

08978

CNPGL

1999

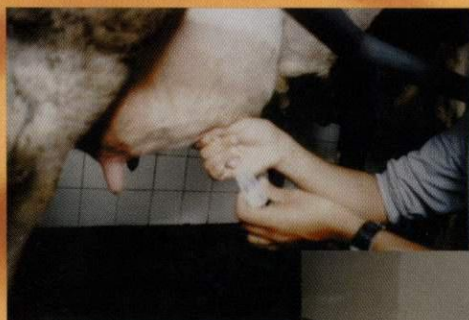
FL-08978

ISSN 1517-4816

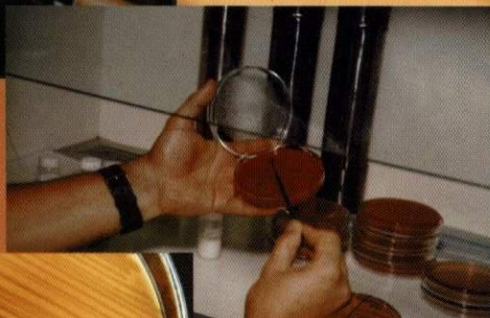
Dezembro, 1999

Circular Técnica 55

Diagnóstico microbiológico da mastite



Maria Aparecida V. Paiva e Brito
José Renaldi Feitosa Brito



Diagnóstico microbiológico da

1999

FL-08978



35129-1

brapa

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL

Presidente

Fernando Henrique Cardoso

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO

Ministro

Marcus Vinícius Pratini de Moraes

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA

Presidente

Alberto Duque Portugal

Diretoria

Dante Daniel Giacomelli Scolari

Elza Ângela Battaggia Brito da Cunha

José Roberto Rodrigues Peres

Embrapa Gado de Leite

Chefe-Geral

Airdem Gonçalves de Assis

Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Oriel Fajardo de Campos

Chefe Adjunto de Comunicação e Negócios

Limirio de Almeida Carvalho

Chefe Adjunto de Administração

Aloísio Teixeira Gomes



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Gado de Leite
Ministério da Agricultura e do Abastecimento*

FL 08978

ISSN 1517-4816

CIRCULAR TÉCNICA Nº 55

Dezembro, 1999

DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DA MASTITE

*Maria Aparecida Vasconcelos Paiva e Brito
José Renaldi Feitosa Brito
Pesquisadores da Embrapa Gado de Leite*

Embrapa Gado de Leite
Área de Comunicação Empresarial - ACE
Juiz de Fora - MG

Embrapa Gado de Leite - ACE. Circular Técnica, 55
Exemplares desta publicação podem ser solicitados a:
Embrapa Gado de Leite
Área de Negócios Tecnológicos - ANT
Rua Eugênio do Nascimento, 610 - Dom Bosco
36038-330 Juiz de Fora, MG
Telefone: (32)249-4700
Fax: (32)249-4751
e-mail: cnpgl@cnpgl.embrapa.br
home page: <http://www.cnpgl.embrapa.br>

Tiragem: 1.000 exemplares

COMITÊ LOCAL DE PUBLICAÇÕES

Oriel Fajardo de Campos (Presidente)
Maria Salete Martins (Secretária)
Jackson Silva e Oliveira
José Valente
Leônidas P. Passos
Limirio de Almeida Carvalho
Luiz Carlos Takao Yamaguchi
Maria Aparecida V.P. Brito
Maria de Fátima Ávila Pires
Maurílio José Alvim

ARTE, COMPOSIÇÃO E DIAGRAMAÇÃO

Angela de Fátima Araújo Oliveira

CAPA

Cabaret Voltaire Design e Multimídia

REVISÃO LINGÜÍSTICA

Newton Luís de Almeida

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Maria Salete Martins

BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F. **Diagnóstico microbiológico da mastite.** Juiz de Fora, MG: Embrapa Gado de Leite, 1999. 26p. (Embrapa Gado de Leite. Circular Técnica, 55).

Mastite; Diagnóstico microbiológico; Bovinos de leite.
ISSN 1517-4816

CDD. 636.0896992

APRESENTAÇÃO

A mastite é uma inflamação da glândula mamária, causada primariamente pela infecção por microrganismos patogênicos. É uma doença multifatorial, sendo o resultado da interação dos agentes infecciosos, do animal e do ambiente, que inclui, por exemplo, as instalações, o homem e o manejo da ordenha e dos animais. Neste contexto, é importante conhecer os principais agentes da mastite, como estes se distribuem no meio ambiente e entre os animais, pois um programa de controle deve considerar os microrganismos que causam problema para os rebanhos.

Esta publicação tem a finalidade de apresentar aspectos relacionados ao diagnóstico microbiológico da mastite, tais como os passos para a coleta de amostras de leite para o exame microbiológico; as características dos principais agentes, orientações sobre procedimentos laboratoriais, conveniência e interpretação do antibiograma. Espera-se que estas informações possam ser úteis para os profissionais envolvidos com o controle da mastite no campo, para estudantes e por aqueles envolvidos na prática laboratorial do diagnóstico microbiológico da mastite.

Os Autores

Sumário

Apresentação

1. Introdução	7
2. Exames de casos clínicos	7
3. Cultura do leite para avaliação do rebanho	8
4. Cultura do leite total do rebanho	10
5. Coleta das amostras de leite	11
6. Identificação dos patógenos da mastite	12
7. Cocos gram-positivos, catalase positivos	13
8. Cocos gram-positivos, catalase negativos	14
9. Bactérias gram-negativas	16
10. Bastonetes gram-positivos	17
11. Outros microrganismos	17
12. Amostras contaminadas	18
13. Antibiógrama	19
14. Procedimentos para a coleta de leite para exame microbiológico	23
14.1 Material necessário	23
14.2 Quando coletar as amostras	23
14.3 Preparação das tetas	23
14.4 Coleta das amostras	24
14.5 Manutenção das amostras	25
14.6 Informações sobre as amostras	25
15. Literatura consultada	25

1. INTRODUÇÃO

A etiologia da mastite é complexa e multivariada. A identificação dos microrganismos que causam infecção da glândula mamária é importante, tanto para a implementação de métodos de controle e prevenção, quanto para o monitoramento de rebanhos. A identificação dos agentes da mastite é realizada por meio de culturas de amostras de leite obtidas de quartos mamários individuais, ou de amostras compostas de todos os quartos mamários de cada vaca.

O principal objetivo do diagnóstico microbiológico da mastite é oferecer resultados rápidos e seguros ao veterinário, para que ele possa identificar problemas do rebanho e tomar decisões a respeito de casos individuais. Nesse sentido, é de fundamental importância que o técnico responsável pelo diagnóstico laboratorial tenha conhecimento dos agentes da mastite, para que possa fazer a correta interpretação dos microrganismos isolados e utilizar testes de identificação, que levem a informações úteis, para o direcionamento de medidas de controle.

Um conceito básico para o diagnóstico microbiológico é a identificação dos patógenos da mastite como contagiosos (ex.: *Streptococcus agalactiae* ou *Staphylococcus aureus*) ou do ambiente (ex.: coliformes, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus bovis*). Assim, enquanto para alguns organismos (ex.: *S. agalactiae*) é fundamental a identificação da espécie, para outros, é suficiente caracterizar o gênero ou o grupo a que eles pertencem (ex.: *Streptococcus* sp, do ambiente e coliformes). De modo semelhante, a diferenciação dos *Staphylococcus* em coagulase negativos e coagulase positivos é necessária para separar *S. aureus* (coagulase positivo) do grande número dos *Staphylococcus* coagulase negativos, que são considerados patógenos secundários da mastite. De posse dessas informações, o veterinário pode recomendar medidas diferenciadas de controle e sugerir alterações a respeito do manejo do rebanho.

2. EXAMES DE CASOS CLÍNICOS

O exame de quartos mamários individuais pode ser necessário para o caso de infecções severas, que não respondem à terapia, para a decisão sobre o descarte de um determinado animal por problemas de mastite e para o monitoramento dos casos clínicos do rebanho. O exame microbiológico de amostras de leite de todos os casos clínicos

fornece informações importantes para a determinação de estratégias de manejo e prevenção de novos casos. O ideal é examinar o leite de todos os quartos mamários com mastite clínica antes do início de qualquer tratamento. As amostras coletadas devem ser mantidas refrigeradas e enviadas ao laboratório até 24 horas após a coleta. Caso não se possa enviá-las para o laboratório neste período, pode-se mantê-las congeladas por até 30 a 45 dias antes do exame. O congelamento diminui o número de *Escherichia coli* e inativa bactérias do gênero *Nocardia*, mas os outros agentes não são afetados.

Amostras de leite de casos de mastite clínica podem dar resultados negativos após cultivo microbiológico em 25 a 30% dos casos. Com alguns microrganismos, por exemplo, os coliformes, o número de bactérias na amostra pode ser muito baixo para ser detectado pelos métodos de rotina. Em outros casos, a infecção pode já ter sido eliminada, mas persiste uma elevada contagem de células, porque a cura das lesões não se completou e os leucócitos continuam se movendo em direção à glândula mamária. Contudo, quando amostras de leite de um rebanho são sempre negativas na cultura, deve-se pensar, também, na possibilidade de um microrganismo não comum, que não cresce normalmente nos meios de cultivo usados na rotina laboratorial como, por exemplo, espécies de *Mycoplasma*.

3. CULTURA DO LEITE PARA AVALIAÇÃO DO REBANHO

O melhor modo de se conhecer o estado microbiológico do rebanho é realizando a cultura de todos os quartos mamários individuais. Isto permite a identificação dos agentes e do nível de infecção do rebanho. Apresenta a desvantagem do custo elevado dos exames. Uma alternativa para a redução dos custos é a cultura de amostras compostas de todos os quartos de uma mesma vaca.

O número de animais e (ou) amostras a serem analisadas depende das questões a serem respondidas em cada rebanho. Em rebanhos com contagens de células elevadas (ou com grande número de quartos mamários com reações positivas no "California Mastitis Test", CMT), o problema, geralmente, é a alta prevalência de infecções subclínicas. Nestes rebanhos, a avaliação das infecções presentes pode ser feita pela cultura de uma amostragem de quartos mamários com base nos escores do CMT. Nestes casos, o gasto com exames microbiológicos é reduzido, mas pode não identificar animais infectados

que apresentam baixa contagem de células somáticas ou resultados negativos no CMT. Na Tabela 1 são apresentados resultados de exames microbiológicos de todos os quartos mamários das vacas em lactação de quatro rebanhos, de acordo com os escores do CMT. O número de vacas dos quatro rebanhos foi 115, correspondendo a 452 quartos mamários (havia quatro quartos mamários afuncionais). Como pode ser observado, quartos mamários com escore negativo no CMT podem estar infectados com patógenos primários da mastite: *S. aureus* e *S. agalactiae*. Portanto, a seleção de somente animais com escore positivo no CMT para cultura do leite não identificaria esses casos.

Tabela 1. Microrganismos isolados em amostras de leite obtidas de todos os quartos mamários em quatro rebanhos em relação aos escores do "California Mastitis Test" (CMT)¹.

Resultados das culturas	Escore do CMT					Total
	Neg	Traço	+	++	+++	
<i>Staphylococcus aureus</i>	23	4	11	9	42	89
<i>Staphylococcus</i> coagulase negativos	20	4	9	2	12	47
<i>Streptococcus agalactiae</i>	10	1	8	4	18	41
<i>Streptococcus</i> esculina positivos	0	0	0	0	1	1
<i>Streptococcus</i> esculina negativos	0	1	1	0	1	3
Diferóides ²	57	10	14	7	7	95
Materiais contaminados	9	0	0	0	1	10
Sem crescimento ³	166	4	9	0	4	183
Total	285	24	52	22	86	469

¹ Dados dos autores.

² Foram classificados como diferóides os bastonetes gram-positivos, com características morfológicas e coloniais de *Corynebacterium bovis*.

³ Material contaminado: houve crescimento de mais de três tipos diferentes de colônias.

Para os rebanhos que apresentam baixa contagem de células no leite total (ou com resultado de CMT negativo), o exame microbiológico do leite de todos os casos clínicos antes de iniciar o tratamento forne-

cerá indicações sobre os problemas do rebanho que estão contribuindo para a ocorrência de mastite. Na Tabela 2 são apresentadas as vantagens e as desvantagens de cada método de amostragem para avaliação de rebanhos.

Tabela 2. Número e tipo de amostras de leite a serem coletadas para exame microbiológico para avaliação de rebanhos para mastite.

Tipo de amostragem	Vantagens	Desvantagens
1. Todos os quartos mamários individuais	Conhecimento do nível e tipo das infecções presentes	Custo elevado
2. Somente quartos com mastite subclínica (CMT positivos ou altas contagens de células)	Custo mais baixo e exame de quartos com maior probabilidade de estarem infectados	Não identifica quartos mamários infectados que possuem baixa contagem de célula (ver Tabela 1)
3. Somente casos clínicos	Conhecimento das causas clínicas	Pode não ser suficiente para identificar o(s) problema(s) do rebanho
4. Amostras ao acaso	Custo mais baixo. Fornece informação parcial sobre tipos de infecções presentes	Se o número de amostras for pequeno, podem ser perdidas algumas infecções
5. Amostras do leite total do rebanho (leite do tanque)	Permite monitorar mastite contagiosa	Fornecer informação limitada a respeito das infecções do rebanho

4. CULTURA DO LEITE TOTAL DO REBANHO

A cultura de amostra do leite total do rebanho (leite do tanque) pode ser realizada para monitoramento de vários rebanhos, ou para a avaliação de um rebanho em particular. É feita tomando-se uma amostra do leite total do tanque de armazenamento na fazenda, dos latões ou na plataforma de recepção da indústria, no momento da pesagem. Para isto, deve-se homogeneizar o leite totalmente, isto é, agitar por aproximadamente cinco minutos, e retirar a amostra da parte superior e central do tanque. Para fazer o exame, são empregados meios de cultura seletivos para estreptococos, estafilococos e coliformes.

A cultura do leite total tem pouco significado para agentes do

ambiente como coliformes ou *Pseudomonas*. A presença destes agentes na amostra não significa necessariamente que eles estejam causando mastite nos animais. Contudo, se são isolados *S. aureus* ou *S. agalactiae*, pode-se ter certeza de que estes organismos vieram do úbere de pelo menos uma vaca. Os dados obtidos deste tipo de exame não podem ser usados para estimar a proporção de vacas infectadas no rebanho. Deve-se notar, também, que quando esses organismos não são isolados, não significa que estejam ausentes, pelo efeito da diluição que ocorre quando se mistura o leite de todo o rebanho. Além disso, glândulas infectadas com *S. aureus*, nem sempre eliminam grande número de bactérias. Alguns autores recomendam que um rebanho seja considerado negativo somente após três ou quatro exames consecutivos (Tabela 3).

Quando há elevada presença de coliformes ou outro microrganismo do ambiente nas amostras do tanque, deve-se suspeitar de contaminação do leite após a ordenha.

5. COLETA DAS AMOSTRAS DE LEITE

Devido à grande variedade de patógenos que podem causar mastite, é essencial, para o diagnóstico seguro e correto, que todas as amostras submetidas para exame laboratorial sejam coletadas assepticamente, e em frascos estéreis. A contaminação das amostras de leite, por microrganismos localizados no canal ou orifício da teta ou microrganismos do ambiente, é um problema para o diagnóstico.

Antes de coletar a amostra, as tetas devem ser limpas com algodão embebido com álcool a 70% e os primeiros jatos devem ser descartados. As tetas mais distantes do indivíduo que está fazendo a coleta do leite devem ser higienizadas primeiro, para evitar que se recontaminem durante o processo de limpeza e antisepsia. Quando as tetas estiverem secas, inicia-se a coleta pelas mais próximas.

Imediatamente à coleta, as amostras devem ser colocadas em recipientes com gelo (temperatura 4-5 °C) e mantidas nestas condições até serem entregues no laboratório. Amostras que permanecem mais de 24 horas à temperatura ambiente ou na geladeira não devem ser utilizadas para diagnóstico bacteriológico. A refrigeração é importante para impedir o crescimento de contaminantes, pois as diferenças existentes, no tempo de crescimento entre gêneros e espécies de microrganismos, podem permitir que a população de um contaminante

sobreponha a do patógeno de interesse. Por essa razão, é recomendado o congelamento das amostras quando não podem ser encaminhadas imediatamente ao laboratório. No laboratório, deve-se examinar primeiro o aspecto de cada amostra e, em seguida, proceder à cultura.

Os procedimentos detalhados para coleta do leite para exame microbiológico são apresentados no final deste documento.

Tabela 3. Resultados de isolamento de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* em três amostras consecutivas do leite do tanque e de amostras obtidas de todos os quartos mamários de quatro rebanhos¹.

Rebanhos (total de animais)	Bactérias	Nº de animais infectados no rebanho (%)	Nº de quartos infectados no rebanho (%)	Amostras do tanque ²		
				1ª Coleta	2ª Coleta	3ª Coleta
A (55)	<i>S. aureus</i>	01 (1,8%)	02 (0,90%)	+	+	+
	<i>S. agalactiae</i>	01 (1,8%)	01 (0,46%)	.	+	.
B (52)	<i>S. aureus</i>	10 (19,2%)	12 (5,9%)	+	+	+
	<i>S. agalactiae</i>	0	0	.	.	.
C (47)	<i>S. aureus</i>	08 (17,0%)	10 (5,4%)	.	.	+
	<i>S. agalactiae</i>	05 (10,6%)	07 (3,8%)	+	.	+
D (119)	<i>S. aureus</i>	10 (8,4%)	10 (2,2%)	+	+	+
	<i>S. agalactiae</i>	10 (8,4%)	17 (3,7%)	+	+	+

¹ Dados dos autores

² Os sinais positivo e negativo indicam, respectivamente, isolamento e não-isolamento de *S. aureus* ou *S. agalactiae*.

6. IDENTIFICAÇÃO DOS PATÓGENOS DA MASTITE

Para a inoculação das amostras de leite recomenda-se a utilização de meio de cultura não-seletivo, como o ágar-sangue. Este é o meio sólido mais útil para o isolamento porque permite diferenciação adequada das colônias. Às vezes, há necessidade de se usar hemácias lavadas (de ovino ou de bovino) na composição do meio, para a observação da hemólise de *S. aureus*. Isto porque pode haver anticorpos antialfa e (ou) antibeta hemolisinas no soro do animal doador do sangue, prejudicando a avaliação das colônias e o teste de CAMP (Christie, Atkins e Munch-Peterson).

Pode-se acrescentar 0,1% de esculina e beta-hemolisina de *S. aureus* ao ágar-sangue. Desse modo obtêm-se os resultados de hidrólise da esculina e do teste de CAMP já no isolamento primário, agilizando a identificação de *S. agalactiae*.

Depois da inoculação das amostras de leite, as placas de ágar-sangue são examinadas após 18 a 24 horas de incubação, mas o diagnóstico final é feito após 48 horas de incubação. É necessário examinar e interpretar as placas com cuidado, em razão dos microrganismos contaminantes comuns que surgem nos exames, especialmente quando as condições de coleta não são adequadas. Os contaminantes geralmente se desenvolvem mais rápido e interferem com o resultado do diagnóstico. Na interpretação das placas de isolamento primário, considera-se que houve problema de contaminação na coleta da amostra, se três ou mais tipos diferentes de colônias são isoladas de um quarto mamário. Microrganismos do ambiente devem ser isolados em cultura pura para serem considerados responsáveis pela infecção, enquanto *S. agalactiae*, *S. aureus* e *Mycoplasma* sp. são considerados sempre que isolados. Se há problema de contaminação, deve-se examinar uma nova amostra do mesmo quarto mamário para a conclusão do diagnóstico. O esquema para investigação dos agentes da mastite é apresentado na Figura 1.

Após o isolamento inicial, o exame de esfregaços corados pelo método de Gram para verificar a morfologia e a coloração do organismo isolado é o primeiro passo para separar os grupos de microrganismos. A separação em Gram-positivos e Gram-negativos pode também ser feita usando-se KOH a 3%. Posteriormente, os cocos Gram-positivos são diferenciados pelo teste da catalase: positivo para o gênero *Staphylococcus* e negativo para *Streptococcus*.

7. COCOS GRAM-POSITIVOS, CATALASE POSITIVOS

A produção de coagulase é usada para classificar as bactérias do gênero *Staphylococcus* em dois grupos: os coagulase positivos e os negativos. Dentre os coagulase positivos são classificados: *S. aureus*, *S. intermedius* e algumas amostras de *S. hyicus*. *S. intermedius* é raramente isolado do leite de quartos mamários de vacas sadias ou com mastite. Para os propósitos de prevenção e controle da mastite, uma amostra coagulase positiva pode ser o *S. aureus* e, para se ter certeza, podem ser realizados testes confirmatórios de aglutinação em lâmina, com antígenos disponíveis comercialmente ou por meio dos testes citados na Tabela 4.

Infecções intramamárias por *S. aureus* podem escapar ao isolamento primário devido ao padrão de eliminação da bactéria no leite e pela sua localização dentro dos neutrófilos. Em um trabalho de pesqui-

sa em que se examinaram amostras consecutivas de leite de glândulas mamárias reconhecidamente infectadas por *S. aureus*, somente 74% das infecções foram detectadas após um único exame. A chance do isolamento aumentou para 94% e 98%, incluindo uma segunda e terceira amostra consecutiva, respectivamente. No caso de localização intracelular dos microrganismos, o congelamento e descongelamento do leite causa a lise dos neutrófilos, facilitando o isolamento.

Tabela 4. Testes para identificação dos estafilococos coagulase positivos.

Testes	<i>S. aureus</i>	<i>S. hyicus</i>	<i>S. intermedius</i>
Coagulase	+	d ¹	+
Hemólise	+ ²	.	d
Acetoina	+	.	.
D-manitol	+	.	(d)
Pigmento	+ (90%)	.	.
Beta-glucuronidase	.	+	.

¹: d: 10 a 89% dão reação positiva; parênteses significa reação retardada.

²: menos de 5% das amostras de *S. aureus* isoladas de mastite não apresentam hemólise.

Staphylococcus coagulase negativos são organismos considerados habitantes normais da pele dos animais. A colonização ocorre logo após o nascimento e muitas espécies têm sido isoladas do leite. Eles são isolados mais freqüentemente da glândula mamária aparentemente normal. As espécies isoladas com maior freqüência de mastite são: *S. epidermidis*, *S. chromogenes*, *S. simulans*, *S. warneri*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. xilosus*, *S. lentus* e *S. sciuri*. Microrganismos do gênero *Micrococcus* são raramente isolados de amostras de leite fresco.

A identificação das espécies de *Staphylococcus* coagulase negativos é mais difícil de ser realizada rotineiramente. Recomenda-se a identificação dessas espécies quando estes organismos são isolados de mastite clínica, de amostras de leite com contagens de células elevadas e quando há repetidos isolamentos em cultura pura da mesma amostra.

8. COCOS GRAM-POSITIVOS, CATALASE NEGATIVOS

Faz parte deste grupo microrganismos do gênero *Streptococcus*, que são uma causa comum de mastite bovina. Diferentes espécies de *Streptococcus* estão relacionadas como agentes da mastite. Do ponto

de vista do diagnóstico e controle, é extremamente importante diferenciar *S. agalactiae* dos demais, porque este pode ser erradicado dos rebanhos, enquanto as outras espécies não podem, e não respondem às mesmas medidas de prevenção e controle.

Nas infecções por *S. agalactiae*, grande número de bactérias é eliminado de quartos mamários com infecção crônica, mas, ocasionalmente, poucos organismos são secretados, dificultando o isolamento quando se cultiva apenas uma amostra. A identificação de *S. agalactiae* pode ser feita com base nas características coloniais e hemolíticas, na reação de CAMP positiva e no resultado negativo na hidrólise da esculina. Cerca de 3% das amostras de *S. agalactiae* beta-hemolíticos podem dar o teste de CAMP negativo. Por essa razão, as amostras com estas características devem ser testadas sorologicamente para verificar se pertencem ao grupo B de Lancefield, quando então devem ser classificadas como *S. agalactiae*.

Dentre as outras espécies de *Streptococcus*, *S. dysgalactiae* é também isolado com frequência de mastite bovina, não hidrolisa a esculina e não apresenta reação positiva no teste de CAMP. O grupo de *Streptococcus* sp. do ambiente tem em comum a propriedade de hidrolisar a esculina, sendo por isso dada a designação de estreptococos esculina positivos aos *Streptococcus* ambientais. A exceção é o *S. dysgalactiae* (esculina negativo), que é considerado tanto do ambiente, como contagioso. Dentre os *Streptococcus* que hidrolisam a esculina, se incluem: *S. bovis*, *S. uberis*, *S. equinus*, *S. saccharolyticus* e o gênero *Enterococcus*. Na Tabela 5 estão indicados sumariamente alguns testes para diferenciação das principais espécies de *Streptococcus*. *S. bovis* pode ser diferenciado também pela capacidade de crescer em ágar com 40% de bile e esculina.

Tabela 5. Identificação de algumas espécies de microrganismos do gênero *Streptococcus* e *Enterococcus* isolados de mastite bovina.

Espécies	CAMP	Esculina	Hipurato de sódio	Cresc. em 6,5% de NaCl	Cresc. a 45 °C	Cresc. em meio de bile-esculina	Grupo de Lancefield
<i>S. agalactiae</i>	+	-	+	d	-	-	B
<i>S. dysgalactiae</i>	-	d	-	-	-	-	C
<i>S. uberis</i>	d ¹	+	+	-	-	-	m ²
<i>S. bovis</i>	-	+	-	-	+	+	D
<i>Enterococcus</i> sp.	-	+	d	+	+	+	D

¹ d: reação variável: 10 a 89% de amostras positivas

² m: sorologicamente heterogêneo.

9. BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS

Grande número de bactérias Gram-negativas podem causar mastite bovina. Elas apresentam a forma de bastonetes ou coco-bacilos, produzem colônias lisas e bem desenvolvidas após 24 horas de incubação, nas placas de ágar-sangue do isolamento primário. As mais comumente isoladas são do grupo coliforme e dos gêneros *Serratia* e *Pseudomonas*. Os coliformes pertencem aos gêneros *Escherichia*, *Klebsiella* e *Enterobacter*, principalmente.

O meio de ágar MacConkey é muito útil na identificação presuntiva das bactérias Gram-negativas pela possibilidade de diferenciar as bactérias fermentadoras da lactose (ex.: *E. coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*) das não-fermentadoras (*Pseudomonas*, *Proteus*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Salmonella*). O teste de oxidase e de oxidação/fermentação da glicose (O/F) é útil para separar organismos do gênero *Pseudomonas*, que são oxidase positivos e possuem metabolismo oxidativo da glicose.

Uma identificação presuntiva dos gêneros: *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Serratia* e *Pseudomonas* pode ser conseguida com as provas de produção de oxidase, de indol, de urease, reação de vermelho de metila (VM), de Voges-Proskauer (VP), utilização do citrato, glicose (produção de gás) e lactose e descarboxilação da lisina e ornitina (Tabela 6). Para a identificação detalhada de todas as espécies, é necessário empregar um grande número de testes.

Tabela 6. Características principais dos gêneros das bactérias Gram-negativas mais freqüentemente isoladas de mastite bovina.

Características	<i>Escherichia</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>Proteus</i>	<i>Pseudomonas</i>
Catalase	+	+	+	+	+	+
Oxidase	-	-	-	-	-	+
O/F	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/-
Mobilidade	v ¹	-	+	+	+	+
Prod. indol	+	v	-	v	+	-
VM	+	-	-	+	+	-
VP	-	+	+	-	-	-
Utiliz. citrato	-	+	+	+	v	-
Prod. urease	-	-	-	-	+	-
Ornitina desc.	v	-	+	v	-	-
Lisina desc.	v	+	+	-	-	-

¹ v: reação variável.

10. BASTONETES GRAM-POSITIVOS

Os bastonetes Gram-positivos mais comumente isolados de leite são os difteróides ou corineformes. Os difteróides são bastonetes curtos, delgados, pleomórficos e Gram-positivos. O mais comumente encontrado é *Corynebacterium bovis*, que pode habitar normalmente o canal da teta. Apresentam-se no ágar-sangue como pequenas colônias brancas ou cremosas, com a superfície rugosa, visíveis após 48 horas de incubação. Por causa do requerimento de ácido oléico para o crescimento, as colônias aparecem maiores somente nos locais onde se concentra mais o leite do inóculo. É considerado um patógeno secundário da glândula mamária, mas pode causar elevação na contagem de células somáticas.

Arcanobacterium pyogenes, anteriormente denominado de *Actinomyces pyogenes* (antigo *Corynebacterium pyogenes*), também apresenta a forma de difteróide. Suas colônias são pequenas no ágar-sangue, envoltas por uma zona de hemólise total após 48 horas de incubação. O cultivo é melhorado em condições de microaerofilia. Infecções por *A. pyogenes* resultam em mastite severa, aguda, com secreção anormal e odor característico. Contudo, ele não é um agente usual da mastite.

Outros microrganismos que pertencem a este grupo são: *Nocardia* sp. e *Bacillus cereus*. *Nocardia* sp. forma bastonetes filamentosos, delgados, com ramificações e formas cocóides. São melhor observados após três a quatro dias de incubação. Inicialmente as colônias se assemelham àsquelas de *Staphylococcus*, mas com incubação prolongada se tornam rugosas, pigmentadas, desenvolvendo uma superfície semelhante ao algodão.

Bactérias do gênero *Bacillus* são amplamente distribuídas no ambiente onde os animais permanecem. *B. cereus* é uma das bactérias mais comuns do solo e pode causar mastite aguda, severa, que leva à morte da vaca. Porque este é um dos organismos que mais aparecem como contaminante nos exames microbiológicos de leite, ele só deve ser considerado como agente de mastite, quando isolado em cultura pura, a partir de amostras que não sofreram incubação prévia.

11. OUTROS MICRORGANISMOS

Pode-se suspeitar da presença de *Mycoplasma*, fungos, leveduras e algas quando ocorre mastite severa e que não responde ao tratamento usual.

Pode-se suspeitar de *Mycoplasma* quando as vacas de um rebanho apresentarem mastite em mais de um quarto e não responderem a tratamento. Os *Mycoplasmas* são organismos delicados, sem parede celular, sensíveis ao calor, e facilmente inativados quando expostos à temperatura de 50 °C. Para o isolamento, há necessidade de se usar meios de cultura especiais e incubação sob condições de microaerofilia.

Uma série de fungos e leveduras pode causar mastite. Estes organismos são habitantes normais do solo e podem colonizar a pele, o úbere e as tetas. Traumas ou substâncias irritantes podem predispor à infecção por estes agentes. Preparações de antibióticos contaminadas podem ser a fonte de infecção. O isolamento destes agentes pode ser conseguido em ágar Sabouraud contendo cloranfenicol para inibir o crescimento bacteriano. A identificação até gênero e espécie pode ser feita através de sistemas automatizados (ex.: API), do contrário seria necessário um grande número de testes laboratoriais.

Prototheca é uma alga aclorofilada que pode causar mastite aguda e pode ser confundida com as leveduras. De utilidade na identificação de leveduras e *Prototheca* é a preparação de esfregaços corados pelo Gram e observação da morfologia característica (Gram-positiva). O reconhecimento de *Prototheca* é facilitado pelo preparo de lâminas a fresco e a observação de células grandes, globosas, hialinas, arredondadas ou ovóides. Esporângios característicos, com presença de endósporos em número variado podem ser facilmente identificados no interior das células (Figuras 2 e 3).

12. AMOSTRAS CONTAMINADAS

O isolamento e identificação dos patógenos do úbere pela cultura de amostras coletadas assepticamente é o procedimento mais utilizado para diagnóstico das infecções intramamárias. Uma vantagem deste método é que os microrganismos isolados estão disponíveis para outros testes (ex. antibiograma), ou para figurarem em coleções de culturas que permitem trabalhos adicionais de pesquisa. Outro ponto favorável é que os procedimentos para a coleta da amostra, cultura e identificação dos microrganismos estão bem padronizados.

Problemas com o diagnóstico bacteriológico, como resultados falso-negativos, falso-positivos, ou contaminação da amostra, tam-

bém podem ocorrer. Nem sempre estes resultados se devem a falhas do laboratório. A contaminação é um dos principais problemas na identificação do agente causal da mastite. As principais contaminações são por microrganismos do ambiente e muitos destes podem ser agentes da mastite. Quando se isola um microrganismo do ambiente juntamente com outros, não se pode afirmar com segurança que ele é o agente primário da infecção. Por esta razão, considera-se uma amostra contaminada quando dá origem a três ou mais tipos diferentes de colônias. *S. aureus* ou *S. agalactiae* e *Mycoplasma* são os únicos microrganismos que, quando isolados de uma amostra contaminada, podem ser considerados, com segurança, como originários do úbere infectado.

Microrganismos do ambiente podem ser considerados como causa de infecção intramamária quando são isolados: (1) em cultura pura de uma única amostra, (2) de amostras duplas obtidas na mesma coleta, ou, (3) de duas ou três amostras consecutivas coletadas em intervalos não superiores a 30 dias. Uma nova coleta deve ser solicitada toda vez que se suspeita de contaminação da amostra.

13. ANTIBIOGRAMA

O antibiograma é um teste que oferece como resultado padrões de resistência ou susceptibilidade de uma amostra bacteriana específica a vários antimicrobianos (antibióticos ou quimioterápicos). Os resultados do antibiograma são interpretados e usados para tomar decisões sobre tratamento.

Os métodos usados para realização do antibiograma baseiam-se na difusão do antimicrobiano em placas de ágar ou diretamente, colocando em contato uma suspensão padronizada da bactéria diante de várias concentrações do antimicrobiano. Estes últimos permitem determinar a menor concentração do antimicrobiano que inibe completamente a bactéria (CMI: Concentração Mínima Inibitória). Como são mais elaborados, são menos empregados na rotina. Contudo, sistemas comerciais que permitem determinar a concentração mínima inibitória, já são disponíveis no mercado, e têm sido usados para os agentes da mastite em laboratórios mais especializados.

O teste mais usado na rotina laboratorial nos trabalhos de mastite é o da difusão do antimicrobiano. Nesta técnica, uma suspensão padronizada do organismo em teste é espalhada na superfície do meio de cultura. O antimicrobiano, impregnado em um disco de papel de filtro, é colocado sobre o meio de cultura inoculado e difunde-se, formando um gradiente de concentração. A velocidade de difusão é produto da interação entre as moléculas do agente antimicrobiano e o meio. Portanto, o teste pode ser influenciado pela quantidade do antibiótico nos discos, densidade do gel de ágar, difusibilidade do agente em solução aquosa, força iônica da composição do meio de cultura e profundidade do ágar. Por ser um processo dinâmico, à medida que a incubação prossegue, o gradiente de concentração se altera e ao mesmo tempo ocorre a multiplicação bacteriana. A zona de inibição do crescimento bacteriano que resulta é diretamente proporcional à susceptibilidade do microrganismo, desde que todas as variáveis que afetam a difusão da droga sejam mantidas constantes. O tamanho do inóculo também é uma variável que afeta a zona de inibição. Em inóculos mais concentrados, há maior chance de haver crescimento visível antes que o antimicrobiano possa se difundir ao redor do disco. Se o inóculo é pouco concentrado, ocorre o contrário. Portanto, o antibiograma deve ser realizado com extremo cuidado e atenção aos detalhes da técnica.

A interpretação da susceptibilidade se baseia na medida do halo de inibição do crescimento bacteriano e na concentração alcançada nos tecidos para cada antimicrobiano. Esses valores são designados para aplicação em medicina humana, baseados na concentração que o antimicrobiano alcança no plasma humano; portanto, nem sempre são diretamente aplicados aos animais. É importante notar que microrganismos apresentando sensibilidade *in vitro* podem ser resistentes *in vivo*. A farmacologia da droga, incluindo padrões de absorção e distribuição nos tecidos, é tão importante quanto o espectro antimicrobiano. Por outro lado, microrganismos que apresentarem resistência *in vitro* também serão resistentes *in vivo*.

O teste de susceptibilidade pela difusão do antibiótico na superfície de placas de ágar é recomendado principalmente para bactérias dos gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, do grupo coliformes e espécies relacionadas. Não pode ser usado para organismos que crescem lentamente, como *A. pyogenes*.

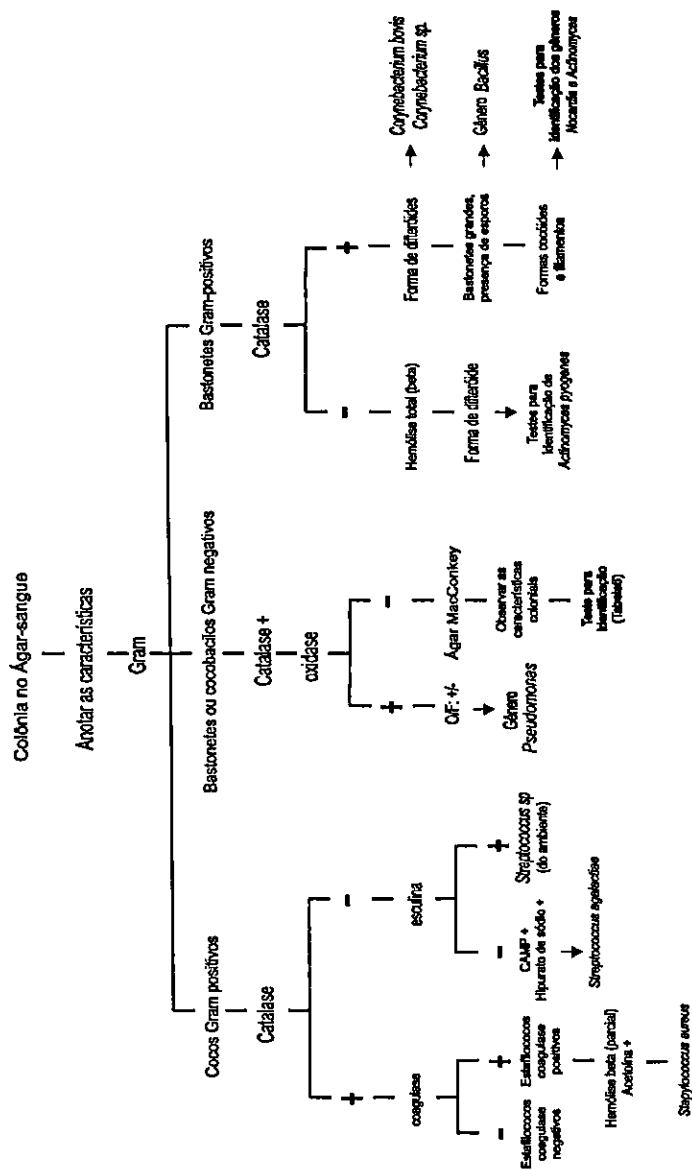


Figura 1. Esquema simplificado para exame microbiológico de amostras de leite para investigação dos patógenos da mastite.

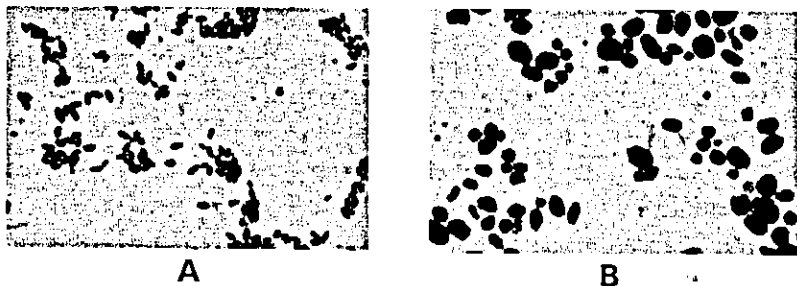


Figura 2. Células de leveduras (A) e *Prototheca zopfii* (B) coradas pelo método de Gram (1.000 x).



Figura 3. Esfregaço preparado a fresco de *Prototheca zopfii* em que se observam células se dividindo internamente com formação de endósporos (1.000 x).

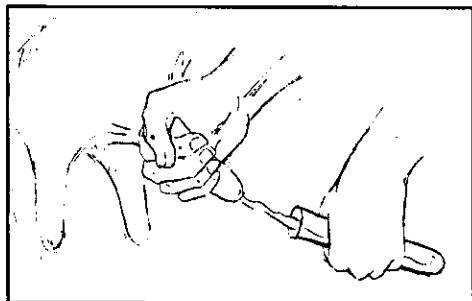


Figura 4. Representação esquemática do processo de segurar o frasco para coleta de amostras de leite para o exame microbiológico.

14. PROCEDIMENTOS PARA A COLETA DE LEITE PARA EXAME MICROBIOLÓGICO

Microrganismos podem estar presentes no leite e também na pele do úbere ou das tetas da vaca, nas mãos do ordenhador e no ambiente da ordenha. Para evitar a contaminação com tais microrganismos, o leite a ser examinado deve ser coletado com técnica adequada, do contrário, o exame bacteriológico poderá apontar outros agentes diferentes dos causadores da infecção da glândula mamária.

14.1 Material necessário

Tubos ou frascos de vidro com tampa de rosca, ou tubos de plástico descartáveis, esterilizados; recipiente para colocar os tubos em pé; álcool a 70%; chumaços de algodão; papel-toalha; desinfetante para imersão de tetas.

Tubos com 15 ml de capacidade são mais fáceis de manusear, mas pode-se usar tubos menores. É importante identificar, em cada frasco, o animal e o quarto mamário.

14.2 Quando coletar as amostras

Geralmente as amostras são coletadas imediatamente antes da ordenha, depois de descartar os primeiros jatos de leite. Pode-se coletar também após a ordenha ou no intervalo das ordenhas, mas sempre antes que o animal receba medicação. Sempre que possível deve-se coletar amostras de leite de todos os animais com mastite clínica.

14.3 Preparação das tetas

Devem estar limpas e secas antes de iniciar a coleta do leite para exame. Tetas limpas não precisam ser lavadas. Sujeiras da cama, poeira, fezes, devem ser removidas, limpando-se a superfície das tetas com papel-toalha seco. Pode-se fazer imersão das tetas em solução desinfetante à base de iodofor (1%) ou hipoclorito de sódio (4%), antes de se coletar o leite. Nestes casos, 20 a 30 segundos depois, remover o excesso da solução desinfetante com papel-toalha. Se houver necessidade de lavar as tetas, deve-se secar bem, para evitar que gotículas de água caiam nos frascos junto com o leite, contaminando as amostras.

A extremidade da teta deve ser cuidadosamente limpa com algodão umedecido (mas não encharcado) com álcool etílico a 70%. Usa-se um (ou mais, se necessário) chumaço de algodão para cada teta, até que a extremidade esteja limpa, antes de se coletar o leite. O álcool é o antisséptico mais usado porque evapora rapidamente. Desse modo, não deixa resíduos no leite que podem interferir no exame.

Quando se coleta leite dos quatro quartos mamários do mesmo animal, deve-se preparar as tetas mais distantes da pessoa primeiro, para evitar recontaminação após a antisepsia.

Antes de coletar a amostra no tubo apropriado, deve-se descartar os primeiros dois ou três jatos de leite de cada teta. Isto deve ser feito para retirar as bactérias presentes no orifício da teta, diminuindo a contaminação das amostras.

As mãos do indivíduo que vai coletar as amostras devem ser lavadas e desinfetadas antes de iniciar a coleta. Se houver algum ferimento na mão, deve-se usar luvas de borracha para evitar que as bactérias presentes no ferimento passem para a vaca. Por outro lado, bactérias que causam mastite podem causar inflamação nas mãos do indivíduo, caso haja algum ferimento ou lesão de continuidade da pele.

14.4 Coleta das amostras

Após descartar os primeiros jatos de leite, deve-se abrir o frasco, e coletar o leite, evitando-se encher completamente o frasco. Inicia-se a coleta pelas tetas mais próximas (que foram higienizadas por último), para evitar que elas se recontaminem durante a coleta. É muito importante observar os seguintes cuidados:

- a. o frasco só deve ser aberto no momento da introdução do jato de leite, devendo ser fechado imediatamente após. Não se deve permitir que a abertura do frasco toque qualquer superfície ou a teta do animal. Caso o frasco seja aberto por acidente, deve ser substituído e esterilizado novamente antes de ser usado.
- b. no momento da coleta, o frasco deve ser mantido o mais próximo possível da posição horizontal; para isso, inclina-se a teta formando um ângulo reto (Figura 4).
- c. a tampa do frasco deve ser mantida com a abertura voltada para baixo, sem tocar a teta, as mãos do ordenhador ou qualquer outra superfície.

14.5 Manutenção das amostras

Após a coleta, os frascos com leite devem ser mantidos sob refrigeração. Podem ser colocados em um recipiente, tipo isopor, com gelo e remetidos ao laboratório. Caso não seja possível enviá-los no mesmo dia para o laboratório, devem ser congelados, podendo ser mantidos por até seis semanas, até que se decida examiná-los.

No laboratório as amostras devem ser processadas imediatamente ou mantidas em refrigerador por um período não superior a 24 horas após a coleta. O congelamento do leite pode interferir com o isolamento de poucos microrganismos (ex. *Nocardia*) e reduzir o número de outros como *Escherichia coli*, mas isto é preferível a se perder as amostras com o crescimento de contaminantes.

14.6 Informações sobre as amostras

É muito importante informar ao laboratório alguns dados sobre o animal: nome ou o número da vaca, o quarto mamário, data do último parto, produção de leite, resultado do CMT (California Mastitis Test) e os sinais clínicos apresentados pelo quarto mamário amostrado. Além disso, deve-se informar se a amostra é de mastite clínica ou subclínica, se os sintomas são agudos ou crônicos, se foi feito algum tratamento e o produto usado.

15. LITERATURA CONSULTADA

BARTLETT, P.C.; MILLER, G.Y. Mastitis microbiology: what is considered normal? *Agri-Practice*, Santa Barbara, v. 14, n.6, p. 12-14, 1993.

BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; RIBEIRO, M.T.; VEIGA, V.M.O. 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.

BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; SOUZA, H.M.; VARGAS, O.L. Avaliação da sensibilidade da cultura de leite do tanque para isolamento de agentes contagiosos da mastite bovina. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Rio de Janeiro, v. 18, n.1; p.39-44, 1998.

DINSMORE, R.P.; ENGLISH, P.B.; GONZALEZ, R.N.; SEARS, P.M. Use of augmented cultural techniques in the diagnosis of the bacterial cause of clinical bovine mastitis. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 75, p. 2706-2712, 1992.

EDMONDSON, P.W. Bulk tank analysis: a useful foot in the door. *Cattle Practice*, v.1, part 3, p. 133-137, 1993.

- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Laboratory Methods for use in Mastitis Work. Brussels, 1981. 27p. (Bulletin 132).
- MURDOUGH, P.A.; DEITZ, K.E.; PANKEY, J.W. Effects of freezing on the viability of nine pathogens from quarters with subclinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.79, p.334-336, 1996.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). 1997. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Tentative Standards. Wayne, 1997. 64p. (NCCLS Document M31-T).
- NATIONAL MASTITIS COUNCIL, Arlington. Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection. 3. ed., Arlington, 1990. 34p.
- NATIONAL MASTITIS COUNCIL, Arlington. Laboratory and field handbook on bovine mastitis. Arlington, 1987. 208p.
- SCHUKKEN, Y.H.; SMIT, J.A.H.; GROMMERS, F.J.; VANDEGEER, D.; BRAND, A. Effect of freezing on bacteriologic culturing of mastitis milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 72, p. 1900-1906, 1990.
- SEARS, P.M.; GONZÁLEZ, R.N.; WILSON, D.J.; HAN, H.R. Procedures for mastitis diagnosis and control. **Veterinary Clinics of North America: food animal practice**. Philadelphia, v.9, n. 3, p.445-468, 1993.
- SEARS, P.M.; SMITH, B.S.; ENGLISH, P.B.; HERER, P.S.; GONZALEZ, R.N. Shedding pattern of *Staphylococcus aureus* from bovine intramammary infections. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 73, p. 2785-2789, 1990.
- SEARS, P.M.; WILSON, D.J.; GONZALEZ, R.N.; HANCOCK, D.D. Microbiological results from milk samples obtained premilking and postmilking for the diagnosis of bovine intramammary infections. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.74, p. 4183-4188, 1991.
- VECHT, U. Identification of mastitis pathogens. In: INTERNATIONAL MASTITIS SEMINAR, 3., 1995, Tel Aviv, Proceedings... Tel Aviv: International Dairy Federation, 1995. p.3-17.
- WATTS, J.L.; YANCEY JR., R.J. An update on antimicrobial susceptibility testing of mastitis pathogens. NATIONAL MASTITIS COUNCIL ANNUAL MEETING, 33., 1994, Orlando. Proceedings... Orlando, 1994. p.14-18.

**MINISTÉRIO DA AGRICULTURA
E DO ABASTECIMENTO**



Embrapa

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Gado de Leite*

*Ministério da Agricultura e do Abastecimento
Rua Eugênio do Nascimento, 610 - Dom Bosco*

Fone: (32)249-4700 - Fax: (32)249-4751

Juiz de Fora - MG - CEP: 36038-330

Home page: <http://www.cnpgl.embrapa.br>

e-mail: cnpgl@cnpgl.embrapa.br