

# *Corynebacterium bovis* E SUA IMPORTÂNCIA NA ETIOLOGIA DA MASTITE BOVINA NO ESTADO DE SÃO PAULO<sup>1</sup>

ELIZABETH OLIVEIRA DA COSTA<sup>2</sup>, VANIA MARIA DE CARVALHO<sup>3</sup>, SELENE DALL'ACQUA COUTINHO<sup>3</sup>,  
WISNER CASTILHO<sup>3</sup> E LIGIA FROES LOPES CARAMORI<sup>1</sup>

**ABSTRACT.** - Costa E.O., Carvalho V.M., Coutinho S.D., Castilho W. & Caramori L.F.L. 1985. [Importance of *Corynebacterium bovis* in bovine mastitis aetiology in the State of São Paulo, Brazil.] *Corynebacterium bovis* e sua importância na etiologia da mastite bovina, no Estado de São Paulo. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 5(4): 117-120. Depto. Med. Vet. Preventiva e Saúde Animal, Fac. Med. Vet. Zootec., Univ. S. Paulo, Av. Corifeu de Azevedo Marques 2720, Vila Lageado, São Paulo, SP 05340, Brazil.

Data on the isolation of *Corynebacterium bovis* from a study realized in dairy herds from 17 municipalities in the State of São Paulo, Brazil, are presented and discussed. The microorganism was isolated from 954 (32.5%) of the 2935 samples examined. The percentage of isolation in the different municipalities varied from 0.0 to 73.6. Pure cultures were obtained from 28.2% of the quarters showing clinical mastitis and from 27.5% of those with sub-clinical mastitis as detected by the California Mastitis Test (CMT) and modified Whiteside test. In addition to pure cultures, *C. bovis* was isolated together with *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Pseudomonas sp.*, Enterobacteriaceae, Actinomycetales and others from 58.3% of the samples, predominantly from quarters with mastitis. In outbreaks of *C. bovis* in three dairy herds, the microorganism was isolated from more than 70% of the samples, 78.8% of the isolations coming from quarters with clinical or sub-clinical mastitis.

**INDEX TERMS:** *Corynebacterium bovis*, mastitis, bovine, São Paulo (State).

**SINOPSE.** - São apresentados e discutidos dados sobre o isolamento de *Corynebacterium bovis* no estudo realizado em propriedades de exploração leiteira, de 17 municípios do Estado de São Paulo, Brasil. Este microrganismo foi isolado de 954 das 2935 amostras examinadas (32,50%). A porcentagem de isolamento variou de 0,00% a 73,57% nos diferentes municípios. Foi obtido em cultura pura em 28,18% de quartos com mastite clínica e 27,45% daqueles com mastite sub-clínica (detectados pelas provas de CMT e Whiteside modificado). Além dos isolamentos em cultura pura, foi encontrado associado a outros microrganismos, como *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Pseudomonas sp.*, Enterobacteriaceae, Actinomycetales e outros, em 58,27% das amostras, predominantemente de quartos com mastite. No presente trabalho são também relatados surtos por *Corynebacterium bovis* em três propriedades. Nestes surtos esse microrganismo foi isolado em mais de 70,00% das amostras, correspondendo 78,75% desses isolamentos a quartos com processos de mastite clínica e sub-clínica.

**TERMOS DE INDEXAÇÃO:** *Corynebacterium bovis*, mastite, bovinos, Estado de São Paulo.

## INTRODUÇÃO

Assinalado por Mac Ewen & Cooper em 1947, foi considerado por muito tempo como eventual comensal do úbere bovino. Só em 1962, no trabalho de Cobb & Walley considerou-se *Corynebacterium bovis* como patógeno, com base nos seguintes elementos: observação de surto em propriedade de exploração leiteira, sendo então isolado em cultura pura de leite, de quartos com mastite clínica; prevalência de 31,26% em levantamento realizado pelos autores em 2772 amostras; e principalmente, pela habilidade em determinar mastite clínica persistente após inoculação experimental intra-mamária.

Forbes (1970), Black et al. (1972) e Bramley et al. (1976), postularam que a presença de *Corynebacterium bovis* poderia constituir um mecanismo de controle biológico de mastite. Com o intuito de comprovar esta hipótese, diversos pesquisadores delinearão experimentos com o referido microrganismo, não obtendo entretanto sucesso (Rainard & Poutrel 1982, Brooks & Barnum 1984, Honkanen-Buzalski & Bramley 1984).

Pela literatura verifica-se que qualquer que seja a patogenia de *Corynebacterium bovis* na etiologia das mastites, sua prevalência é alta, sendo mesmo considerado em alguns trabalhos como o agente mais prevalente (Brooks & Barnum 1983, Honkanen-Buzalski et al. 1984).

O objetivo deste trabalho é relatar a ocorrência de *Corynebacterium bovis* entre os microrganismos mais frequentemente isolados, em estudo da etiologia de mastite bovina, realizado no Estado de São Paulo, no período de 1979 a 1984 e discutir o significado destes dados.

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 14 de agosto de 1985.

<sup>2</sup> Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Av. Corifeu de Azevedo Marques 2720, Vila Lageado, São Paulo, SP 05340.

<sup>3</sup> Estagiários, Depto. Med. Vet. Preventiva e Saúde Animal, Fac. Med. Vet. Zootec., USP.

## MATERIAL E MÉTODOS

Durante o estudo realizado no período de 1979 e 1984, foram examinadas 2935 amostras de leite bovino, de 26 propriedades, localizadas em 17 municípios do Estado de São Paulo.

Foram utilizadas como prova da determinação do conteúdo celular os métodos de CMT (*California Mastitis Test*), conforme Schalm & Noorlander (1957) e Whiteside modificado, segundo técnica de Murphy & Hanson (1942).

As amostras foram semeadas em agar infusão cérebro coração (BHI), "Mannitol Salt agar", agar sangue esculina-acetato de tálio-cristal violeta, agar Sabouraud dextrose com cloranfenicol (100 mg/l). Após 48-72 horas de incubação a 37°C, observou-se o desenvolvimento de colônias pequenas, de coloração creme, em BHI e "Mannitol Salt agar". O exame bacterioscópico corado pelo método de Gram indicou a presença de bastonetes delicados Gram positivos, alguns em forma de clavos dispostos em paliçada. Na identificação bioquímica desses microrganismos utilizou-se a prova de oxidação e fermentação em meio de Hughs & Leifson; a produção de catalase, oxidase e urease; glicose acidificação; motilidade em agar semi-sólido; a resistência em meio contendo 8,5% de NaCl. Os outros microrganismos isolados foram submetidos às provas de identificação bioquímicas, culturais, morfológicas peculiares ao gênero em questão (Lenette et al. 1974). Sendo então classificados de acordo com Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1974).

## RESULTADOS

As amostras classificadas como *Corynebacterium bovis* comportaram-se da seguinte forma frente às provas realizadas: oxidação e fermentação negativas; catalase positiva, oxidase positiva, urease positiva, glicose acidificação positiva ou negativa, motilidade negativa, crescimento positivo em meio contendo alta concentração de NaCl.

Os resultados quanto à frequência de isolamento do agente nos diferentes municípios estão agrupados no Quadro 1, variando de 0,00 (zero) no município de São João da Boa Vista a 73,57% em São Carlos. Observa-se que, das 2935 amostras exa-

minadas, isolou-se *Corynebacterium bovis* de 954, ou seja, 32,50%.

O Quadro 2 relaciona a intensidade do processo inflamatório, discriminando a ocorrência de associação de *C. bovis* a outros microrganismos. Assim verifica-se que de um total de 954 amostras de *Corynebacterium bovis* 41,71% foram isolados em cultura pura e 58,27% associadas a outros microrganismos (*Streptococcus sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Pseudomonas sp.*, Enterobacteriaceae, Actinomycetales, fungos micelianos e leveduras). Das amostras isoladas em cultura pura 55,63% determinaram processos de mastite, sendo 28,18% mastite clínica e 27,45% sub-clínica. A associação mais frequentemente observada foi com *Staphylococcus sp.* (31,65%). A associação de *C. bovis* e *Streptococcus sp.* traduziu-se em aumento da porcentagem de mastite clínica em relação a esses agentes quando ocorrem isolados, observando-se as seguintes porcentagens de mastite clínica:

<i>Corynebacterium bovis</i>	28,18%
<i>Streptococcus sp.</i>	49,95%

e 60,19% pela associação desses agentes (Quadros 2 e 3).

No Quadro 4 estão apresentados os dados referentes a dois surtos registrados no transcorrer deste trabalho, em propriedades dos municípios de Araras e São Carlos. Observou-se, respectivamente, o percentual de 71,97 e 73,57% de isolamento de *Corynebacterium bovis* do total de amostras examinadas, correspondendo a casos de mastite clínica e sub-clínica em Araras e São Carlos o percentual de 61,05% no primeiro e 78,75% no último.

## DISCUSSÃO

*Corynebacterium bovis*, considerado como um patógeno menor, de importância secundária na etiologia da mastite bovina ou ainda para alguns autores como comensal do úbere dos bovinos Brooks e Barnum (1984), apresenta-se como um dos mais prevalentes microrganismos em levantamentos realizados em diferentes países Coob & Walley 1962, Brooks et al. 1983, Honkanen-Buzalski et al. 1984).

No presente estudo foi obtido o isolamento deste microrganismo em 32,50% das 2935 amostras examinadas, nível semelhante ao assinalado por Cobb & Walley (1962), 31,0% em 2772 amostras. A porcentagem de isolamento variou entre as regiões, de 0,00% em São João da Boa Vista a 73,57% em São Carlos. Brooks et al. (1983) também observaram variação ampla, 0 a 88%, nos níveis de ocorrência por propriedade, e Honkanen-Buzalski et al. (1984) registraram taxa média de infecção de 53,9%. A semelhança do observado neste estudo, quando comparado com dados disponíveis em outros países, sugere a existência de um padrão de infecção.

Esta alta prevalência, acentuada nos últimos anos, tem determinado um crescente interesse no esclarecimento da patogenicidade deste microrganismo por pesquisadores de diferentes nacionalidades envolvidas com a pecuária leiteira.

Forbes (1970), Black et al. (1972), Bramley et al. (1976) além de não considerarem o agente patogênico, aventaram a hipótese de que a presença de *C. bovis* protegeria o úbere de infecções pelos chamados patógenos maiores (*Staphylococcus*

Quadro 1. Isolamento de *Corynebacterium bovis* em levantamento de mastite realizado em 26 propriedades de 16 municípios do Estado de São Paulo, 1979-1984

Municípios	Total de amostras	<i>Corynebacterium</i>	
		Nº de amostras	%
Araras	157	113	71,97
Atibaia	301	131	43,52
Avaré	377	067	17,77
Campinas	118	062	52,54
Colina	267	058	21,72
Fernandópolis	040	002	5,00
Pindamonhangaba	275	082	29,81
Pinhal	069	014	20,28
Pirajuí	023	001	4,34
Pirassununga	396	003	0,75
Salto Itú	183	053	28,96
São Carlos	352	259	73,57
São João B. Vista	066	000	00,00
São Paulo	046	003	6,52
Tambaú	146	054	36,98
Tatuf	030	014	46,66
Tietê	089	038	42,69
Total	2.935	954	32,50

*aureus*, *Streptococcus agalactiae* e outros), constituindo um mecanismo de controle biológico de mastite.

Esta hipótese, entretanto, não foi confirmada, seja através de delineamentos experimentais (Rainard & Poutrel 1982, Brooks & Barnum 1983, Honkanen-Buzalski & Bramley 1984) ou por observações de campo (Counter 1981, Honkanen-Buzalski et al. 1984).

Deve-se considerar, entretanto, que desde 1962 Cobb & Walley demonstraram de maneira clara que *C. bovis* exerce papel patogênico no úbere bovino. Verificaram alta prevalência do microrganismo, isolando-o em cultura pura de mastite clínica e reproduzindo experimentalmente esta afecção, por inoculação intra-mamária do agente.

Os resultados do presente estudo, como exposto no Quadro 3, demonstram uma alta porcentagem de mastite clínica em que o microrganismo foi isolado em cultura pura (28,18%),

revelando seu potencial patogênico. *Staphylococcus sp.* e *Streptococcus sp.* em cultura pura foram isolados em 35,40% e 49,95%, respectivamente, de casos de mastite clínica. A análise do Quadro 2 permite verificar a ocorrência de 31,45% de mastite clínica por associação *Corynebacterium bovis* e *Staphylococcus sp.* e 60,19% de mastite clínica por *Corynebacterium bovis* associado a *Streptococcus sp.* Estes resultados por si só refutam à hipótese de que este microrganismo poderia constituir um controle biológico de mastite como sugerido por diversos autores (Forbes 1970, Black et al. 1972), Bramley et al. 1976, Brooks et al. 1983).

Assertiva semelhante havia sido proposta em relação a *Staphylococcus epidermidis*, sendo posteriormente demonstrada a patogenicidade deste microrganismo na mastite bovina, por Holmberg 1973, através de inoculação experimental, bem como os prejuízos representados pela diminuição na pro-

Quadro 2. Ocorrência de *Corynebacterium bovis* isolado e associado a outros microrganismos em processos de mastite bovina em levantamento realizado no Estado de São Paulo, 1979-1984

Amostras	Mastite						Portador		Total	
	Clínica		Sub-Clínica		Total		Nº	%	Nº	%
	Nº	%	Nº	%	Nº	%				
<i>Corynebacterium bovis</i> (a)	115	28,18	112	27,45	227	55,63	171	44,36	398	41,71
<i>Corynebacterium bovis</i> ± <i>Staphylococcus</i>	095	31,45	096	31,78	191	63,24	111	36,75	302	31,65
<i>Corynebacterium bovis</i> ± <i>Staphylococcus</i>	062	60,19	025	24,27	087	84,46	016	15,53	103	10,79
<i>Corynebacterium bovis</i> ± outros microrganismos (b)	071	47,01	049	32,45	110	72,84	031	20,52	151	15,83
Total	343	35,95	282	29,55	665	69,70	329	34,48	954	100,00

(a) Isolados em cultura pura.

(b) Bactérias, fungos micelianos e leveduras.

Quadro 3. *Corynebacterium bovis*, *Staphylococcus sp.* e *Streptococcus sp.* relacionados à intensidade do processo inflamatório em levantamento etiológico de mastite bovina, no Estado de São Paulo, 1979-1984

Amostras <sup>(a)</sup>	Mastite						Portador		Total	
	Clínica		Sub-Clínica		Total		Nº	%	Nº	%
	Nº	%	Nº	%	Nº	%				
<i>Corynebacterium bovis</i>	115	28,18	112	27,45	227	55,63	171	44,36	398	13,58
<i>Staphylococcus sp.</i>	245	35,30	211	30,40	456	65,70	238	34,29	694	23,64
<i>Streptococcus sp.</i>	208	49,95	104	24,52	312	73,58	056	13,20	424	14,44

(a) Isolados em cultura pura.

Quadro 4. Ocorrência de mastite bovina por *Corynebacterium bovis* sob a forma de surto em propriedades dos municípios de Araras e São Carlos, Estado de São Paulo

Municípios	Total de amostras	<i>Corynebacterium bovis</i> %	Mastite			Portadores %
			Clínica %	Sub-Clínica %	Total %	
Araras	157	71,97	35,39	25,66	61,05	38,93
São Carlos	352	73,57	40,92	37,83	78,75	21,23

dução leiteira, em quartos infectados por *Staphylococcus epidermidis*, foram bem caracterizados no trabalho de Langeegger et al. (1981).

Em relação à diminuição da produção de leite em quartos infectados por *Corynebacterium bovis*, Natzke et al. (1972) verificaram um decréscimo de 857 kg em 365 dias de lactação, em vaca com um quarto infectado por *Corynebacterium bovis*. Sendo observado nas mesmas condições um decréscimo de 760 e 878 kg em quartos infectados, respectivamente, com *Staphylococcus sp.* e *Streptococcus sp.*

Concluindo, a alta prevalência indica uma alta infectividade do agente; o isolamento em cultura pura de casos de mastite clínica e sub-clínica reflete a patogenicidade deste microrganismo. A ocorrência sob forma de surtos (Cobb & Walley 1962, Counter 1981) e a observada no presente estudo em propriedades dos municípios de São Carlos e Araras (Quadro 4), demonstram a interação destas duas características do agente, a infectividade e patogenicidade. Somando-se a estes aspectos o prejuízo determinado pela diminuição da produção leiteira (Natzke et al. 1972), torna-se evidente o risco real representado por *Corynebacterium bovis* no desenvolvimento da pecuária leiteira. Evidenciando a necessidade de adoção de medidas profiláticas, como desinfecção de tetos pós-ordenha e instituição de terapia ao fim de lactação, práticas estas que se mostraram eficientes como registraram vários autores (Brooks et al. 1983, Honkanen-Buzalski 1984).

Honkanen-Buzalski et al. (1984) referiram que as infecções naturais por *Corynebacterium bovis* são persistentes, a menos que os quartos infectados sejam tratados com antibióticos, ressaltando a deficiência de publicações quanto à resposta terapêutica. No surto ocorrido em propriedade do município de São Carlos, após tratamento com antibióticos selecionados através de antibiograma das amostras isoladas, observou-se diminuição do percentual de 78,85 de mastites para 3,95%, sendo que estes casos persistentes corresponderam a mastites onde *Corynebacterium bovis* estava associado a outros agentes. No trabalho de Costa et al. (1985) verificou-se que as amostras de *Corynebacterium bovis* isoladas de mastite bovina apresentaram "in vitro" alta sensibilidade aos antimicrobianos testados.

#### REFERÊNCIAS

- Black R.T., Bourland C.T. & Marshall R.T. 1972. California Mastitis test reactivity and bacterial invasion in quarters infected with *Corynebacterium bovis*. J. Dairy Sci. 55: 1016-1017.
- Bramley A.J., King Will R.G., Griffin T.K. & Simp Kin D.L. 1976. Prevalence of *Corynebacterium bovis* in bovine milk samples. Vet. Rec. 99: 275.
- Brooks B.W., Barnum D.A., & Meek A.H. 1983. An observational study of *Corynebacterium bovis* in selected Ontario dairy herds. Can. J. Comp. Med. 47: 73-78.
- Brooks B.W., & Barnum D.A. 1984. Experimental colonization of the bovine teat duct with *Corynebacterium bovis* and the effect on milk somatic cell counts. Can. J. Comp. Med. 48: 141-145.
- Buchanan R.E., & Gibbons N.E. (ed.) 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th ed. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Cobb R.W., Walley J.K. 1962. *Corynebacterium bovis* as a probable cause of bovine mastitis. Vet. Rec. 74:101-102.
- Costa E.O., Coutinho S.D., Castilho W. & Teixeira C.M. 1985. Sensibilidade a antibióticos e quimioterápicos de bactérias isoladas de mastite bovina. Pesq. Vet. Bras. 5(2): 65-69.
- Counter D.E. 1981. Outbreak of bovine mastitis associated with *Corynebacterium bovis*. Vet. Rec. 108: 560-561.
- Forbes D. 1970. The pathogenic significance of various intra mammary infections. Brit. Vet. J. 126: 260-7.
- Holmberg O. 1973. *Staphylococcus epidermidis* isolated from bovine milk. Biochemical properties, phage sensitivity and pathogenicity for the udder. Acta Vet. Scand. (Suppl.) 45: 1-144.
- Honkanen-Buzalski T., Griffin T.K. & Dadd F.H. 1984. Observations on *Corynebacterium bovis* infection of the bovine mammary gland. I. Natural infection. J. Dairy Res. 51:371-378.
- Honkanen-Buzalski T. & Bramley A.J. 1984. Observations on *Corynebacterium bovis* infection of the bovine mammary gland. II. Experimental infection. J. Dairy Res. 51: 379-385.
- Langenegger J., Viani M.C.E. & Bahia M.G. 1981. Efeito do agente etiológico da mastite sub-clínica sobre a produção de leite. Pesq. Vet. Bras. 1(2): 47-52.
- Lenette L.H., Spaulding E.H. & Trisant J.P. 1974. Manual of clinical microbiology. 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Mac Ewen A.D. & Cooper M.B. 1947. Bovine mastitis. Vet. Rec. 59: 655-64.
- Murphy J.M. & Hanson J.J. 1942. A modified Whiteside test for the detection of chronic bovine mastitis. Cornell Vet. 32: 439-444.
- Natzke R.P., Everett R.W., Guthrie R.S., Keowin J.F., Meek W.G., Merrill W.G., Roberts S.J. & Schmidt G.H. 1972. Mastitis Control Program: effect on milk production. J. Dairy Sci. 55: 1256-1260.
- Rainard P. & Poutrel B. 1942. Dynamics of non clinical bovine intramammary infections with major and minor pathogens. Am. J. Vet. Res. 43(12): 2143-2146.
- Schalm O.W. & Noorlander D.O. 1957. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. J. Am. Vet. Med. Assoc. 130: 199-204.