



Ciência Rural

ISSN: 0103-8478

cienciarural@mail.ufsm.br

Universidade Federal de Santa Maria  
Brasil

Brito Vasconcelos Paiva, Maria Aparecida; Campos de Magalhães, Glênia Maria; Brito Renaldi  
Feitosa, José  
Esquema simplificado para identificação de estafilococos coagulase-positivos isolados de mastite  
bovina  
Ciência Rural, vol. 32, núm. 1, janeiro-fevereiro, 2002, pp. 79-82  
Universidade Federal de Santa Maria  
Santa Maria, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33132114>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica  
Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal  
Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

## 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 Brito<sup>1</sup> Glênia Maria de Magalhães Campos<sup>2</sup>  
José Renaldi Feitosa Brito<sup>3</sup>

#### RESUMO

Os testes de produção de acetoina, determinação da atividade da enzima  $\beta$ -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  $0,4\mu\text{g mL}^{-1}$  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  $7,0\mu\text{g mL}^{-1}$  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  $\beta$ -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  $0.4\mu\text{g mL}^{-1}$  of erythromycin, catalase, and coagulated rabbit plasma by the tube test. The acriflavin susceptibility was tested on Baird Parker and P agar plates containing  $7\mu\text{g mL}^{-1}$  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*

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

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

<sup>3</sup>Médico 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  $\beta$ -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-positivos (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 assepticamente 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  $0,4\mu\text{g mL}^{-1}$  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  $\beta$ -galactosidase (KLOOS, 1990). A produção de acetoina foi detectada em tubos com caldo à base de peptona e glicose. Após 48 horas de incubação a  $37^{\circ}\text{C}$ , foi feita a primeira leitura, retirando-se  $1,0\text{mL}$  da cultura e adicionando-se  $0,6\text{mL}$  de  $\alpha$ -naftol a 5% (p/v) em álcool absoluto e  $0,2\text{mL}$  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  $\beta$ -galactosidase foi determinada de acordo com HENDRICKSON (1985), empregando-se como substrato 2-naftil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (Sigma). Suspensões das bactérias em água peptonada que continha o substrato foram incubadas durante uma hora a  $37^{\circ}\text{C}$  e, em seguida, adicionou-se uma gota da solução de "fast blue" (cloreto de 4-benzil-amino-2,5-dietoxibenzenodiazônio, 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  $7\mu\text{g mL}^{-1}$  (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  $\beta$ -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  $\beta$ -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 $\beta$ -galactosidase	P ágar <sup>1</sup>	BP <sup>1</sup>
<i>S. aureus</i>	81,6	89,5	0	100	100
CP <i>S. hyicus</i> <sup>2</sup>	0	0	0	0	0
CN <i>S. hyicus</i>	0	0	0	0	0
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	+	+	-	+	+

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

<sup>2</sup> 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  $\beta$ -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.