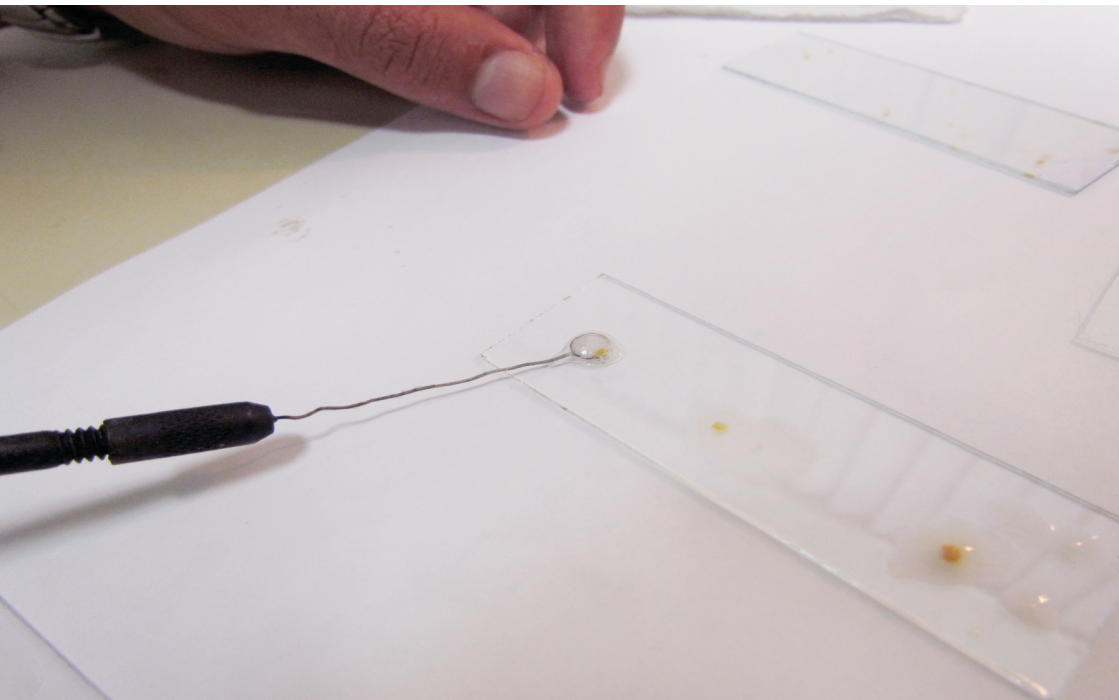


Identificação Laboratorial de *Staphylococcus aureus* em Leite Bovino



ISSN 1678-1953
Dezembro, 2013

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Tabuleiros Costeiros
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 180

Identificação Laboratorial de *Staphylococcus aureus* em Leite Bovino

*Tânia Valeska Medeiros Dantas Simões
Amaury Apolônio de Oliveira
Kênia Moura Teixeira
Arnaldo dos Santos Rodrigues Júnior
Igor Meneses Freitas*

Embrapa Tabuleiros Costeiros
Aracaju, SE
2013

Embrapa Tabuleiros Costeiros
Av. Beira Mar, 3250, Caixa Postal 44, CEP 49025-040,
Aracaju, SE
Fone: (79) 4009-1300
Fax: (79) 4009-1369
cpatc.sac@embrapa.br

Comitê Local de Publicações da Embrapa Tabuleiros Costeiros

Presidente: *Marcelo Ferreira Fernandes*

Secretária-executiva: *Raquel Fernandes de Araújo Rodrigues*

Membros: *Alexandre Nizio Maria, Ana da Silva Lédo, Ana Veruska Cruz da Silva Muniz, Élio César Guzzo, Hymerson Costa Azevedo, Josué Francisco da Silva Junior, Viviane Talamini e Walane Maria Pereira de Mello Ivo*

Supervisão editorial: *Raquel Fernandes de Araújo Rodrigues*

Normatização Bibliografica: *Josete Cunha Melo*

Fotos: *Tânia Valeska Medeiros Dantas Simões*

Projeto gráfico e editoração eletrônica: *José Gabriel Santos*

1ª Edição (2013)

On line (2013)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Tabuleiros Costeiros

Simões, Tânia Valeska Medeiros Dantas

Identificação laboratorial de staphylococcus aureus em leite bovino / Tânia Valesca Medeiros Dantas Simões ... [et al.]. – Aracaju : Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2013.

11 p. (Documentos / Embrapa Tabuleiros Costeiros, ISSN 1517-1329; 180).

Disponível em http://www.cpatc.embrapa.br/publicacoes_2013/doc_177.pdf

1. Leite. 2. Bovinocultura leiteira. 3. Bactéria. 4. Mastite. I. Simões, Tânia Valesca Medeiros Dantas. II. Oliveira, Amaury Apolônio de. III. Teixeira, Kênia Moura. IV. Rodrigues Júnior, Arnaldo dos Santos. V. Freitas, Igor Menezes. VI. Série.

Autores

Tânia Valeska Medeiros Dantas Simões

Médica-veterinária, doutora em Ciências Veterinárias, pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, tania.dantas@embrapa.br.

Amaury Apolônio de Oliveira

Médico-veterinário, mestre em Ciências Veterinárias, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, amaury.oliveira@embrapa.br.

Kênia Moura Teixeira

Assistente, Biotecnóloga, graduada em Química Licenciatura, assistente da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE, kenia.teixeira@embrapa.br.

Arnaldo dos Santos Rodrigues Júnior

Bolsista CNPq/Pibic Embrapa Tabuleiros Costeiros.

Igor Meneses Freitas

Bolsista FAPITEC/CNPq Embrapa Tabuleiros Costeiros.

Apresentação

A produção de leite bovino pode ser prejudicada por diversas enfermidades, dentre elas, uma das mais comuns, é a mastite, que pode ser ocasionada por diferentes etiologias, na maioria das vezes não diagnosticadas de acordo com o agente, dificultando um tratamento mais eficiente, afetando as medidas de controle adequadas, o que compromete o desempenho produtivo do rebanho.

Dentre os agentes mais comuns que ocasionam mastite, destaca-se o *Staphylococcus aureus* que é o principal patógeno causador de mastite subclínica em rebanhos leiteiros. Estudos recentes observaram, em alguns rebanhos, alta incidência de mastite com sinais clínicos. Uma vez acometida, a vaca pode apresentar infecção intramamária crônica, que dificilmente responde ao tratamento. Além disso, as perdas econômicas da mastite causada por *S. aureus* estão associadas ao aumento da contagem de células somáticas (CCS), redução da produção do leite e potencial de transmissão para outras vacas dentro do rebanho.

O conhecimento do diagnóstico mais específico, para identificar o *Staphylococcus aureus* é um fator imprescindível para a melhoria no tratamento específico e medidas de controle da mastite.

Essa série de documentos tem como objetivo demonstrar o diagnóstico específico de *Staphylococcus aureus* em amostras de leite bovino.

Manoel Moacir Costa Azevedo

Chefe-Geral da Embrapa Tabuleiros Costeiros

Sumário

Identificação Laboratorial de Staphylococcus aureus em Leite Bovino.....	06
Introdução.....	07
Coleta do leite.....	08
Análise microbiológica.....	08
Cultivo em ágar sangue.....	08
Coloração de gram.....	09
Cultivo em aal manitol.....	10
Análise bioquímica.....	11
Catalase.....	11
Coagulase.....	11
Oxidação e fermentação (OF).....	11
VP acetoina.....	12
Armazenamento.....	12
Referências.....	13

Identificação Laboratorial de *Staphylococcus aureus* em Leite Bovino

Tania Valeska Medeiros Dantas Simões

Amaury Apolônio de Oliveira

Kênia Moura Teixeira

Arnaldo dos Santos Rodrigues Júnior

Igor Meneses Freitas

Introdução

Staphylococcus sp são bactérias gram positivas esféricas que formam cachos irregulares. Cerca de cinco espécies são de importância veterinária: *S.aureus*, *S.intermedius*, *S.epidermidis*, *S.hycus* e *S.schleiferi* subespécie coagulans. Os *Staphylococcus* possuem 0,5 a 1,5 μm de diâmetro, esporos e flagelos não são observados (BIBERSTEIN; HIRSH, 2003).

S. aureus é um agente piogênico comum em humanos e em diferentes espécies animais. Essas são bactérias gram positivas esféricas, anaeróbico facultativo, não móvel e apresentam também catalase e coagulase positiva. As células são esféricas e aparecem sozinhas ou pareadas, ou apresentam formações semelhantes a cachos de uva. A parede celular é resistente a lisozima é sensível a lisoestafina, a qual especificamente lisa as pontes de pentaglicina de *Staphylococcus spp* (CHAPAVAL et al, 2009).

Na rotina do exame microbiológico para diagnóstico de mastite, o teste de produção de coagulase em tubo é empregado para classificar os *Staphylococcus* em dois grupos: os coagulase positivos e os coagulase negativos. Historicamente, tem sido considerada como *S. aureus* a bactéria que apresenta hemólise incompleta em ágar sangue e resultado positivo no teste de coagulase em tubo após quatro horas de incubação (HARMON et al., 1990).

Entretanto, este procedimento não permite diferenciar *S. aureus* da espécie coagulase-positiva *S. intermedius* e das variantes coagulase-positivas de *S. hyicus*. Um teste adicional recomendado para diferenciar as espécies coagulase positivas é a produção de acetoina a partir de glicose ou piruvato, positivo para *S. aureus* e negativo para *S. intermedius* e *S. hyicus* (TALAN et al., 1989; HARMON et al., 1990; KLOOS, 1990; KLOOS; BANNERMAN, 1995).

O *Staphylococcus aureus* apresenta uma grande importância na epidemiologia das doenças veiculadas por alimentos, devido sua alta prevalência e o risco de produção de toxinas causadoras de gastroenterites alimentares (ZECCONI; HAHN, 2000).

Infecções por *Staphylococcus aureus* do úbere resultam geralmente na mastite subclínica. No entanto, as infecções podem progredir para manifestação clínica e incluir sinais sistêmicos, particularmente em períodos de parto e pós-parto (SORDILLO; SHAFER-WEAVER; DEROSA, 1997).

Bactérias de gênero *Staphylococcus* ocupam um papel importante na etiologia das infecções intramamárias do gado leiteiro. A espécie *S. aureus* é considerada um patógeno primário e tem sido o agente mais frequentemente isolado tanto de infecções clínicas como subclínicas (WATTS, 1988; BOOTH, 1995; BRAMLEY et al., 1996; BRITO et al., 1999).

Em levantamentos epidemiológicos nacionais e internacionais, o *S. aureus* está presente em cerca de 50% das infecções da glândula mamária dos bovinos leiteiros (BRABES et al., 1999). Em um estudo que analisou 127 amostras de leite de cinco propriedades leiteiras dos estados de São Paulo e Minas Gerais, encontraram uma prevalência de 40,15% para a espécie *S. aureus* (BRABES et al., 1999), e em Sergipe, de 893 amostras encontraram *S. aureus* em 196 amostras que correspondeu a 21,95% (OLIVEIRA; MELO; AZEVEDO, 2009).

A contaminação do leite com *S. aureus* pode ocorrer através das duas vias, uma vez que se trata de um microrganismo patogênico que pode causar inflamações no úbere das vacas, além de estar presente em superfícies de utensílios e equipamentos de ordenha (FONSECA, SANTOS, 2000). Nesse último caso deve-se ressaltar a importância do homem como reservatório de *S. aureus* e principal veiculador do microrganismo em alimentos, de modo geral (JAY, 1994).

Esta publicação descreve a identificação laboratorial do *Staphylococcus aureus* em leite bovino no laboratório de Sanidade Animal da Embrapa Tabuleiros Costeiros.

Coleta do leite

A qualidade do resultado dos exames depende da maneira como o material foi colhido e a rapidez com que foi enviado ao laboratório. A assepsia das mãos do ordenhador com lavagem utilizando água e sabão, desinfecção com álcool a 70% e secagem com papel toalha. Em seguida, realiza-se a lavagem das tetas do animal com água clorada, secagem com papel toalha individual e aplicação de álcool a 70% utilizando um pedaço de algodão, limpando cuidadosamente os orifícios das tetas. As tetas mais distantes da vaca devem ser higienizada primeira. Quando as tetas estiverem secas inicia-se a coleta pelas mais próximas. Descartar os três primeiros jatos de leite, coletar cerca de 10 ml de leite em tubo de tampa de rosca e estéreis. Depois da coleta as amostras devem ser colocadas em recipientes com gelo e encaminhadas ao laboratório e deveram ser analisadas dentro de 24 horas. A refrigeração é importante para impedir o crescimento de germes contaminantes, pois as diferenças existentes, no tempo de crescimento entre os gêneros e espécies de microrganismos, podem permitir que a população de um contaminante sobreponha o patógeno de interesse. Por essa razão, é recomendável o congelamento das amostras quando não puderem ser encaminhadas imediatamente ao laboratório. A identificação das amostras é muito importante os recipientes deve conter adesivo para identificação do animal e quarto mamário. Outras informações também são importantes passar para o laboratório como produção do leite, resultado do CMT e sinais clínicos apresentados pelo quarto mamário amostrado. Após a chegada das amostras ao laboratório, as mesmas são encaminhadas para análise microbiológica e bioquímica para determinação da bactéria.

Análise microbiológica

Cultivo em ágar sangue

A identificação começa com a inoculação primária na placa de ágar 5% de sangue de carneiro. Em ágar sangue as colônias de estafilococos apresentam-se com coloração branca ou amarelada, opacas, cremosas e convexas, sendo que algumas cepas bacterianas produzem beta-hemólise (Figura 1).

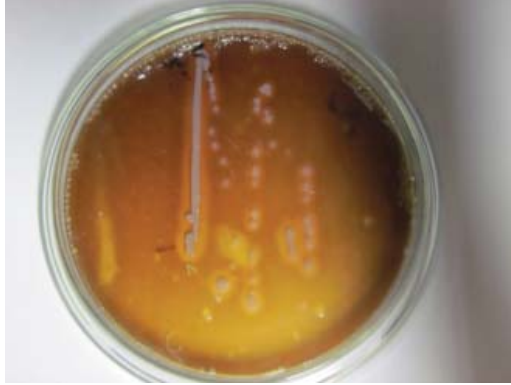


Figura 1. colônias de *Staphylococcus aureus* em ágar sangue.

Coloração de gram

Este método baseia-se no fato de que, quando algumas bactérias são coradas pelo violeta de genciana e depois tratadas pelo iodo (lugol), forma-se um composto de coloração escura entre o iodo e o corante, o qual é fortemente retido pelas bactérias e não pode ser facilmente removido pelo tratamento subsequente com álcool, denominadas como bactérias gram positivas adquirindo então a cor roxa ou violeta. No caso de bactérias que perdem a coloração com o álcool tornam-se vermelhas e são denominadas gram negativas. *Staphylococcus aureus* são cocos tipicamente Gram positivas, e com apresentação em cachos (Figura 2).

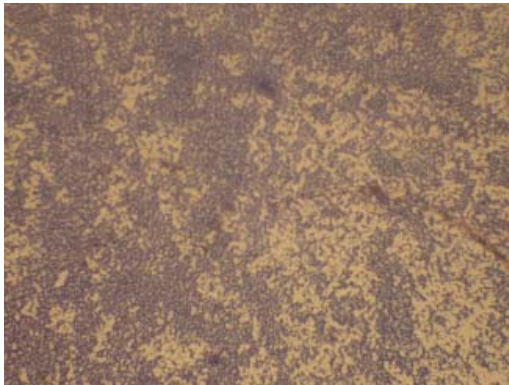


Figura 2. Coloração de gram de uma colônia de *S.aureus*

Misturar uma alçada de uma colônia típica de *S. aureus* em uma gota de solução salina numa lâmina de vidro, espalhar e fixar na chama do bico de bunsen. Cobrir a lâmina com Cristal Violeta e deixar agir por 1 minuto. Sem lavar a lâmina, adicionar Lugol, deixando agir por 1 minuto. Ainda sem lavar proceder à descoloração com álcool acetona por no máximo 5 segundos, até que a coloração violeta não se desprenda mais da lâmina. Enxaguar imediatamente com água destilada. Adicionar Fucsina e deixar agir por 30 segundos e enxaguar em água corrente. Deixar secar e observar em objetiva de imersão (100x).

Cultivo em sal manitol

É um meio de cultura em placas destinado ao isolamento de *Staphylococcus aureus* de amostras biológicas, em líquidos e produtos lácteos, carnes e derivados, incluindo conservas e pescados. A degradação do manitol com a produção de ácido muda a cor do meio de rosado a amarelo. Devido a alta concentração de NaCl há inibição de crescimento de bastonetes Gram negativos e da maioria dos microrganismos. *Staphylococcus aureus* fermentadores de manitol produzem colônias grandes e rodeadas de uma zona amarela. Os estafilococos não patogênicos produzem colônias pequenas e rodeadas de uma zona vermelha. O *Staphylococcus epidermidis* e *Bacillus subtilis* produzem colônias brancas. Colônias de *Staphylococcus aureus* em meio sal manitol (Figura 3).



Figura 3. Colônias típicas de *S. aureus* em meio de cultura sal-manitol, mostrando da esquerda para direita, controle do meio sem bactéria, e demais placas com diluições seriadas da bactéria.

Análise bioquímica

Catalase

Fazer uma emulsão de uma alçada de uma colônia típica de *S. aureus* em uma gota de água oxigenada (peróxido de hidrogênio) em uma lâmina de vidro (Figura 4). Observar a ocorrência de borbulhamento imediato (teste positivo) ou não (teste negativo). As cepas de *S. aureus* são catalase positivas.

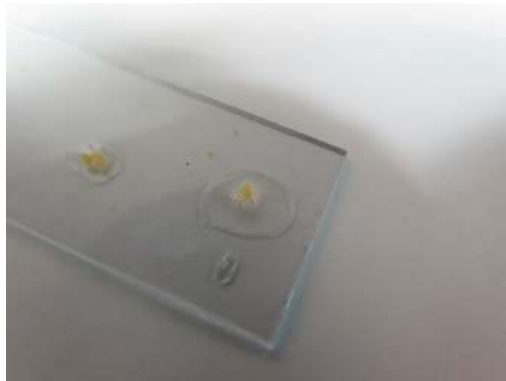


Figura 4. Reação positiva da catalase.

Coagulase

Realizada através de plasma de coelho/citrato de sódio a 3,8%, retira-se 1 ml do plasma e mistura com 4ml de solução fisiológica, para a realização do teste é colocado 0,5ml por amostra. Após a inoculação, a amostra é incubada a 35°C na estufa, as leituras são feitas em 3, 6, 8, 12 e 24 horas e se houver coagulação o teste é considerado positivo. O *Staphylococcus aureus* apresenta coagulase positiva em até 4 horas.

Oxidação e fermentação (OF)

Este teste é usado para indicar se a fonte de carbono (geralmente glicose) é utilizada oxidativa ou fermentativamente pela bactéria. É realizado em dois tubos onde, em um tubo acrescenta 1 ml de vaselina esterilizada (oxidação: tubo que não contém vaselina; fermentação: acontece nos dois tubos). A leitura é realizada em 24 horas ou mais alguns horas para a observação na estufa 35°C, se for positivo o meio torna-se amarelo, se continuar na cor verde é considerado negativo.

VP Acetonina

Meio utilizado para avaliar a via fermentativa de utilização da glicose pelas enterobactérias utilizando os testes de Vermelho de Metila e Voges-Proskauer (VM/VP). Realizaram-se as leituras dos testes para a verificação da produção de acetoina após a sementeira de um tubo com caldo VM/VP com um cultivo puro de *S. aureus*. Os tubos foram incubados por 24 horas a 35 °C. Adicionou-se primeiramente 0,6 ml de alfa-naftol a 5% e, a seguir, 0,2 ml de KOH a 40%. Procedeu-se a uma agitação suave dos tubos para a exposição do meio ao oxigênio atmosférico, deixando-se em repouso por quinze minutos, sendo logo a seguir efetuada a leitura, que foi repetida após 45 minutos. Resultados positivos foram indicados pelo desenvolvimento de cor vermelha quinze e sessenta minutos após a agitação (KONEMAN et al., 2001).

Armazenamento

Os isolamentos de *Staphylococcus aureus* são inoculados em meio BHI, contendo 10% de glicerol, e armazenados a -20°C. A cada dois meses são feitos novos repiques para manutenção do estoque. O estoque da bactéria é realizado no laboratório para estudos de biologia molecular, resistência e estudos de diagnóstico.

Referências

BIBERSTEIN, E. L.; HIRSH, D. C. Estafilococos. In : HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. **Microbiologia Veterinária**. São Paulo: Guanabara Koogan. 2003. p.108-112.

BOOHT, J. M. Progress in the control of mastitis. In: INTERNATIONAL MASTITIS SEMINAR, 3., 1995, Tel Aviv. **Proceedings...** Tel Aviv: International Dairy Federation, 1995. v. 2, p. 3-10.

BRABES, K. et al. Participação de espécies coagulase positivas e negativas produtoras de enterotoxinas de gênero *Staphylococcus* na etiologia de casos de mastite bovina em propriedades de produção leiteira dos estados de São Paulo e Minas Gerais. Ver Nappgama, São Paulo, v. 3, p. 4-11, 1999.

BRAMLEY, A. J., CULLOR, J. S., ERSKINE, R. J. et al. **Current concepts of bovine mastitis**. 4. ed. Madison: National Mastitis Council, 1996. 64 p.

BRITO, M. A. V. P., BRITO, J. R. F., RIBEIRO, M. T. et al. Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 51, n. 2, p. 129-135, 1999.

CHAPAVAL, L.; AGUIAR, V. M. P.; SOUSA, A. P. B.; MIRANDA, K. P.; MORORO, A. M.; MAGALHÃES, D. C. T. **Cultura, crescimento e identificação de bactérias do gênero *staphylococcus aureus* em leite de cabra**. Circula técnica, on line, Sobral: Embrapa caprinos e ovinos, 2009. 5 p. (Embrapa Caprinos e Ovinos. Circular Técnica, 41). Disponível em: http://www.cnpc.embrapa.br/?pg=pesquisa_desenvolvimento&uiui=public_ler&id=9&titulo=Circular%20T%C3%A9cnica%20%28CT%29.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. **Qualidade do leite e controle de mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. 175 p.

HARMON, R.J.; EBERHART, R. J.; JASPER, D. E. et al. **Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection**. Arlington: National Mastitis Council, 1990. 34 p.

JAY, J. M. **Microbiología moderna de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1994. 804 p.

KLOOS, W. E. Systematics and the natural history of staphylococci. **Journal of Applied Bacteriology, Supplement**, Oxford, v. 69, n. 19, p. 25S-37S, 1990.

KLOOS, W. E.; BANNERMAN, T. L. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A. et al. (Ed.). **Manual of clinical microbiology**. 6. ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1995. p. 282-298.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JR.; W. C. W. **Diagnóstico microbiológico**. 5. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001. 1465 p.

OLIVEIRA, A. A., MELO, C.B., AZEVEDO, H.C. Diagnóstico e determinação microbiológica da mastite em rebanhos bovinos leiteiros nos tabuleiros costeiros de Sergipe. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 10, n. 1, p. 226-230, jan./mar. 2009.

ROSA, M. S.; COSTA, M. J. R. P.; SANT'ANNA, A. C.; MADUREIRA, A. P. **Boas práticas de manejo-ordenha**. Jaboticabal: FUNEP, 2009. 43 p. Disponível em: <<http://www.slideshare.net/ruralbr/ordenha>> .

TALAN, D. A.; STAATZ, D.; STAATZ, A. et al. *Staphylococcus intermedius* in canine gingiva and canine-inflicted human wound infections: laboratory characterization of a newly recognized zoonotic pathogen. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 27, n. 1, p. 78-81, 1989.

SORDILLO, L. M.; SHAFER-WEAVER, K.; DEROSA, D. Symposium: bovine immunology. Immunology of the mammary gland. **Journal Dairy of Science**, Champaign, IL, v. 80, p. 1851-1865, 1997.

WATTS, J. L. Etiological agents of bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 16, p. 41-66, 1988.

ZECCONI, A.; HAHN, G. *Staphylococcus aureus* in raw milk and human health risk. **Bulletin of IDF**, Belgium, v. 345, p. 15-18, 2000.



Tabuleiros Costeiros

Ministério da
**Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**

