



Print version ISSN 1981 – 2965

Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal, 2014 Setembro; 8 (5 Supl 1): 295-305

<http://dx.doi.org/10.5935/1981-2965.20140076>

**041. Isolamento de *Staphylococcus* coagulase-negativos e variação na contagem de células somáticas em amostras de leite bubalino**

*Isolation of Coagulase Negative Staphylococci and variation in somatic cell count in buffalo milk samples*

**Lucas José Luduverio Pizauro<sup>1</sup>; Camila Chioda de Almeida<sup>1</sup>; Oswaldo Durival Rossi Junior<sup>1</sup>; Fernando Antônio de Ávila<sup>1</sup>; Luiz Francisco Zafalon<sup>2</sup>**

**Resumo:** O interesse pela produção de leite e derivados de búfalos tem aumentado no Brasil, estes animais são sujeitos a problemas sanitários semelhantes aos bovinos. Os *Staphylococcus* coagulase-negativo (SCN) são patógenos bacterianos comumente isolados de amostras de leite. Neste estudo foram avaliadas a frequência de isolamento de *Staphylococcus* coagulase-negativos e a variação na contagem de células somáticas. Foram colhidas 240 amostras de leite de um rebanho bubalinos no município de Analândia - SP. Os quartos mamários analisados foram inspecionados e, em seguida submetidos a prova da caneca telada de fundo escuro e *California Mastitis Test*. Para o isolamento e identificação dos microrganismos foram realizadas provas bioquímicas específicas e, a Contagem de Células Somáticas foi realizada por citometria de fluxo. Foi observada 21,2%, de frequência de isolamento de *Staphylococcus* coagulase-negativo, dentre os SCN isolados o *S. epidermidis* e *S. warneri* foram 35,3% e 27,5% os mais frequentes, respectivamente. Não houve alteração significativa na média da contagem de células somáticas em tetos com a presença de SCN sem isolamento microbiano. Estes resultados sugerem que SCN sejam patógenos emergentes e importantes em mastites subclínicas em búfalos.

**Palavra-Chave:** Búfalo, *Staphylococcus* coagulase negativo, contagem de células somáticas

**Abstract:** The interest for buffalo milk and dairy production is growing in Brazil. These animals are subjected to the same sanitary problems as cattle. Coagulase negative *Staphylococcus* (SCN) have become common bacterial pathogens isolated from samples of milk causing intramammary infections. In this study, we evaluated the frequency of isolation of *Staphylococcus* coagulase negative and the variation in somatic cell count. Two hundred and forty buffalo milk samples were collected in Analândia - SP. The mammary glands were inspected, then submitted of Strip Cut Test and California Mastitis Test. For the isolation and identification of microorganisms specific biochemical tests were conducted, the somatic cell count was performed by flow cytometry. Frequency of 21.2% for isolation of coagulase-negative *Staphylococcus* was observed. Among SCN isolates *S. epidermidis* and *S. warneri* were the most frequent, 35.3% and 27.5% respectively. There was no significant change in the average somatic cell count on quarters with the presence of SCN in relation with teats without microbial isolation. These results suggest that SCN are important and emerging pathogens in subclinical mastitis in buffaloes.

**Key-Word:** Buffalo, *Staphylococcus* coagulase negative, Somatic Cell Count

<sup>1</sup> Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, FCAV-UNESP, campus de Jaboticabal

<sup>2</sup> Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Pecuária Sudeste

## **Introdução**

O interesse na produção de leite de bubalinos, bem como seus e derivados, cresceu no Brasil. Os bubalinos têm sido considerados menos susceptíveis à mastite que os bovinos, entretanto estudos recentes como os de Bastos e Birguel (2011) demonstram uma prevalência de 20,1% de mastite subclínica em rebanhos bubalinos. À semelhança das vacas os microrganismos isolados com mais frequência são *Staphylococcus* e *Streptococcus* (PRASAD et al., 1996). Ali et al. (2008) observaram que estes dois gêneros representaram 73,6% dos isolados obtidos de rebanhos bubalinos no Paquistão. Os SCN tornaram-se patógenos bacterianos frequentemente isolados de amostras de leite em vários países causando infecções intramamárias (El-Jakee et al., 2013). Neste estudo foi avaliado a frequência de SCN relacionado a presença deste na variação na contagem de células somáticas.

## **Material e métodos**

Foram coletadas 240 amostras provenientes de 60 búfalas de uma propriedade localizada no município de Analândia, Estado de São Paulo. Após a inspeção da glândula mamária, foi realizada prova da caneca telada de fundo escuro e *California Mastitis Test* – CMT (Schalm & Noorlander, 1957) e foram

colhidas amostras de leite, após assepsia dos quartos.

A identificação dos *Staphylococcus* spp foi realizado segundo LANCETTE & BENNETT (2001). Colônias sugestivas de *Staphylococcus* spp foram submetidas a coloração de Gram, reação da catalase e coagulase de plasma de coelho. Para determinação dos gêneros e espécies das estirpes de SCN foi realizado por provas bioquímicas em duas etapas segundo CUNHA E SILVEIRA (2004). Outros microrganismos foram identificados segundo protocolo do Nacional Mastitis Concil (NMC, 1999). A contagem de células somáticas (CCS) foi realizada em equipamento automático por citometria de fluxo utilizando matriz bovina de acordo com o International Dairy Federation (IDF, 2006) realizados pela Clínica do leite ESALQ-USP. A correlação entre isolamento de SCN e variação na contagem de células somáticas foi determinada pelo teste de Kruskal-Wallis (Triola, 2008) e os dados foram analisados utilizando-se programa estático R (versão 3.1).

## **Resultados e Discussão**

Dentre as 240 amostras de leite obtidas, nenhuma era originária de búfalas com sinais de mastite clínica, enquanto 40 (16,7%) foram positivas ao CMT. Dos 138 isolados, 51 foram classificados como

*Staphylococcus* coagulase-negativo (SCN), correspondendo a 36,9% dos isolados. Segundo EL-JAKEE et al. (2013) estafilococos coagulase-negativos estão se tornado patógenos predominantes em mastites subclínicas, incluindo os bubalinos, estes autores observaram frequência de isolamento de SCN em 59,4% das 172 amostras de leite bubalino, MEDEIROS et al. (2011) observaram

frequência de isolamento de SCN de 21,8% em amostras de leite de búfala com CCS acima de 400.000 células/mL. As principais espécies de SCN isoladas neste estudo foram os *S. epidermidis* (35,3%), *S. warneri* (27,5%). El-Jakee encontrou *S. xylosum* e *S. hominis*, como sendo mais frequente dos SCN isolados de búfalos com e sem mastite subclínica (Tabela 1).

**Tabela 1.** Frequência de isolamento de SCN obtidas de amostras de leite bubalino.

SCN	Frequência Absoluta	Frequência Relativa
<i>S. epidermidis</i>	18	35,3%
<i>S. warneri</i>	14	27,5%
<i>S. capitis</i>	4	7,84%
<i>S. schleiferi</i>	4	7,84%
<i>S. hominis</i>	3	5,88%
<i>S. cohnii</i>	3	5,88%
<i>S. xylosum</i>	2	3,90%
<i>S. hominis</i>	2	3,90%
<i>S. saprophyticus</i>	1	1,96%
Total	51	100%

A média da CCS de quartos com a presença de SCN foi de 324.000 células/mL (Tabela 2). ZAFALON et al. (1999) relataram uma variação de 862,7% entre quartos sadios e quartos com SCN (75.000 cél/mL para 722.000 células/mL) em

amostras de leite bovino. SOUZA et al., 2009 verificaram média de CCS de 400.000 células/mL de quartos bovinos com isolamento de SCN.

Neste estudo não houve diferença significativa entre a CCS de quartos sem

isolamento microbiológico e quartos com isolamento de SCN (Tabela 2).

**Tabela 2.** Relação da média da contagem de células somáticas e a frequência de isolamento de SCN obtidos de amostra de leite bubalino.

Isolamento	CCS (células/mL)	Frequência
+	324.000±1418.000 <sup>A</sup>	51
-	145.000±244.000 <sup>A</sup>	102

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ( $P>0,05$ ).

Por outro lado, a média de CCS nos tetos, com isolamento de diversos patógenos relacionados a mastite, incluindo os SCN, foi maior que a dos tetos sem isolamento de patógenos (Tabela 3). Segundo CARVALHO et al. (2007)

padrão de contagem de CCS para bubalinos é diferente do normalmente encontrado para bovinos e os baixos valores de CCS não indicam necessariamente a ausência de infecção intramamária.

**Tabela 3.** Médias e desvio padrão da contagem de células somáticas (células/mL) de tetos reagentes ou não ao *California Mastitis Test* (CMT), com ou sem isolamento microbiológico de diversos patógenos relacionados a mastite, incluindo os SCN.

	Contagem de Células Somáticas (células/mL)	
	CMT (-)	CMT (+)
Isolamento (-)	79.307±110.104	89.740±119.491
Isolamento (+)	820.277±1.325.680	1.068.590±2.082.588

Segundo DHAKAL et al. (1992) o isolamento microbiológico em amostras de leite bubalinos com alta contagem de células somáticas, sem isolamento microbiológico devem-se a processos inflamatórios inespecíficos.

### Conclusões

O isolamento de SCN em tetos não reativos ao CMT e com baixa CCS classificaria esses animais como portadores, podendo ou não tornarem-se fontes de transmissão para outros animais. Essa espécie pode acarretar perdas

econômicas e mais estudos sobre os SCN causando infecções intramamárias em búfalos deveriam ser realizados principalmente sobre a epidemiologia destes agentes.

### **Agradecimento**

A Capes pelo apoio financeiro

### **Referências Bibliográficas**

ALI, I.; MUHAMMAD, M.; ARSHAD, M.; SAQIB, M.; HASSAN, I. J. Bacteriology of mastitis in buffaloes in Tehsil Samundri of district Faisalabad, Pakistan. **Pakistan Veterinary Journal**, Faisalabad, v. 28, n. 1, p. 31-33, 2008.

BASTOS, P.A.S.; BIRGEL, E.H. Leite de búfalas Murrah criadas em São Paulo (Brasil): influência da idade, fase de lactação, momento da ordenha e isolamento bacteriano na composição físico-química e celular. *Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia*, São Paulo, v. 9, n. 3, p. 6-13, 2011.

CARVALHO, L.B.; AMARAL, F.R.; BRITO, M.A.V.P. et al. Contagem de células somáticas e isolamento de agentes causadores de mastite em búfalas (*Bubalus bubalis*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 1, p. 242-245, 2007.

CUNHA, M.L.R.S.; SINZATO, Y.K.; SILVEIRA, L.V.A. Comparison of methods for the identification of coagulase-negative Staphylococci. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 99, n. 8, p. 855-60, 2004.

DHAKAL I.P.; KAPUR M.P.; ANSHU S. Significance of differential somatic cell counts in milk for the diagnosis of subclinical mastitis in buffaloes using foremilk and stripping milk. *Indian Journal of Animal Health*, v.31, n., p.39-42, 1992.

IDF - International Dairy Federation. Milk: enumeration of somatic cell. Part 2: Guidance on the operation of fluoro-opto-electronic counters. Brussels: IDF, 2006. 13p. (IDF Standard 148-2).

EL-JAKEE, J.K.; AREF, N.E.; GOMAA, A.; EL-HARIRI, M.D.; GALAL, H.M.; OMAR, S.A.; SAMIR, A. Emerging of Coagulase Negative Staphylococci as a cause of mastitis in dairy animals: An environmental hazard. **International Journal of Veterinary Science and Medicine**, v.1, p.74-78, 2013.

LANCETTE, G.A.; BENNETT, R.W. Staphylococcus aureus and staphylococcal enterotoxins. Pages 387-403 in *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. F. P. Downes and K. Ito, ed. Am. Public Health Assoc., Washington, DC. 2001.

NMC - Laboratory handbook on bovine mastitis. Madison, WI: National Mastitis Council, 1999. p. 171-173.

MEDEIROS, E.S.; BARBOSA, S.B.P.; JATOBÁ, R.B.; AZEVEDO, S. S.; PINHEIRO JUNIOR, J.W.; SAUKAS, T.N.; ALBUQUERQUE, P.P.F.; MOTA, R.A. Perfil da contagem de células somáticas na infecção intramamária em búfalas na Região Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, p.219-223, 2011.

PRASAD, R.V.; RATHMAN, K.; SHAH, D.G. Investigation on prevalence of subclinical mastitis in Kaira district, India. **Indian Journal of Dairy Science**, New Delhi, v. 49, n. 1, p. 441-447, 1996.

SCHALM, O.W.; NOORLANDER, D.O. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 130, n. 5, p. 199-204, 1957.

SOUZA, G.N.; BRITO, J.R.F.; MOREIRA, E.C. Brito, M.A.V.P.; SILVA, M.V.G.B. Variação da contagem de células somáticas em vacas leiteiras de acordo com patógenos da mastite. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.61, p.1015-1020, 2009.

TRIOLA, M.F. Introdução à estatística. 10.ed. Rio de Janeiro: LTC, 2008. 696p.

ZAFALON L, F., AMARAL, L..A., NADER FILHO, A., OLIVEIRA, J.V., RESENDE, F.D. & OLIVEIRA, J..A. Influência de

bactérias do gênero *Corynebacterium* e estafilococos coagulase positivos e negativos sobre a contagem de células somáticas e a

produção láctea de quartos mamários com mastite clínica. *Napgama*, v. 6, p:4-6, 1999.