

ESQUEMA SIMPLIFICADO PARA IDENTIFICAÇÃO DE ESTAFILOCOCOS COAGULASE-POSITIVOS ISOLADOS DE MASTITE BOVINA

SIMPLIFIED SCHEME FOR IDENTIFICATION OF COAGULASE-POSITIVE STAPHYLOCOCCI ISOLATED FROM BOVINE MASTITIS

Maria Aparecida Vasconcelos Paiva Brito¹ Glênia Maria de Magalhães Campos²
José Renaldi Feitosa Brito³

RESUMO

Os testes de produção de acetoina, determinação da atividade da enzima β -galactosidase e utilização anaeróbica do manitol em conjunto com a susceptibilidade à acriflavina foram avaliados para diferenciação de amostras de *Staphylococcus* coagulase-positivas (SCP) isoladas de mastite bovina. As amostras foram classificadas no gênero *Staphylococcus* por meio da sensibilidade a furazolidona, resistência à bacitracina, produção de ácido em aerobiose a partir de glicerol na presença de $0,4\mu\text{g m}^{-1}$ de eritromicina e catalase, e foram positivas no teste de coagulase do plasma de coelho em tubos. A susceptibilidade à acriflavina foi testada em placas de ágar Baird Parker e ágar P com $7,0\mu\text{g m}^{-1}$ de acriflavina. Como controle dos testes, foram incluídas cinco amostras coagulase-negativas de *S. hyicus* isoladas de leite bovino e identificadas pelo sistema API Staph e a amostra de *S. aureus* ATCC 29213. Trinta e oito das 49 amostras de SCP foram identificadas como *S. aureus* e 11 como *S. hyicus*, não sendo identificada nenhuma como *S. intermedius*. O sistema API Staph foi empregado para confirmar a identificação das amostras coagulase-positivas de *S. hyicus*, sete amostras de *S. aureus* negativas no teste de produção de acetoina e quatro negativas na fermentação anaeróbica do manitol. Todas as amostras de *S. aureus* foram resistentes a acriflavina, enquanto as de *S. hyicus* foram sensíveis. Concluiu-se que a sensibilidade a acriflavina pode ser empregada juntamente com os testes de coagulase e produção de acetoina na diferenciação de SCP isolados de mastite bovina.

Palavras-chave: estafilococos coagulase-positivos, mastite bovina, sensibilidade à acriflavina.

SUMMARY

Production of acetoin, acid production from mannitol under anaerobiosis and β -galactosidase activity in

addition to acriflavin susceptibility were evaluated to differentiate between coagulase-positive strains of *Staphylococcus* (CPS) isolated from bovine mastitis. The strains were classified in the genus *Staphylococcus* by means of sensitivity to furazolidone, resistance to bacitracin, aerobic acid from glycerol in the presence of $0.4\mu\text{g m}^{-1}$ of erythromycin, catalase, and coagulated rabbit plasma by the tube test. The acriflavin susceptibility was tested on Baird Parker and P agar plates containing $7\mu\text{g m}^{-1}$ of acriflavin. Five coagulase-negative *S. hyicus* strains identified by the API Staph system and *S. aureus* ATCC 29213 were used as test controls. Thirty-eight out of the 49 CPS were identified as *S. aureus* and 11 as *S. hyicus*, while *S. intermedius* was not found. The API Staph system was used to confirm the identification of the coagulase-positive strains of *S. hyicus*, seven *S. aureus* strains not producing acetoin and four negative for anaerobic fermentation of mannitol. All the strains identified as *S. aureus* were resistant to acriflavin whereas *S. hyicus* were sensitive. It was concluded that the sensitivity to acriflavin can be used in addition to the tests of coagulase and acetoin production to differentiate CPS isolated from bovine mastitis.

Key words: coagulase-positive staphylococci, bovine mastitis, acriflavin susceptibility.

INTRODUÇÃO

Bactérias de gênero *Staphylococcus* ocupam um papel destacado 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*

¹Farmacêutico Bioquímico, PhD., Pesquisador da Embrapa Gado de Leite, Rua Eugênio do Nascimento, 610, Bairro Dom Bosco, 36033-330, Juiz de Fora, MG. Email: mavpaiva@cnppl.embrapa.br. Autor para correspondência.

²Médico Veterinário, Graduado, Bolsa de Aperfeiçoamento da FAPEMIG (CAG72235/96).

³Médico Veterinário, PhD., Pesquisador da Embrapa Gado de Leite.

al., 1999). As espécies coagulase-negativas, comumente isoladas de leite bovino, são consideradas patógenos secundários e, em geral, causam reação inflamatória moderada na glândula mamária (HARMON & LANGLOIS, 1989; BRAMLEY *et al.*, 1996).

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).

DEVRIESE (1981) descreveu o efeito inibitório da acriflavina para espécies de *Staphylococcus* e relatou que a concentração mínima inibitória para *S. aureus* foi maior do que a das outras espécies. Mais recentemente, ROBERSON *et al.* (1992) avaliaram a susceptibilidade à acriflavina aliada a outros testes para diferenciação de *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus* de diversas espécies animais. Eles recomendaram o teste de produção de β -galactosidase e a resistência à acriflavina em adição à prova de coagulase para diferenciação destas espécies.

A correta identificação de *S. aureus* de mastite bovina é importante tanto do ponto de vista epidemiológico quanto da prevenção das infecções, incluindo a imunoprofilaxia. Neste trabalho, foi avaliado um esquema simplificado composto de três testes junto com a susceptibilidade à acriflavina para diferenciação de *Staphylococcus* coagulase-positivos isolados de mastite bovina.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram examinadas 49 amostras de *Staphylococcus* coagulase-positivas (SCP) isoladas de quartos mamários de vacas com mastite subclínica de 25 rebanhos leiteiros. As bactérias foram isoladas em ágar-sangue com 5% de sangue desfibrinado de carneiro, a partir de amostras de leite

coletadas asepticamente em frascos estéreis, refrigeradas e enviadas ao laboratório para processamento (HARMON *et al.*, 1990). Foram classificadas no gênero *Staphylococcus* com base nos testes de sensibilidade à furazolidona, resistência à bacitracina, produção de ácido em aerobiose a partir de glicerol na presença de $0,4\mu\text{g m}^{-1}$ de eritromicina e de catalase (SCHLEIFER & KLOOS, 1975; BAKER, 1984; BAKER *et al.*, 1986; KLOOS & BANNERMAN, 1995). O teste de produção de coagulase foi feito em tubos, com plasma de coelho obtido com EDTA, de acordo com HARMON *et al.* (1990).

Os testes empregados para diferenciação das espécies coagulase-positivas foram: produção de acetoina, utilização anaeróbica do manitol e produção de β -galactosidase (KLOOS, 1990). A produção de acetoina foi detectada em tubos com caldo à base de pepton e glicose. Após 48 horas de incubação a 37°C , foi feita a primeira leitura, retirando-se $1,0\text{m}^{\ell}$ da cultura e adicionando-se $0,6\text{m}^{\ell}$ de α -naftol a 5% (p/v) em álcool absoluto e $0,2\text{m}^{\ell}$ de hidróxido de potássio a 40% (p/v) (BARROW & FELTHAM, 1995). Quando o resultado foi negativo, os tubos foram mantidos em temperatura ambiente por mais doze dias e, neste período, repetiram-se as leituras de maneira semelhante à primeira. A utilização anaeróbica do manitol foi testada em tubos de ensaio que continha púrpura ágar base (Difco) incubados em sistema Gas Pak.

A atividade da β -galactosidase foi determinada de acordo com HENDRICKSON (1985), empregando-se como substrato 2-naftil- β -D-galactopiranosídeo (Sigma). Suspensões das bactérias em água peptonada que continha o substrato foram incubadas durante uma hora a 37°C e, em seguida, adicionou-se uma gota da solução de "fast blue" (cloreto de 4-benzoil-amino-2,5-dietoxibenzenodiazonium, Sigma) a 0,35% em 2-metoxietanol (p/v). Um cultivo da bactéria *Escherichia coli*, tratado de modo semelhante ao das amostras de SCP, foi usado como controle positivo (KLOOS & BANNERMAN, 1995).

A sensibilidade à acriflavina foi avaliada em placas de ágar P (PHILLIPS & NASH, 1985) e de Baird Parker suplementadas com emulsão de gema de ovo e telurito. Antes de verter os meios, uma solução de acriflavina foi adicionada para dar a concentração final de $7\mu\text{g m}^{-1}$ (DEVRIESE, 1981). O inóculo foi uma suspensão em caldo soja tripticaseína de um cultivo de 18 horas em ágar-sangue, padronizado com o tubo 0,5 da escala de MacFarland. Placas com acriflavina e sem

acriflavina foram inoculadas com a mesma suspensão de cada amostra e foram examinadas após 24 e 48 horas de incubação a 35°C. Amostras que apresentaram crescimento somente nas placas sem acriflavina foram consideradas sensíveis.

O sistema comercial de identificação de estafilococos, API Staph (Bio Mérieux) foi utilizado para identificar todas as amostras que deram resultado negativo nos testes de produção de acetoina e na utilização anaeróbica do manitol. Este sistema é composto por galerias com substrato para os seguintes testes: utilização de glicose, frutose, manose, maltose, lactose, trealose, manitol, xilitol, melibiose, rafinose, xilose, sacarose, alfa-metil-glicosídeo, N-acetil-glicosamina, redução do nitrato, produção de acetoina, fosfatase alcalina, arginina dihidrolase e urease.

Foram incluídas como controle a amostra de *S. aureus* ATCC 29213 e cinco amostras coagulase-negativas de *S. hyicus* isoladas de leite bovino e identificadas previamente pelo sistema API Staph.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos testes para diferenciação das amostras coagulase-positivas são apresentados na tabela 1. Trinta e oito das 49 amostras foram identificadas como *S. aureus* e as 11 restantes como *S. hyicus*. As amostras de *S. aureus* apresentaram variabilidade em dois dos testes empregados: 7 foram negativas na produção de acetoina e quatro na fermentação do manitol, sendo esta variação de somente um teste por amostra.

O teste de produção de acetoina é de fácil execução, de baixo custo e considerado uma característica chave para a espécie *S. aureus* (KLOOS, 1990). Entretanto, apresenta a

desvantagem de necessitar de incubação prolongada, o que retarda a obtenção do resultado e dificulta sua utilização na rotina do diagnóstico. Empregando um teste semelhante ao utilizado neste trabalho, TALAN *et al.* (1989) encontraram 100% de positividade em 14 amostras de *S. aureus* de origem canina e ROBERSON *et al.* (1992), 6% de amostras negativas em 80 amostras de *S. aureus* isoladas de diversas espécies animais e do homem. A possibilidade de se obter resultados negativos para *S. aureus* nesta prova demonstra a necessidade de se empregar um outro teste além da acetoina e coagulase para diferenciar os SCP isolados de mastite bovina.

A fermentação anaeróbica do manitol é considerada também uma característica chave de *S. aureus*, com 90% ou mais das amostras apresentando reação positiva (KLOOS, 1990). O resultado negativo obtido com as quatro amostras, foi confirmado após repetição do teste. Resultados negativos neste teste com *S. aureus* foram relatados também por ROBERSON *et al.* (1992), embora em proporções menores (1%). Tanto as sete amostras negativas na produção de acetoina quanto as quatro negativas na fermentação anaeróbica do manitol foram identificadas pelo sistema API, confirmando a classificação como *S. aureus*.

As 11 amostras de SCP identificadas como *S. hyicus* apresentaram resultados negativos na produção de acetoina, atividade de β -galactosidase e fermentação do manitol. Todas confirmaram esta identificação pelo sistema API.

No teste de sensibilidade a acriflavina, todas as amostras de *S. aureus* foram resistentes na concentração de $7\mu\text{g mL}^{-1}$ nos meios ágar P e Baird Parker, enquanto as amostras de *S. hyicus* foram sensíveis, isto é, somente apresentaram crescimento nas placas sem acriflavina. O teste realizado no ágar P permitiu obter o resultado após 18 a 24 horas de incubação, enquanto no ágar Baird Parker foram necessárias mais 24 horas de incubação para a leitura. Estes resultados estão de acordo com os relatados por DEVRIESE (1981) e ROBERSON *et al.* (1992) e indicam a possibilidade de se usar a sensibilidade a acriflavina como um teste adicional para diferenciação dos SCP isolados de mastite bovina.

Dentre as amostras de SCP analisadas neste trabalho, nenhuma foi identificada como *S. intermedius*, que tem sido isolado de diversas espécies animais, principalmente do cão (TALAN *et al.*, 1989; DEVRIESE, 1990). Seu papel como agente da mastite bovina tem sido questionado, pois seu isolamento de rebanhos leiteiros tem sido muito baixo

Tabela 1 - Porcentagem de resultados positivos nos testes de utilização anaeróbica do manitol, produção de β -galactosidase, crescimento nos meios P ágar e Baird Parker com $7\mu\text{g mL}^{-1}$ de acriflavina de 49 amostras de *Staphylococcus* coagulase positivos.

Espécies de <i>Staphylococcus</i>	Produção de acetoina	Fermentação anaeróbica do Manitol	Atividade de β -galactosidase	P ágar ¹	BP ¹
<i>S. aureus</i>	81,6	89,5	0	100	100
CP <i>S. hyicus</i> ²	0	0	0	0	0
CN <i>S. hyicus</i>	0	0	0	0	0
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	+	+	-	+	+

¹ P ágar e Baird Parker (BP) suplementados com $7\mu\text{g mL}^{-1}$ de acriflavina.

² CP: coagulase-positivo; CN: coagulase-negativo

ou ausente (LANGLOIS *et al.*, 1984; JASPER *et al.*, 1985; WATTS & OWENS, 1989; ROBERSON *et al.*, 1996).

De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que os meios de cultivo ágar P e Baird Parker com acriflavina podem ser usados, em conjunto com os testes de produção de coagulase e acetoina, para diferenciação dos SCP isolados de infecção intramamária bovina. Os testes de produção de β -galactosidase e utilização anaeróbica do manitol são também úteis porque o primeiro dá resultado positivo somente para *S. intermedius* e o segundo somente para *S. aureus* (KLOOS, 1990, ROBERSON *et al.*, 1992, KLOOS & BANNERMAN, 1995). Contudo, estes testes são de custo mais elevado e há a necessidade de anaerobiose para a fermentação do manitol, nem sempre disponível. O teste de sensibilidade à acriflavina é um método simples e rápido, que pode ser usado por laboratórios que possuem poucos recursos para a correta identificação de SCP isolados da glândula mamária de vacas.

AGRADECIMENTO

Os autores agradecem o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (CAG 2235/96).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAKER, J.S. Comparison of various methods for the differentiation of staphylococci and micrococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v.19, p.875-879, 1984.
- BAKER, J.S., HACKETT, M.F., SIMARD, D.J. Variations in bacitracin susceptibility in *Staphylococcus* and *Micrococcus* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v.23, p.963-964, 1986.
- BARROW, G.I., FELTHAM, R.K.A. **Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria**. 3 ed. Cambridge : Cambridge University, 1995. 331p.
- 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.
- BRAMLEY, A.J., CULLOR, J.S., ERSKINE, R.J., *et al.* **Current concepts of bovine mastitis**. 4ed. Madison : National Mastitis Council, 1996. 64p.
- 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**, v.51, n.2, p.129-135, 1999.
- DEVRIESE, L.A. Baird-Parker medium supplemented with acriflavine, polymyxins and sulphonamide for the selective isolation of *Staphylococcus aureus* from heavily contaminated materials. **Journal of Applied Bacteriology**, v.50, p.351-357, 1981.
- DEVRIESE, L.A. Staphylococci in health and diseased animals. **Journal of Applied Bacteriology**, Supplement, v.69, n.19, p.71S-80S, 1990.
- 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. 34p.
- HARMON, R.J., LANGLOIS, B.E. Mastitis due to coagulase-negative *Staphylococcus* species. **Agri-Practice**, v.10, n.1, p.29-34, 1989.
- HENDRICKSON, D.A. Reagents and stains. In: LENNETTE, E.H., BALOWS, A., HAUSLER JR., W.J., *et al.* (ed) **Manual of clinical microbiology**. 4 ed. Washington, D.C. : American Society for Microbiology, 1985. p.1093-1107.
- JASPER, D.E., INFANTE, F., DELLINGER, J.D. Relationships among the results of coagulase, staphylococcal toxin, and thermonuclease tests on staphylococci from cow milk. **Journal of Clinical Microbiology**, v.21, p.582-584, 1985.
- KLOOS, W.E. Systematics and the natural history of staphylococci. **Journal of Applied Bacteriology**, Supplement, 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**. 6ed. Washington, D.C. : American Society for Microbiology, 1995. p.282-298.
- LANGLOIS, B.E., HARMON, R.J., AKERS, K. Identification of *Staphylococcus* species of bovine origin with the DMS Staph-Trac System. **Journal of Clinical Microbiology**, v.20, p.227-230, 1984.
- PHILLIPS, E., NASH, P. Culture media. In: LENNETTE, E.H., BALOWS, A., HAUSLER JR., W.J., *et al.* (ed) **Manual of clinical microbiology**. 4ed. Washington, D.C. : American Society for Microbiology, 1985. p.1051-1092.
- ROBERSON, J.R., FOX, L.K., HANCOCK, D.D., *et al.* Evaluation of methods for differentiation of coagulase-positive staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v.30, p.3217-3219, 1992.
- ROBERSON, J.R., FOX, L.K., HANCOCK, D.D. Prevalence of coagulase-positive staphylococci, other than *Staphylococcus aureus*, in bovine mastitis. **American Journal of Veterinary Research**, v.57, n.1, p.54-58, 1996.
- SCHLEIFER, K.H., KLOOS, W.E. A simple system for the separation of staphylococci from micrococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v.1, p.337-338, 1975.
- 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**, v.27, n.1, p.78-81, 1989.
- WATTS, J.L. Etiological agents of bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v.16, p.41-66, 1988.
- WATTS, J.L., OWENS, W.E. Prevalence of staphylococcal species in four dairy herds. **Research in Veterinary Science**, v.46, p.1-4, 1989.