gênero *Staphylococcus spp.*

10. REFERÊNCIAS

37. BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Instrução Normativa nº 62 de 26 de agosto de 2003. Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Brasília: **Diário Oficial da União**, 2003.
38. CARTER, G. R. Fundamentos de Bacteriologia e Micologia Veterinária. São Paulo: Roca, 1988.
39. CORREA, M. do R. Características microbiológicas do leite “in-natura”. Comercializado no Município de São Luis – MA. UEMA, São Luis, 40p. 1997.
40. CARVALHO, P de C.; MARTINS, P do C.; WRIGTH, J. T. C.; SPERS, R. G. Cenários para o leite no Brasil em 2020. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 190p. p30. 2007.
41. CARVALHO, L. A.; NOVAES, L. P.; MARTINS, C. E.; ZOCCAL, R. MOREIRA, P.; RIBEIRO, A. C. C. L.; LIMA, V. M. B. Sistema de Produção de Leite (Cerrado). Disponível: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Leite/LeiteCerrado/introducao.html> > Acesso em: 13/10/2015.
42. CASTRO, V de S. Pesquisa de coliformes e *Staphylococcus coagulase positiva* em queijos minas frescal comercializado em Teresina - PI. II Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica. João Pessoa – PB, 2007.
43. FREITAS, M.A.Q.; MAGALHÃES, H. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus aureus*, isolados de vacas com mastite. Rev. Microbiol., São Paulo, v.21, n.4, p.315-9,1990
44. KRIEG, N.R.; HOLT, J.C. Bergeys manual of systematic bacteriology. 9.ed. Baltimore: Williams, Wilkins. 984p. 1994.
45. LENNETTE, E.H.; BALLOWS, A.; HAUSLER, W.J. et al. Manual of clinical microbiology. 4.ed. Washington: ASM. 1149p.1985.
46. PEDRINI S. C.; MARGATHO, L.F.F. Sensibilidade de Microrganismos patogênicos isolados de casos de mastite clínica em bovinos frente a diferentes tipos de desinfetantes. Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo, v.70, n. 4, p. 391-395, out./dez.2003.
47. QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B. & CARTER, G.R. Clinical Veterinary Microbiology. Edimburgh: MOSBY Harcourt Publishers Limited, 648 p.,1999.
48. SANTOS, M. V; FONSECA, L.F.L. Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite Barueri, SP; Pirassununga, SP: Ed. dos Autores, 2007.
49. SILVA, A .A . Prevalência da mastite subclínica bovina no município de Teresina, PI. Uso da Prova “Califórnia Mastitis Test”(CMT). Teresina, UFPI, CCA (Monog. Grad.), 22p, 2001.
50. VARGAS, C. G.; SILVA, C.C.; LUND, R.G. I.; GONZALES, H.DE L.; NASCIMENTO, P. DA S. Isolamento de *Staphylococcus sp*, em leite in natura com resultado CMT positivo. XXV Congresso de Iniciação Científica –CIC. Universidade Federal de Pelotas – RS, 2007