

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA
Diretor: Prof. Dr. Paulo M. G. de Lacerda Jr.

ESTUDOS SÔBRE AS MASTITES BOVINAS

I — Contribuição ao estudo dos agentes etiológicos das mastites bovinas (*)

STUDIES ON BOVINE MASTITIS

I — Observations on the causative agents of bovine mastitis

PAULO M. G. DE LACERDA JR.

LUIZ ZANI NETO
Assistente

D. C. DE FREITAS
Assistente

GENERALIDADES

Entre as infecções das vacas leiteiras, as mastites, indiscutivelmente, ocupam um lugar de destaque. Encaradas sob o aspecto econômico são muitíssimo prejudiciais, pois, reduzem, quando não eliminam totalmente, a principal função da vaca leiteira: a produção de leite. Encaradas sob o aspecto infeccioso, são muitíssimo perigosas, pois em sua maioria, os microorganismos encontrados atualmente nas mastites bovinas são patogênicos para o homem, principalmente levando-se em conta ser o leite alimento infantil por excelência.

O leite pasteurizado não apresenta tais riscos e todo êle deveria ser submetido a êsse tratamento, porém, sabemos que assim não o é, e infelizmente existem cidades do interior que não possuem usinas para pasteurização do leite.

Um outro problema é representado pelos leiteiros clandestinos, procurados por pais menos esclarecidos, que, pensando fazer bem a seus filhos, fornecem-lhes exatamente o leite menos higiênico e que maiores perigos oferece.

Na verdade está disseminado o bom hábito de só ser usado leite fervido, mas, em sorvetes, refrescos, êle é ingerido cru.

Na literatura de outros países, numerosas são as pesquisas sobre mastites. Entre nós, embora represente a infecção a mesma importância, raríssimos são os trabalhos sobre o assunto.

Não sabemos com segurança qual a etiologia das mastites de nossas vacas leiteiras. Tal verificação é de grande importância atualmente devido ao uso dos antibióticos na terapêutica das mastites. O uso indiscriminado de antibióticos, principalmente penicilina e estreptomicina, em toda e qualquer mastite, tem provocado uma modificação na flora bacteriana das mesmas.

(*) Apresentado ao II Congresso Pan-Americano de Medicina Veterinária, realizado em São Paulo, de 3 a 10 de abril de 1954.

Conforme acentuou JACQUET na 10ª Jornada Veterinária D'Alfort, tal fato tem influido numa seleção de espécies e variedades resistentes a êsses antibióticos, contribuindo para o desaparecimento de mastites provocadas pelos germes mais sensíveis.

Os microorganismos encontrados por JACQUET foram: *Strep. agalactiae* 60 a 80%; estafilocócos 30% bacilo coli 1% e em mínima percentagem *C. pyogenes* e *C. welchi*.

Estudando os microorganismos causadores de mastites, SCHALM, em 1943, encontrou *Streptococcus agalactiae* em 70 a 90% dos casos, e SCHLOTTHAUER, em 1944, assinalava em 270 microorganismos isolados as seguintes percentagens: estreptocócos 52%; estafilocócos 34%; b. coli 8% e outros germes em pequenas percentagens.

Em Pôrto Rico, em 1947, POMALES-LEBRON e colaboradores, num total de 190 casos, encontraram os seguintes germes: *Streptococcus agalactiae* 87%; outros estreptocócos 2,6%; *C. pyogenes* 5,8%; *Staphylococcus albus* 2,1%; b. coli e b. piociânico 0,5%.

A incidência dos germes sofre no momento contínua modificação, conforme já comentamos, pelo uso de antibióticos e daí o grande interêsse em estudar-se a atual flora bacteriana das mastites.

Neste estudo, as primeiras amostras de leite de vacas com mastites, confirmaram que a etiologia no Estado de São Paulo, parece ser diferente da de outros países ou pelo menos sofre no momento significativas modificações. Quanto às variadas causas, que podem influir nessa etiologia, na discussão dos resultados, levantaremos diversas hipóteses.

I — MATERIAL ESTUDADO

Constou de amostras obtidas em propriedades de criação de gado leiteiro, localizadas em municípios vizinhos da Capital (Campinas, Atibaia, Mogí das Cruzes), onde os animais vivem em regime de estabulação ou semi-estabulação, sob controle técnico permanente e em condições higiênicas próprias para manutenção de um bom estado hígido.

II — COLETA DO MATERIAL

Tôdas as amostras examinadas foram colhidas por pessoas tecnicamente habilitadas, colegas, ou empregados das propriedades suficientemente esclarecidas para tal fim.

Para isso, fornecíamos frascos esterilizados com capacidade para 20 cm³, onde o material era recolhido após "toilette" das mamas.

Esses frascos nos eram remetidos no mesmo dia da coleta, a maioria em caminhões frigoríficos de transporte de leite, e quando isso não era possível eram conservados em geladeira até o momento da remessa. Em nossas mãos, eram examinados imediatamente. A obtenção de inúmeras culturas puras e significativas, falam em abôno da técnica empregada.

III — TÉCNICA DE EXAME

Para o exame do material, tomamos como norma a seguinte orientação:

- a) Prova química;
- b) Microscopia direta;
- c) Isolamento dos germes.

a) Dentre as várias provas químicas utilizadas para se despistar alterações do leite, em presença de mastite, particularmente aquelas recomendadas por UDALL, escolhemos o teste dos cloretos, de HAYDEN, por nos parecer bastante sensível. Aliás, no material em questão a maioria das amostras evidenciava alteração, não nos surpreendendo o resultado sempre positivo da reação.

b) O método microscópico direto das amostras, após coloração pelo método de Gram, foi feito com a finalidade de se avaliar a flora existente, o que nos facilitava a marcha das culturas. Sabe-se que muitas vezes êsse exame microscópico é negativo em se tratando de mastites subclínicas, recomendando-se em tais casos, incubar a amostra durante 24 horas a 37°C.

Em poucos casos tivemos necessidade de lançar mão dêsse recurso.

c) O isolamento de germes obedeceu sempre a um mesmo plano. O material era sistematicamente semeado em três meios líquidos: caldo glicosado, onde se desenvolve bem a generalidade dos germes; caldo bile verde brilhante (Difco), particularmente recomendado para o grupo coliforme; e caldo-nitrogeneto de sódio-cristal violeta, meio seletivo para estreptocócos, conforme ficou bem evidenciado por LACERDA, LACERDA & FREITAS, com base em observações de HARTMAN, LICHSTEIN & SNYDER, e PARKER.

Após um período de incubação de 24 a 48 horas a 37°C, as culturas eram submetidas a exame microscópico e semeadas em placas. Utilizávamos o agar-sangue, para as culturas em caldo glicosado e caldo-nitrogeneto de sódio-cristal violeta. Para as culturas que se desenvolviam em caldo bile verde brilhante, utilizávamos o meio "EMB agar" (B 76 Difco). As colônias desenvolvidas nas placas eram então isoladas para estudo de identificação, variando êstes conforme o tipo de germe. Os seguintes esquemas foram empregados:

- 1 — Estafilocócos: observação de pigmento, hemólise e coagulase.
- 2 — Estreptocócos: hemólise, hidrólise do hipurato de sódio, produção de amônia, ação sobre a lactose, sorbita e trealose. Essa sequência permite reconhecer e diferenciar os principais estreptocócos causadores de mastites.
- 3 — Coliformes: observação em meio de SV e provas bioquímicas de indol, vermelho de metila, Voges & Proskrauer e utilização do citrato em meio de Koser. Tal processo diferencia três grupos de coliformes: o grupo *Escherichia*, o grupo *Aerobacter* e o grupo ainda não bem esclarecido dos coliformes intermediários.
- 4 — O *Corynebacterium pyogenes* é facilmente despistado pelo seu aspecto morfológico e pelo seu desenvolvimento em placa de agar sangue.
- 5 — Outros germes como difteróides, proteus e prodigiosus não ofereceram dificuldade para sua identificação genérica.

CARACTERÍSTICAS DAS AMOSTRAS ISOLADAS

GRUPO I — *Estafilocócos*.

A diferenciação entre estafilocócos patogênicos — piocócos — e os estafilocócos saprófitas, é de fundamental interesse para se avaliar a responsabilidade de uma amostra isolada de um processo infeccioso, na etiologia do mesmo. Geralmente os piocócos são plasmocoagulantes, hemolíticos e fundem rapidamente a gelatina, propriedades essas pouco encontradas nos saprófitas. Reunimos no quadro abaixo, os resultados das observações de nossas amostras.

QUADRO I — CARACTERIZAÇÃO DOS ESTAFILOCÓCOS

	Coagulase	Hemólise	Gelatinase	Nº de amostras	Total
<i>M. pyogenes</i> var. aureus .	+	+	+	12	22
	+	—	+	5	
	—	+	+	2	
	—	—	+	3	
<i>M. pyogenes</i> var. albus .	+	+	+	3	12
	+	—	+	3	
	—	—	+	6	
Total					34

Como vemos, a maioria das amostras por nós isoladas, apresenta propriedades de estafilocócos patogênicos, levando-se em conta principalmente a capacidade plasmocoagulante, evidenciada em 23 das 34 amostras.

GRUPO II — *Streptocócos*.

Na impossibilidade de classificar sorològicamente as amostras de estreptocócos isolados, tentamos uma identificação pelas características bioquímicas, que, sem ser completa, permite reconhecer alguns tipos fundamentais, bem descritos no clássico tratado de sistemática de BREED, R. S. & colaboradores (Bergey's Manual). A nossa atenção voltava-se, como era natural, para o reconhecimento do *Streptococcus agalactiae*, diante da frequência com que tal germe é citado na etiologia das mastites. A observação do tipo de hemólise, hidrólise do hipurato de sódio, produção de amônia e fermentação da lactose, sorbita e trealose permitiu-nos distribuir as amostras como se vê no quadro abaixo:

QUADRO II — CARACTERIZAÇÃO DOS ESTREPTOCÓCOS

Nº de amostras	Hemólise	Hipurato de sódio	Amônia	Lactose	Sorbita	Trealose	Identificação
12	α β ou γ	+	+	+	—	+	<i>St. agalactiae</i>
2	β	—	+	+	+	—	<i>St. zooepidemicus</i>
1	β	—	+	+	—	+	<i>St. equisimilis</i>
1	α ou γ	+	—	+	+	+	<i>St. acidominimus</i>
6	α ou γ	—	—	+	±	±	<i>St. bovis</i>
4	α ou γ	—	—	+ ou —	+ ou —	+ ou —	Não identificados
Total das amostras							26

Observa-se, pela distribuição acima, uma grande predominância do *St. agalactiae*, sobre os demais tipos. As quatro amostras não identificadas correspondem a tipos cujo comportamento bioquímico não se enquadra nos tipos usualmente descritos.

GRUPO III — *Coliformes*.

Este é um outro grupo de germes cuja classificação é muitas vezes difícil. O agrupamento sorològico seria sem dúvida o método ideal de identificação e seria o único capaz de reduzir o grupo pouco conhecido dos chamados coliformes intermediários. Na impossibilidade de realizá-lo, empregamos o método bioquímico lançando mão das quatro reações clássicas dos coliformes: produção de indol, reação do vermelho de metila, reação de Voges & Proskauer e utilização do citrato como fonte de carbono. A estas provas foram submetidos todos

os germes Gram negativos, móveis ou imóveis, fermentadores da lactose, que se desenvolviam em caldo bile verde brilhante e cujas colônias eram típicas do grupo, em meios diferenciais.

Apresentamos abaixo, um quadro demonstrativo dos resultados obtidos:

QUADRO III — CARACTERIZAÇÃO DOS COLIFORMES

Nº de amostra	Lactose	Indol	V M	V P	Citrato	Identificação
6	AG	+	+	--	—	<i>Escherichia coli</i>
4	AG	--	--	+	+	<i>Aerobacter aerogenes</i>
11	AG	+ ou --	+ ou --	+ ou .	+	Coliforme intermediário
Total das amostras						21

Como se observa no quadro acima, há um grande número de coliformes que foge dos tipos bem definidos. Esta é, sem dúvida, uma classificação provisória, fruto da própria complexidade do grupo em questão. Estes germes, todavia, merecem a nosso ver, muita atenção, em vista da percentagem em que foram encontrados.

GRUPO IV — *Corynebacterium pyogenes* e bacilos difteróides.

Reunimos neste grupo os bacilos difteróides ao *C. pyogenes*, porque os primeiros, embora não permitissem uma identificação precisa, apresentavam as características próprias ao gênero *Corynebacterium*.

GRUPO V — *Proteus vulgaris*, *Serratia marcescens* e Gram negativos não identificados.

RESULTADOS

Alguns dos germes que isolamos de amostras de leite de vacas com mastites, não são considerados patogênicos quando na sua localização habitual. Referimo-nos a *Escherichia coli*, *Aerobacter aerogenes* e germes do grupo coliforme. Porém, esses germes foram isolados em cultura pura, de amostras nas quais, na maioria dos casos, o exame direto já revelava grande número de germes Gram negativos, predominando geralmente um único tipo.

Nas mastites por estafilocócos e estreptocócos o exame direto também foi bastante elucidativo, principalmente quando se tratava de estreptocócos, pois suas longas cadeias são características.

As sementeiras, entretanto, obedeceram sempre um mesmo plano, semeando-se tôdas as amostras nos três meios líquidos que julgamos mais indicados.

Não é possível, tratando-se de germes de mastites, serem feitas provas que completem um ciclo reproduzindo a doença em animais de laboratório. Acreditamos, entretanto, que os germes isolados representem a flora bacteriana dos casos por nós estudados.

Neste estudo, que consideramos inicial, já podemos antever a importância de certos fatores que devem ser interpretados, em trabalho futuro que será feito em continuação a este.

Sabemos que as amostras isoladas variam de um rebanho para outro, dependendo das condições de criação, do estado higiênico, influenciando também a idade dos animais e época do ano em que é feito o exame. Importância considerável tem ainda os tratamentos aplicados anteriormente. Referimo-nos às modificações provocadas na etiologia pelo uso de antibióticos.

Preteendemos, num estudo a ser feito em continuação a este, ampliar consideravelmente o número de amostras a serem estudadas e então tôdas as causas que devem ser consideradas, conforme experiências que adquirimos neste trabalho inicial, serão devidamente ponderadas.

Se conseguirmos executar inteiramente o plano que temos em mente, nêle estará incluída a coleta de amostras por um dos pesquisadores bacteriologistas.

No quadro IV estão relacionados os germes por nós estudados.

Germes isolados	Quantidade	Porcentagem
<i>Micrococcus pyogenes</i> var. aureus	22	20,9
<i>Micrococcus pyogenes</i> var. albus	12	11,4
<i>Streptococcus agalactiae</i>	12	11,4
<i>Streptococcus zooepidemicus</i>	2	1,9
<i>Streptococcus equisimilis</i>	1	0,95
<i>Streptococcus acidominimus</i>	1	0,95
<i>Streptococcus bovis</i>	6	5,7
Outros estreptocócos	4	3,8
<i>Corynebacterium pyogenes</i>	7	6,6
<i>Escherichia coli</i>	6	5,7
<i>Aerobacter aerogenes</i>	4	3,8
Germes coliformes	11	10,4
<i>Proteus vulgaris</i>	2	1,9
<i>Serratia marcescens</i>	1	0,95
Germes difteróides	6	5,7
Germes Gram negativos não identificados	8	7,6
Total dos germes	105	—

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Como já dissemos, é impossível no estudo dos agentes etiológicos das mastites preencher-se o postulado de KOCH, reproduzindo-se a doença em animais de laboratório. Nem sequer é possível a verificação da patogenicidade dos germes, pois, alguns dos que isolamos são patogênicos unicamente devido à localização.

Todavia, são de interêsse prático imediato, os resultados que apresentamos e ora discutimos.

Se analisarmos os germes que isolamos de mastites bovinas veremos que de 88 casos foram isolados 105 microorganismos. Em mais alta percentagem, foram encontrados estafilocócos, sendo que de 34 amostras 23 eram positivas na prova da coagulase, a qual, segundo diversos pesquisadores, entre êles BIER e CHAPMAN, é de valor prático indiscutível na diferenciação entre os estafilocócos patogênicos e não patogênicos.

Segundo BELL & colaboradores, entretanto, estafilocócos produtores ou não de estafilocagulose, podem produzir enterotoxina. Esta seria realmente uma prova de invulgar interêsse, mas é de difícil realização, pois a prova que oferece a maior segurança é aquela efetuada em voluntários humanos. Acreditamos que entre os estafilocócos causadores de mastites, seguramente existem alguns capazes de elaborar enterotoxina, o que os tornaria extremamente perigosos quando em leites empregados no preparo de sorvetes, gelados, etc., os quais, como sabemos, são consumidos principalmente por crianças. Além disso, dado o largo emprêgo de antibióticos no tratamento das mastites, e a grande facilidade com que os estafilocócos tornam-se resistentes a êsses agentes terapêuticos, os germes dessa origem apresentam ainda êsse perigo. Esse estudo é feito na segunda parte dêste trabalho.

Quanto à frequência das espécies do gênero *Micrococcus*, que aqui comentamos, e que representaram 32,3% do total de microorganismos, não foi diferente daquelas assinaladas por JACQUET (30%) e SCHLOTTHAUER (34%). Difere largamente entretanto daquela assinalada por POMALES-LEBRON & colaboradores que em Pôrto Rico encontraram unicamente 2,1% dêsse germe.

Analisando-se o grupo dos estreptococos vê-se que êsses germes foram por nós encontrados em percentagem bem menor que as comumente assinaladas. Representam êles 24,8% dos microorganismos por nós isolados, número muito diferente do assinalado por JACQUET, que encontrou de 60 a 80% de *Streptococcus agalactiae*. Não assinalou êle outros estreptocócos e, como vemos no quadro II, o *Streptococcus agalactiae* representou somente 11,4% do total de germes. Da mesma forma, SCHALM, encontrou o *Streptococcus agalactiae* em 70 a 90% das mastites. SCHLOTTHAUER 52% e POMALES-LEBRON & col. assinalaram 87%. Êstes últimos encontraram ainda 2,65 de outros estreptocócos. Não

sabemos a que atribuir tal diferença. Muitas das amostras de leite foram colhidas de vacas que não apresentavam ainda sintomas de mastites e a suspeita provinha da prova química positiva. Uma das propriedades faz prova química diariamente do leite de todos os animais e outras fazem semanalmente. Por outro lado, recebemos também amostras de leite cujo simples exame macroscópico já indicava provir de vacas com mastite.

Lembramos que utilizamos um meio seletivo para os estreptocócos, por nós já bastante usado com bons resultados, e que foi justamente proposto por HARTMAN para isolamento de estreptocócos de mastite bovina.

Quanto ao grupo coliforme, que entra na percentagem de 20% do total de microorganismos, é 2,5 vezes maior que a percentagem assinalada por SCHLOTTHAUER que encontrou 3%. JACQUET encontrou apenas 1% e POMALES-LEBRON & col. assinalaram 1,5%.

Numerosas hipóteses poderiam ser levantadas em torno desta última discordância de resultados, porém, só a continuação destas observações permitiria fazê-las apoiadas em bases aceitáveis. Os demais germes encontrados em número significativo, foram o *Corynebacterium pyogenes* em 6,6% dos casos e b. difteróides em 5,7%. O *C. pyogenes* é sabido ser um germe encontrado nas mastites, tendo importância por ser pouco sensível aos antibióticos. Com cinco meses de intervalo, já pudemos isolá-lo do úbere de vacas com mastite. É germe que tem grande capacidade para persistir no úbere bovino.

Quanto aos demais, nada podemos alvitrar em vista da escassez com que foram observados. Provieram de úberes infectados, foram obtidos em culturas puras, mas seu significado etiológico e patogênico não pode ser avaliado à vista destes primeiros resultados.

RESUMO

Os autores estudaram 88 amostras de leite de vacas com mastite, provenientes de gado estabulado e semi-estabulado, de propriedades próximas à cidade de São Paulo. Isolaram 105 microorganismos, assim distribuídos: estafilocócos, 32,3%; estreptocócos, 21,8%; b. coli e germes do grupo coliforme, 19,9%; *C. pyogenes*, 6,6% e bacilos difteróides, 5,7%. Outros germes foram isolados em menor número. As técnicas empregadas na identificação dos microorganismos são descritas e os resultados são discutidos.

SUMMARY

Analysis of milk samples collected nearby São Paulo city, from 88 cows affected with mastitis have been carried out.

One hundred five germs could be isolated as follows:

Staphylococci, 32.3; Streptococci, 24.8; coli bacillus and other coliforms 19.9%; *Corynebacterium pyogenes*, 6.6%; difteroid germs, 5.7%; other types of microorganisms have been observed in fewer number. The method employed for isolation and identification of the microorganisms have been described and the results discussed.

BIBLIOGRAFIA

- BELL, Wilson B. et al — 1952 — Production of Enterotoxin by Staphylococci Recovered from Bovine Mammary Gland. *Vet. Med.* 47(8):321-22.
- BIER, O. G. — 1932 — Sobre a diferenciação entre os estafilocócos patogênicos e os estafilocócos da pele. *Rev. Ass. Paul. Med.*, 1:415.
- BREED, R. S.; MURRAY, E. G. D. and HITCHENS, A. P. — 1948 — *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*: 313. 6th ed. London, Baillière, Tindal & Cox.
- CHAPMAN, G. H.; BERENS, C.; PETERS, A. and CURSIO, L. — 1934 — Congulase and Hemolysin Tests as Measures of the Pathogenicity of Staphylococci. *Jour. Bact.*, 28: 343-63.
- HARTMAN, G. — 1937 — Ein Beitrag zur Reinzüchtung von Mastitis — Streptokokken aus verunreinigen Material. *Milchw. Forsch.*, 18:116-22 cit. Liestein, *Jour. Bact.*, 42: 653-64.
- HAYDEN, C. E. — 1932 — Field tests for chlorine in milk for the detection of mastitis. *Cornell Vet.* 22:277.
- JACQUET, M. — 1953 — Mammites et antibiotiques. *Les Cahiers de Médecine Veterinaire*, XXII:110-11.
- LACERDA, P. M. G. de — 1951 — Contribuição para o conhecimento de etio-epizootiologia da adenite equina (garrotinho). *Tese. Fac. de Medicina Veterinária. Universidade de São Paulo.*
- LACERDA, P. M. G. de & FREITAS, D. C. de — 1952 — O emprego do nitrógeno de sódio (NaN_3) em meios seletivos para estreptocócos. *Rev. Fac. Med. Vet. Univ. de São Paulo*, 4:553-57.
- LICHSTEIN, H. C.; SNYDER, M. L. — 1944 — The inhibition of the Spreading Growth of Proteus and Other Bacteria to Permit the Isolation of Associated Streptococci. *Jour. Bac.*, 42:653-64.
- PACKER, R. A. — 1942 — The Use of Sodium Azide (NaN_3) and Crystal Violet in a Selective Medium for Streptococci. *Master of Science Degree Thesis, Iowa State College.* Cit. MERCHANT, I. A. — *Veterinary Bacteriology and Virology*: 94. 1st ed. The Iowa State College Press, 1950.
- POMALES-LEBRON, A.; BARALT, J. & MORALES-OTERO, P. — 1947 — The organisms causing mastitis in Puerto Rico. *Am. Jour. Vet. Res.* 8:338-40.
- SCHALM, O. W. — 1913 — Bovine Mastitis. *Cal. Agr. Exp. Sta. Cir.* 355:1-14; cit. SCHMIDTBAUER: *North Am. Vet.* 25:85.
- SCHLOTTLAUER, Carl F. — 1944 — Bovine mastitis: its diagnosis, etiology and treatment. *North Am. Vet.* 25:84-90.
- UDALL, D. H. — 1943 — *The Practice of Veterinary Medicine*. 4th. ed. Ithaca, New York