

IMPORTÂNCIA DA DIFERENCIAÇÃO DOS *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* E NÃO *AGALACTIAE* NAS MASTITES

Anelise Salina¹
Nathália Brancato Junqueira¹
Giulia Soares Latosinski¹
Gabriela Capriogli Oliveira¹
Sâmea Fernandes Joaquim¹
Renata Bonini Pardo²
Helio Langoni^{1*}

RESUMO

O leite é um alimento imprescindível para todas as faixas etárias. A mastite é um processo infeccioso de múltipla etiologia, com envolvimento de micro-organismos contagiosos e ambientais. Os estreptococos pertencem a um grupo de patógenos com diferentes espécies, e graus de patogenicidade e virulência. *Streptococcus agalactiae* é um patógeno contagioso, portanto, adaptado à sobrevivência interna na glândula mamária. Os estreptococos ambientais são considerados oportunistas, pois, após invasão da glândula mamária, não se adaptam em seu interior, causando resposta inflamatória imediata com infecção de curta duração. Apesar da diferenciação entre patógenos contagiosos e ambientais, é necessária a avaliação de outros fatores como: perfil da ocorrência da CCS, ocorrência de mastite clínica, pesquisa dos fatores de risco, e os resultados dos exames microbiológicos com a caracterização dos agentes causais. Amostras de leite com CMT positivo (n=123) foram cultivadas em ágar sangue bovino a 5% e ágar MacConkey por até 72 horas, a 37°C, com observação a cada 24 horas das características fenotípicas das colônias como tamanho, produção de pigmento, hemólise bem como a realização de Gram e prova de catalase para diferenciação entre os gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus*. Colônias suspeitas foram repicadas em BHI para provas bioquímicas, CAMP teste, hidrólise do hipurato de sódio e hidrólise da esculina. Foram isoladas 36 estirpes de *Streptococcus* spp., sendo 91,7% *Streptococcus agalactiae*, 5,6% *Streptococcus dysgalactiae* e 2,7% *Streptococcus uberis*.

Palavras-chave: ambiental, mastite, caracterização, provas bioquímicas.

IMPORTANCE OF DIFFERENTIATION OF *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* AND NOT *AGALACTIAE* IN THE MASTITIS

ABSTRACT

Milk is an essential food for all age groups. Mastitis is an infectious process with multiple etiologies, involving environmental and contagious microorganisms. Streptococci belonging to a group of micro-organisms of different types and degrees of pathogenicity and virulence. *Streptococcus agalactiae* is a contagious pathogen, therefore, adapted to survival in internal mammary gland. Environmental *Streptococcus* are considered opportunistic because once they invade the mammary gland, they cannot adapt inside it, causing an immediate inflammatory response with short-term infection. Despite the differentiation of contagious and

¹ Departamento de Higiene e Veterinária e Saúde Pública - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ - UNESP - Botucatu/SP

² Faculdade de Tecnologia do Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza - FATEC - Marília/SP

* Autor de contato: hlangoni@fmvz.unesp.br

environmental pathogens it is necessary to evaluate other factors such as profile of the occurrence of CCS, occurrence of clinical mastitis, research of risk factors, and the results of microbiological tests with the characterization of the causative agents. Milk samples positive in California Mastitis Test (n = 123) were cultured in blood agar media and MacConkey agar media for 72 hours, at 37° C, with observation every 24 hours in the phenotypic characteristics of the colonies such as size, pigment production, hemolysis, such as Gram and catalase test to differentiate between *Staphylococcus* and *Streptococcus*. Suspect colonies were picked in BHI for biochemical tests, CAMP test, sodium hippurate hydrolysis and hydrolysis of esculin. They were isolated 36 strains of *Streptococcus spp.*, 91.7% *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* 5.6% and 2.7% *Streptococcus uberis*.

Keywords: environmental, mastitis, characterization, biochemical tests.

IMPORTANCIA DE LA DIFERENCIACIÓN DE STREPTOCOCCUS AGALACTIAE Y NO AGALACTIAE EN LA MASTITIS

RESUMEN

La leche es un elemento esencial para todos los grupos de edad. La mastitis es un proceso infeccioso con múltiples etiologías, que implican microorganismos ambientales y contagiosos. Los estreptococos que pertenece a un grupo de microorganismos de diferentes tipos y grados de patogenicidad y virulencia. *Streptococcus agalactiae* es un patógeno contagiosa, por lo tanto, adaptado para la supervivencia en la glándula mamaria interna. Los estreptococos del ambiente se consideran oportunistas, porque una vez que invaden la glándula mamaria no pueden adaptarse en su interior, provocando una respuesta inflamatoria inmediata con la infección a corto plazo. A pesar de la diferenciación de los patógenos contagiosos y ambientales es necesario evaluar otros factores tales como el perfil de la ocurrencia de CCS, la aparición de la mastitis clínica, la investigación de factores de riesgo, y los resultados de las pruebas microbiológicas con la caracterización de los agentes causantes. Las muestras de leche positivas en California Mastitis Test (n = 123) fueron cultivadas en medios de agar sangre y agar MacConkey durante 72 horas a 37 ° C con la observación cada 24 horas en las características fenotípicas de las colonias, tales como; tamaño, la producción de pigmentos, la hemólisis, como gramo y prueba de catalasa para diferenciar entre *Staphylococcus* y *Streptococcus*. Las colonias sospechosas fueron recogidos en BHI para las pruebas bioquímicas, teste CAMP, hipurato de hidrólisis de sodio e hidrólisis de esculina. Fue aislado 36 cepas de *Streptococcus spp.*, 91,7% *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* 5,6% y 2,7% *Streptococcus uberis*.

Palabras clave: ambiental, mastitis, caracterización, pruebas bioquímicas.

INTRODUÇÃO

O leite é um alimento imprescindível para todas as faixas etárias, pois se constitui em proteína de alto valor biológico, rico em vitaminas e sais minerais. O controle da sua qualidade inicia-se na etapa de obtenção da matéria prima (1), sendo que a primeira medida consiste na obtenção higiênica do leite de vacas sadias, que deverá ser resfriado à 4°C até no máximo duas horas após a ordenha, e que o seu armazenamento e transporte sejam realizados em condições adequadas de higiene e temperatura. Cuidados devem ainda ser tomados nas etapas de industrialização e comercialização para garantir a qualidade do produto final.

A mastite é um processo infeccioso complexo, multifatorial e de múltipla etiologia (2,3), com envolvimento de micro-organismos contagiosos e ambientais. Além dos aspectos econômicos, relacionados a esta doença, são importantes ainda os aspectos de saúde pública, pois muitos micro-organismos presentes no leite oriundos principalmente de casos de mastites podem ocasionar infecções ou toxi-infecções de origem alimentar, devido a produção de toxinas, que não são inativadas pelos processos de pasteurização e fervura (4)

Os estreptococos pertencem a um grupo de micro-organismos com diferentes espécies e graus de patogenicidade e virulência. Muitos deles são importantes agentes de mastites, considerados como patógenos contagiosos. Alguns autores referem-se a *Streptococcus agalactiae* e não *agalactiae* e nesse último grupo estão os *Streptococcus dysgalactiae* e *Streptococcus uberis* classificados como estreptococos ambientais, e participam da microbiota intestinal sendo encontrados no ambiente em que as vacas são criadas. Há ainda os enterococos com várias espécies, sendo o mais conhecido o *Enterococcus faecalis*. Também como causador de mastite tem-se o *Streptococcus pyogenes*.

Streptococcus agalactiae é um patógeno contagioso, portanto, adaptado à sobrevivência interna da glândula mamária. Em sua maioria causam mastite subclínica com alta incidência nos rebanhos onde ainda não foi controlado. Ocorrem também casos clínicos intermitentes, porém com menor incidência (5). Mastites do tipo contagiosa se associam com o aumento da contagem de células somáticas (CCS) do tanque e este patógeno é isolado com frequência nessa situação, de acordo com Schukken et al. (6).

Os estreptococos ambientais são considerados oportunistas, pois após invasão da glândula mamária não se adaptam em seu interior, causando resposta inflamatória imediata com infecção de curta duração. A infecção de origem ambiental via de regra se origina no período seco e com frequência nas propriedades com CCS baixas no tanque há uma maior ocorrência desse tipo de mastite (6).

Apesar da distinção entre patógenos contagiosos e ambientais é necessário a avaliação de outros fatores como: perfil da ocorrência da CCS, ocorrência de mastite clínica, pesquisa dos fatores de risco, e os resultados dos exames microbiológicos com a caracterização dos agentes causais (7). Desta forma pode-se avaliar melhor o padrão de transmissão da mastite, que deve ser realizado a nível de rebanho e não somente nas características dos patógenos envolvidos.

Quanto a etiologia das mastites por estreptococos a prevalência é variável como *Streptococcus agalactiae* em 10,1% entre 10648 amostras analisadas e de *Streptococcus* spp. 7,3% entre 7646 amostras (8). O resultado da pesquisa de Souto (9) revelou entre outros patógenos, 5,34% de *Streptococcus* spp. Especificamente quanto ao encontro de *Streptococcus uberis* e *Streptococcus dysgalactiae* há a citação de <10% de isolamento de ambos (10).

No Brasil trabalhando com 6315 amostras de leite, isolou-se *Streptococcus agalactiae* em 6,9% das amostras e pela prova de esculina 4% eram de *Streptococcus* esculina positivos e 2,1% esculina negativos, tratando-se, portanto, de estreptococos ambientais (11). O diagnóstico microbiológico permite conhecer a microbiota presente nos casos de mastites e deve fazer parte de um programa de controle dessa enfermidade na propriedade (12), pois orienta para as medidas que devem ser tomadas.

O isolamento de patógenos causadores de mastites em amostras de leite colhidas assepticamente é o método padrão para o seu diagnóstico, especialmente útil se complementado com os testes de sensibilidade *in vitro*. Há muita discussão com relação ao diagnóstico microbiológico da mastite na rotina de granjas leiteiras, pelo alto custo do exame e urgência na escolha da terapia. A avaliação de sensibilidade *in vitro* dos patógenos envolvidos nas mastites tem a sua devida importância, entretanto, deve-se considerar que há divergência nos resultados de acordo com a região e os agentes envolvidos e antimicrobianos

testados. Apesar da disponibilidade de vários antimicrobianos para o tratamento de mastites, observa-se grande resistência aos antimicrobianos pelo uso inadequado e indiscriminado destes.

Na rotina laboratorial são utilizados os meios de ágar-sangue adicionado de 5 a 8% de sangue ovino ou bovino e Agar MacConkey sendo este último seletivo para enterobactérias. Na interpretação dos resultados nos valem da observação das características fenotípicas avaliando-se as características da colônia, como o tamanho, produção de pigmento e, hemólise.

As características morfológicas pela técnica de Gram permitem a caracterização entre alguns grupos de micro-organismos Gram positivos e Gram negativos, aspecto que auxilia na diferenciação entre os contagiosos e a maioria dos ambientais. Entretanto, quando se está frente aos *Streptococcus* spp, que podem desenvolver hemólise dos tipos β e α ou ainda serem não hemolíticos, fica difícil a sua identificação. Temos observado na rotina laboratorial que muitas vezes *Streptococcus* com α hemólise são caracterizados por provas bioquímicas como *Streptococcus agalactiae*, bem como casos de *Streptococcus* não hemolíticos que ao final da avaliação, se caracterizam como *Streptococcus agalactiae*.

Se na prática, tem-se por definição que tanto *Streptococcus dysgalactiae* como *uberis* são α hemolíticos, e considerados como ambientais, como avaliamos epidemiologicamente a origem da infecção? Concordamos que a caracterização do agente infeccioso é importante no conceito de epidemiologia molecular e que devemos lançar mão de ferramentas cada vez mais sensíveis para concluir quais são as espécies de patógenos causadores das mastites no rebanho, e assim poder lançar mão de medidas eficazes para o controle. Tanto isso é verdade que hoje há diferentes técnicas para caracterização de patógenos, e muitas delas envolvem a proteômica, como a Espectrometria de Massa por Ionização e Dissociação à Laser Assistida por Matriz de Voo (MALDI/TOF – MS), de grande aplicabilidade para identificação de micro-organismos causadores de mastite (13,14).

O diagnóstico microbiológico praticado na fazenda, como vem sendo utilizado em algumas propriedades, pode não revelar de fato a diferenciação entre os patógenos e conseqüentemente redundando no diagnóstico errôneo das espécies de *Streptococcus*, já que a avaliação pela produção ou não de hemólise não assegura a diferenciação entre estreptococos ambientais e contagiosos.

De acordo com Britten (15) é importante a diferenciação de *Streptococcus agalactiae* dos diversos *Streptococcus*, do ponto de vista de diagnóstico e controle porque esse pode ser controlado e até erradicado dos rebanhos, entretanto, com relação as demais espécies tal fato é impraticável, já que eles não respondem as mesmas medidas de prevenção e controle.

Dessa forma, objetivou-se destacar o perfil microbiano de uma propriedade leiteira, que revelou além do isolamento de diferentes espécies de estafilococos, também de estreptococos.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de leite bovino com resultado de CMT positivo com graus variáveis, de uma a três cruces (n=123), foram cultivadas em ágar sangue bovino a 5% e ágar MacConkey por até 72 horas, à 37°C com observação a cada 24 horas das características das colônias, como tamanho, produção de pigmento, hemólise e realização de Gram e prova de catalase para diferenciação entre os gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus*.

As amostras de leite foram colhidas em propriedades leiteiras com 140 vacas holandesas em diferentes estágios e número de lactações com problema de mastites clínicas. Essas amostras foram colhidas por um profissional, médico veterinário, interessado em conhecer a microbiota na mastite subclínica da referida propriedade, localizada na região de Marília, São Paulo. Em todos os casos os micro-organismos foram repicados em BHI para

realização de provas bioquímicas e estudos de perfil de sensibilidade microbiana (dados não apresentados). Às 48 horas, nova avaliação foi realizada, observando-se as mesmas características, e procedimento de novos repiques de outros tipos de micro-organismos isolados, como *Corynebacterium* spp, quando o caso. A caracterização dos estreptococos foi realizada de acordo com Quinn et al. (16), com base em teste de CAMP, hidrólise da Biliesculina e hidrólise da Esculina (Figura 1).

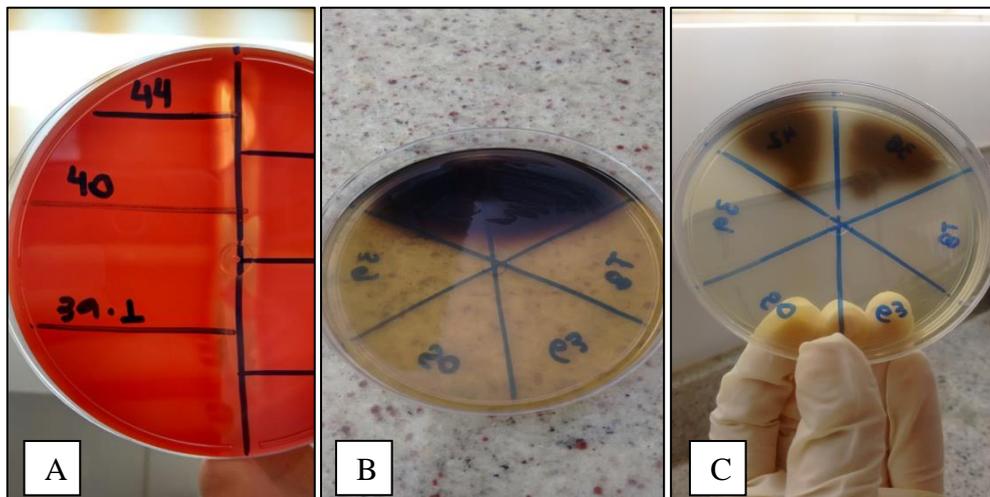


Figura 1. A. CAMP teste; B. Hidrólise da Biliesculina; C. Hidrólise da Esculina

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram isoladas 36 estirpes de *Streptococcus* spp. (29,3%) sendo, 33 (91,7%) caracterizadas como *Streptococcus agalactiae*, 2 (5,6%) como *Streptococcus dysgalactiae* e 1 (2,7%) como *Streptococcus uberis*. O que chamou a atenção é que em 20 (60,6%) dos casos não houve a produção de hemólise (Figura 2) e que em 1 (3,0%) a hemólise era do tipo α , com produção de pigmento esverdeado ao redor da colônia e, hemólise parcial e não β , o que para muitos é uma característica que define o *Streptococcus agalactiae*. A caracterização revelou uma porcentagem considerável de casos onde o micro-organismo, pelas características de colônia e hemólise, sugeria a identificação como *Streptococcus* não *agalactiae*, que na realidade, bioquimicamente, foram caracterizados como *Streptococcus agalactiae*.



Figura 2. *Streptococcus agalactiae* com produção de hemólise do tipo β (beta).

Observou-se ainda que alguns dos isolados com produção de α (alfa) hemólise às 24 horas intensificavam a produção de hemolisina, tendendo a mostrar-se como β hemólise, mas

não verdadeira, se comparável à β hemolisina produzida por estirpes de *Staphylococcus aureus* às 24 horas, por exemplo. Ao se avaliar somente pelas características da colônia e coloração de Gram, há chances de erro na diferenciação dos estreptococos, tanto nos casos subclínicos como clínicos de mastites, impedindo a definição correta quanto ao perfil epidemiológico do agente, ou seja, se de origem contagiosa ou ambiental.

Desta forma sugere-se a associação de provas bioquímicas capazes de classificar corretamente as espécies de estreptococos envolvidos nas mastites, ou de outras ferramentas diagnósticas envolvendo técnicas moleculares ou a proteômica como a espectrometria de massa.

CONCLUSÕES

Conclui-se pela importância das avaliações fenotípicas, morfológicas, bioquímicas e moleculares dos micro-organismos causadores de mastite, principalmente no caso do gênero *Streptococcus* spp para melhor entendimento dos aspectos epidemiológicos relacionados às infecções intramamárias, para a correta avaliação epidemiológica e orientação de medidas de controle.

REFERÊNCIAS

1. Chambers JV. The microbiology of raw milk. In: Robinson RK. Dairy microbiology handbook: the microbiology of milk and milk products. 3rd ed. New York: John Wiley and Sons; 2002. p.39-90.
2. Watts JL. Etiological agents of bovine mastitis. Vet Microbiol. 1988;16:41-66.
3. Langoni H, Silva AV, Cabral KG, Domingues PF. Aspectos etiológicos na mastite bovina: flora bacteriana aeróbica. Rev Bras Med Vet. 1998;20:204-10.
4. De Freitas Guimarães F, Nóbrega DB, Richini-Pereira VB, Marson PM, De Figueiredo JC, Pantoja N, et al. Enterotoxin genes in coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk. J Dairy Sci. 2013;96:2866-72.
5. Bradley AJ. Bovine mastitis: an evolving disease. Vet J. 2002;164:116-28.
6. Schukken YH, Leemput ES, Moroni P, Welcome F, Gurjar A, Zurakowski M, et al. Contagious or environmental: a herd diagnosis. In: Proceedings of the 27o World Buiatrics Congress; 2012; Lisboa. Lisboa: APB; 2012. p.145-8.
7. Schukken YH, González RN, Tikofsky LL, Schulte HF, Santisteban CG, Welcome FL, et al. CNS mastitis: nothing to worry about? Vet Microbiol. 2009;134:9-14.
8. Wilson DJ, Gonzales RN, Das HH. Bovine mastitis pathogens in New York and Pennsylvania: prevalence and effects on somatic cell count and Milk production. J Dairy Sci. 1997;80:2592-8.
9. Souto LIM. Associação entre o índice de mastite em rebanhos bovinos leiteiros e a qualidade microbiológica do leite cru no Estado de São Paulo, Brasil [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2006.

10. Schepers AJ, Lam TJGM, Schukken YH, Wilmink JBM, Hanekamp WJA. Estimation of variance components for somatic cells counts to determine thresholds for uninfected quarters. *J Dairy Sci.* 1997;80:1833-40.
11. Brito MAV, Brito JRF, Ribeiro MT, Veiga VMO. O padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamário das vacas em lactação. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 1999;51:129-35.
12. Langoni H. Qualidade do leite: utopia sem um programa sério de monitoramento da ocorrência de mastite bovina. *Pesqui Vet Bras.* 2013;33:620-6.
13. Gonçalves JL, Tomazi T, Barreiro JR, Braga PAC, Ferreira CR, De Araújo Júnior JP, et al. Produção e composição do leite de vacas com mastite causada por *Corynebacterium* spp. *Vet Zootec.* 2013;20:141-2.
14. Barreiro JR, Braga PAC, Tomazi T, Gonçalves JL, Ferreira CR, Eberlin MN, et al. Identificação rápida de micro-organismos causadores de mastite por espectrometria de massas. *Vet Zootec.* 2013;20:210-1.
15. Britten AM. The role of diagnostic microbiology in mastitis control programs. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2012;28:187-202.
16. Quinn PJ, Carter ME, Markey B. *Clinical veterinary microbiology.* London: Wolfe; 1994. p.237-42.

Recebido em: 16/03/2016

Aceito em: 22/02/2017