

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ENVOLVIDOS NA EPIDEMIOLOGIA DA MASTITE BOVINA

Luiz Francisco Zafalon¹ *, Juliana Rodrigues Pozzi Arcaro², Antônio Nader Filho³,
Luciano Menezes Ferreira⁴, Livia Castelani⁵, Fabiane Benvenuto⁵

¹ Embrapa Pecuária Sudeste, Rod. Washington Luís, Km 234, Caixa Postal 339, São Carlos, SP, Pesquisador, zafalon@cnpse.embrapa.br

² Instituto de Zootecnia - Nova Odessa, SP; ³ Unesp/FCAV/Câmpus de Jaboticabal - Jaboticabal, SP; ⁴ Instituto Aequitas - Araraquara, SP; ⁵ Instituto de Zootecnia / Bolsistas Fundap - Nova Odessa, SP.

Introdução

Dentre as espécies de estafilococos coagulase-positivas, as de maior ocorrência na etiologia infecciosa da mastite bovina são *S. intermedius*, *S. hyicus* e *S. aureus*, esta última a de maior importância pela prevalência e pelos riscos à saúde pública. Há indicações que este pode ser identificado após a prova de coagulase, que o classificaria como *S. aureus*. Entretanto, o Conselho Nacional de Mastite dos Estados Unidos recomenda o teste de Voges-Proskauer (VP) como adicional para a diferenciação de *S. aureus* de outras cepas positivas à prova da coagulase (CUNHA NETO et al., 2002).

Pela possibilidade de resultados atípicos às provas diagnósticas em função da origem das amostras, objetivou-se estudar as características diagnósticas do VP após a confirmação molecular de *S. aureus* isolados do leite de vacas com mastite, de óstios dos tetos e de insufladores de teteiras, frente a diferentes graus de coagulação e índices pluviométricos, como forma de colaborar na identificação do agente.

Material e Métodos

As amostras foram obtidas em rebanho do Instituto de Zootecnia de Nova Odessa, São Paulo, com aferições mensais dos índices de chuva de agosto de 2005 até dezembro de 2006. A estação “seca” apresentou uma precipitação média de 27,9 mm no período de tempo entre duas visitas ao rebanho, enquanto a estação “chuvosa” apresentou média de chuvas de 113,6 mm. A mastite subclínica foi detectada pelo *California Mastitis Test* (CMT), enquanto detectou-se a mastite clínica pelo teste da caneca telada. Animais com até 10 dias de lactação e 30 dias pré-secagem não foram investigados. Obteve-se, também, amostras de óstios de tetos e insufladores dos conjuntos de ordenha. As colheitas das amostras de leite foram feitas de acordo com o *National Mastitis Council* (HARMON et al., 1990). Imediatamente após a anti-sepsia pré-ordenha, colheu-se amostras dos óstios com o auxílio de suabe estéril, assim como estes também foram utilizados na porção final de cada um dos insufladores durante e após as ordenhas. Isolou-se 167 *S. aureus* a partir das amostras de leite, enquanto 117 isolados oriundos dos óstios e 45 de insufladores foram obtidos. As colônias foram submetidas à coloração de Gram e posterior realização das provas de catalase e coagulase lenta com plasma de coelho, seguidas pela verificação da produção de acetoina (HOLMBERG, 1973; HOLT et al., 1994). Os resultados classificados como coagulase “4” foram aqueles com coagulação completa nos tubos, enquanto os demais graus variaram desde coágulos pequenos e desorganizados até coágulos grandes organizados, sem coagulação completa (GARCIA et al., 1980). As leituras da prova de acetoina ocorreram após sementeira de tubo com caldo VM/VP, com cultivo puro de *S. aureus*. A sua realização e leitura seguiram o recomendado por Koneman et al. (2001).

Após a extração do DNA bacteriano, procedeu-se a confirmação molecular dos isolados, por meio da amplificação de fragmentos de DNA cromossômico de *S. aureus*, (MARTINEAU et al., 1998). A sensibilidade diagnóstica do VP foi definida como a proporção dos verdadeiros positivos dentre todos resultados positivos, e a especificidade foi a proporção de verdadeiros negativos entre todos os resultados negativos. A eficiência do VP foi a proporção de resultados verdadeiros do teste (MEDRONHO & PEREZ 2002). Considerou-se as provas moleculares como “padrão-ouro”.

Resultados e discussão

O grau de coagulação mais observado foi o “4”, em ambos os períodos de chuvas. No diagnóstico da mastite bovina por *S. aureus*, alguns protocolos não consideram reações fracas na prova da coagulase, o que influencia na sensibilidade e especificidade do teste, já que colônias atípicas podem ser isoladas em quaisquer sítios de localização. A inclusão de outras provas pode elevar o número de amostras identificadas corretamente. O estudo dos resultados de testes laboratoriais frente às condições climáticas anteriores às colheitas das amostras, além disso, pode colaborar no levantamento de fatores intervenientes nos resultados. Em períodos mais chuvosos, a dificuldade em manter condições higiênicas adequadas e as condições de umidade e temperatura favoráveis à multiplicação de microrganismos, podem acarretar uma maior dispersão de microrganismos no ambiente com distintas características fenotípicas.

Na Tabela 1, constam características diagnósticas do VP para a identificação de *S. aureus*, de acordo com graus de coagulação, durante a estação “seca”.

1) Características diagnósticas da reação de Voges Proskauer e graus de coagulação de *Staphylococcus aureus* isolados de diferentes fontes em períodos classificados como pertencentes à “estação seca”¹.

Fontes	Características					
	Eficiência		Sensibilidade		Especificidade	
	Coagulase 4 ²	Outros graus ³	Coagulase 4	Outros graus	Coagulase 4	Outros graus
Leite	87,1	50,0	100,0	100,0	10,0	20,0
Óstios	58,1	29,4	95,8	75,0	10,5	15,4
Insufladores	52,9	20,0	87,5	100,0	22,2	11,1

¹ Precipitação média de 27,9 mm nos períodos correspondentes entre o dia de uma colheita das amostras de leite até o dia imediatamente anterior à próxima colheita; ² Coagulação completa; ³ Sem coagulação completa.

Na Tabela 2 encontram-se os resultados referentes às características diagnósticas do VP em estação classificada como “chuvosa”.

BRITO et al. (2002) verificaram que 81,6% dentre 38 amostras de *S. aureus* produziram acetoina e classificaram o teste de VP como de fácil execução e com baixo custo, além de o considerarem como uma característica-chave para *S. aureus*. Quanto menor o número de testes hábeis para a identificação de *S. aureus*, mais fácil será para o técnico na rotina laboratorial, principalmente quando sistemas automatizados de diagnóstico não estão disponíveis.

2) Características diagnósticas da reação de Voges Proskauer e graus de coagulação de *Staphylococcus aureus* isolados em diferentes fontes em período classificado como “estação chuvosa”¹.

Características

Fontes	Eficiência		Sensibilidade		Especificidade	
	Coagulase 4 ²	Outros graus ³	Coagulase 4	Outros graus	Coagulase 4	Outros graus
Leite	72,2	82,4	74,6	85,7	40,0	66,7
Óstios	63,2	38,9	83,3	100,0	45,0	8,3
Insufladores	73,3	33,3	90,9	-	25,0	-

¹ Precipitação média de 113,6 mm nos períodos correspondentes entre o dia de uma colheita das amostras de leite até o dia imediatamente anterior à próxima colheita; ² Coagulação completa; ³ Sem coagulação completa.

Conclusão

O teste de produção de acetoina apresentou adequada sensibilidade para identificar *S. aureus* em fontes ligadas à cadeia epidemiológica da mastite bovina, em conjunto com a coagulase, principalmente em períodos com menor ocorrência de chuvas, independentemente do grau de coagulação apresentado. Devido à possível variabilidade que pode ser encontrada, não recomenda-se o uso único do VP com a prova de coagulase lenta com plasma de coelho, sobretudo em épocas mais chuvosas, quando a sensibilidade do teste com isolados de leite pode apresentar-se inferior, quando comparada com a sensibilidade apresentada em período menos chuvoso.

Agradecimentos

Agradecimentos: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – Processo 05/53856-3.

Referências Bibliográficas

- Brito, M.A.V.P. et al. Esquema simplificado para identificação de estafilococos coagulase-positivos isolados de mastite bovina. *Ciência Rural*, v.32, n.1, p.79-82, 2002.
- Cunha Neto, A. et al. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em alimentos *in natura* e processados no estado de Pernambuco, Brasil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.22, n.3, p.263-271, 2002.
- Garcia, M.L. et al. Characterization of *Staphylococci* isolated from mastitic cows in Spain. *Applied Environmental Microbiology*, v.39,n.3, p.548-553, 1980.
- Harmon, R.J. et al. *Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection*. Arlington: National Mastitis Council, 1990. 34p.
- Holmberg, O. *Staphylococcus epidermidis* isolated from bovine milk. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v.45, p.1-144, 1973 (Supplement).
- Holt, J.G. et al. *Gram-positive cocci*. In: *Bergey's Manual Of Determinative Bacteriology*. 9. ed. Baltimore: Williams e Wilkins, p. 544-551, 1994.
- Koneman, E.W. et al. *Diagnóstico Microbiológico*. 5ed. Rio de Janeiro: Medsi. 2001. 1465p.
- Martineau, F. et al. Species-specific and ubiquitous DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, v.36, p.618–623, 1998.
- Medronho, R.A.; Perez, M.A. *Testes diagnósticos*, p.259-270. In: Medronho R.A. (ed.) *Epidemiologia*. Editora Atheneu, São Paulo. 2002.