

## Caracterização de *Staphylococcus* coagulase-positiva utilizando plasmas de diferentes espécies animais

### Characterization of coagulase-positive *Staphylococcus* by using plasmas from different animal species

RIALA6/1416

Geraldo Márcio da COSTA<sup>1\*</sup>, Ulisses de Pádua PEREIRA<sup>1</sup>, Dircéia Aparecida da Costa CUSTÓDIO<sup>1</sup>, Nivaldo da SILVA<sup>2</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Laboratório de Microbiologia, Setor Medicina Veterinária Preventiva, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil. CEP-37200-000, campus universitário. Telefone: (35) 3829-1727, e-mail: gmcosta@dmv.ufla.br

<sup>2</sup>Laboratório de Doenças Bacterianas, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária, UFMG.

Recebido: 09.05.2011 - Aceito para publicação: 07.10.2011

#### RESUMO

No presente estudo foi avaliada a eficiência de plasmas de origens leporina, bovina, equina, canina e humana na execução do teste de coagulase em cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas de bovinos (n=174), de seres humanos (n=71) e de cães (n=70). As leituras dos testes foram realizadas após diferentes tempos de incubação. O plasma leporino apresentou os melhores resultados, exceto nos isolados bacterianos de cão, para os quais o plasma de equino foi o que demonstrou os melhores resultados entre 4 e 12 horas de incubação. Nenhum isolado que tenha apresentado resultado negativo frente ao plasma leporino reagiu positivamente aos demais plasmas. Os plasmas de coelho e de cavalo foram os que revelaram os melhores resultados para os isolados bacterianos de origem humana e bovina. Verificou-se que os plasmas, quando utilizados para isolados da espécie homóloga, mostraram baixa eficiência. A coagulação do plasma leporino ocorreu em até duas horas de incubação em 92% das amostras de *Staphylococcus* de origem bovina. De acordo com os resultados obtidos, o plasma de equino pode ser utilizado para a realização de testes de coagulase em cepas de *Staphylococcus* isoladas de cães, bovinos e seres humanos, com resultados semelhantes àqueles observados com o plasma leporino.

**Palavras-chave.** identificação bacteriana, plasma, *Staphylococcus* coagulase-positiva, *Staphylococcus* caracterização.

#### ABSTRACT

This study evaluated the efficiency of plasmas from rabbits, cattle, horses, dogs and humans for improving the coagulase test performance on *Staphylococcus* strains isolated from bovine mastitis (n=174), human (n=71) and dogs (n=70). The readings of the tests readings were performed after different incubation periods. Leporine plasma showed the best results in the coagulation tests, excepting on the bacteria strains isolated from dogs. To these strains, the equine plasma showed the best results in the first 12 hours of incubation and the rabbit plasma exhibited similar results after 12 hour of incubation. No strain, with a negative result for the rabbit plasma, reacted positively to the other animal plasmas. Rabbit and equine plasmas exhibited the best results to the bacterial isolates with human and bovine origins. Low efficiency was evidenced in performing the assays when using the plasmas of the homologous species from the strain that was isolated. Coagulation of leporine plasma occurred within two hours of incubation in 92% of bovine strains. According ours results, the equine plasma might be used for performing the coagulase tests in *Staphylococcus* isolates from dogs, cattle and humans, and getting similar results to those provided by the rabbits plasma.

**Keywords.** bacteria identification, plasma, coagulase positive *Staphylococcus*, *Staphylococcus* characterization.

## INTRODUÇÃO

Os micro-organismos do gênero *Staphylococcus* apresentam um diversificado arsenal de fatores de patogenicidade, representado por adesinas, enterotoxinas, hemolisinas, leucocidinas, produção de biofilmes, habilidade de invadir células epiteliais, dentre outros, os quais contribuem para colonizar e lesionar seus hospedeiros<sup>1,2</sup>. Entre estes fatores, destaca-se a estafilocagulase, uma proteína que possui ação enzimática e reage com a protrombina, formando um complexo denominado estafilotrombina que converte o fibrinogênio em fibrina e coagula o plasma<sup>1,3</sup>. Esta enzima extracelular é produzida por várias espécies do gênero *Staphylococcus*, incluindo, a maioria das cepas de *Staphylococcus aureus* e de *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus delphini*, *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus* e *Staphylococcus scheliferi* subsp. *coagulans*, sendo usada como um indicador de virulência e marcador fenotípico para a diferenciação destas espécies<sup>4,5</sup>.

Existem 29 espécies e subespécies no gênero *Staphylococcus*<sup>6</sup>, as quais têm sido associadas aos diversos quadros patológicos nos seres humanos e nos animais. A identificação precisa de cada uma das espécies por meio de testes bioquímicos usuais é normalmente dispendiosa e trabalhosa. Desse modo, o teste de coagulase em tubo, um teste prático por ser rápido e necessitar de poucos recursos<sup>7</sup>, tem sido utilizado para a identificação de isolados deste gênero dotados de maior potencial patogênico, geralmente de maior interesse clínico e epidemiológico, tanto na medicina humana, quanto na veterinária.

Entre os *Staphylococcus* coagulase-positiva (SCP), *S. aureus* e *S. intermedius* estão envolvidos em importantes quadros patológicos em seres humanos, bovinos e caninos. Nos seres humanos, *S. aureus* tem sido associado com pneumonias, conjuntivites, osteomielites, septicemias, intoxicações alimentares, furunculose, dentre outras patologias<sup>1,2</sup>. Em bovinos, este micro-organismo tem sido relatado como um dos agentes mais prevalentes na etiologia das mastites e que, isoladamente, causa os maiores prejuízos na pecuária leiteira mundial, ocasionando a redução da produtividade do rebanho e alterações físico-químicas do leite, com prejuízos para a indústria, para os produtores e para a saúde do consumidor<sup>8,9</sup>. Nos caninos, *S. intermedius* tem sido associado, principalmente, a otites, conjuntivites, piodermites, discoespondilites e abscessos<sup>10,11</sup>.

Devido à importância clínica e epidemiológica dos SCP nos processos patológicos em seres humanos e nos animais, em relação às demais espécies coagulase-negativa do mesmo gênero, é imprescindível a identificação dos mesmos para que possam ser adotadas alternativas mais adequadas de tratamento e de controle.

Normalmente, para a realização do teste de coagulase, utiliza-se plasma de coelho, que nem sempre está disponível nos laboratórios de diagnóstico microbiológico. Desse modo, em diversos laboratórios, são utilizados plasmas obtidos de seres humanos e de outras espécies de animais para a execução do teste, sem haver uma avaliação da eficiência desta metodologia. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar e comparar a eficiência do teste de coagulase em tubos utilizando plasmas de diferentes espécies para a discriminação de amostras de *Staphylococcus* spp. coagulase-positiva isoladas de bovinos, seres humanos e cães.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostras de *Staphylococcus*

Foram utilizados 315 isolados de *Staphylococcus* spp. de origens humana, canina e bovina. As amostras de origem humana (n=70) foram obtidas de *swabs* nasais de indivíduos saudáveis da cidade de Lavras, MG. As amostras provenientes de cães (n=71) foram isoladas a partir de *swabs* obtidos do conduto auditivo de cães otopatas e não otopatas atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Lavras. Os isolados de origem bovina (174) foram obtidos de quartos mamários individuais de bovinos da bacia leiteira do sul de Minas Gerais afetados por mastite clínica ou subclínica.

O isolamento das amostras foi realizado em Ágar Sangue (Agar Sangue Base-Himedia®) contendo 5% de sangue desfibrinado de carneiro. As placas foram incubadas em temperatura de 37 °C por 18-24 horas. Para a identificação presuntiva dos micro-organismos pertencentes à família Micrococcaceae e gênero *Staphylococcus*, foram realizados os seguintes testes presuntivos, de acordo com Quinn et al.<sup>5</sup>: observação macroscópica das colônias, verificando-se a presença de hemólise, tamanho e pigmentação de colônias; observação da morfologia microscópica por meio de esfregaços corados pela técnica de Gram; e testes de oxidase e catalase. Após a caracterização, os isolados foram estocados a -70 °C em BHI suplementado com 20% de glicerol até a realização dos ensaios.

### Plasmas testados

Foram utilizados plasmas sanguíneos obtidos de coelhos, bovinos, equinos, caninos e de seres humanos. A coleta das amostras de sangue para a obtenção dos plasmas foi feita em seringas estéreis, realizando-se sangria pelas vias indicadas para cada espécie. Foi utilizado como anticoagulante o citrato de sódio na concentração final de 0,05% (p/v). Após a coleta asséptica das amostras de sangue, foi realizada a centrifugação a 5000 rpm (1.800g) por cinco minutos e o sobrenadante (plasma) foi armazenado a -20 °C em frascos esterilizados.

As amostras de plasma obtidas de mais de um doador foram asepticamente homogeneizadas, fracionadas e estocadas em temperatura de -20 °C até a realização dos testes.

### Execução do teste de coagulase

Os isolados de *Staphylococcus* spp. que se encontravam estocados a -70 °C foram semeados em caldo BHI e incubados a 37 °C por 18-24 horas. Após este período, as culturas foram avaliadas quanto à pureza por meio de esfregaços corados pela técnica de Gram, sendo utilizadas para a execução dos testes somente as culturas puras.

Para a realização dos testes, as culturas recentes em caldo BHI (Himedia®), cultivadas por 18-24 horas, a 37 °C, foram homogeneizadas e 0,5 mL de cada amostra foi adicionado aos tubos de ensaio contendo 0,3mL de cada um dos tipos de plasma a serem testados (equino, bovino, canino, leporino e humano). Após a adição das culturas, os tubos foram incubados em estufa a 37 °C, realizando-se as leituras após 1, 2, 4, 8, 12, 24 e 48 horas. Foram consideradas coagulase-positiva as amostras que apresentaram formação de coágulo, independente da intensidade de coagulação.

*S. aureus* (ATCC 25923) foi utilizado como controle positivo dos testes de coagulase e *S. epidermidis* (ATCC 12228) como controle negativo.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Oito isolados de *Staphylococcus* de origem canina, 34 de origem humana e 70 de origem bovina apresentaram resultados negativos nos testes de coagulase para todos os plasmas testados, em todos os tempos de incubação. As demais amostras denominadas de SCP, sendo 63 (origem canina), 36 (origem humana) e 104 (origem bovina), apresentaram resultado positivo no

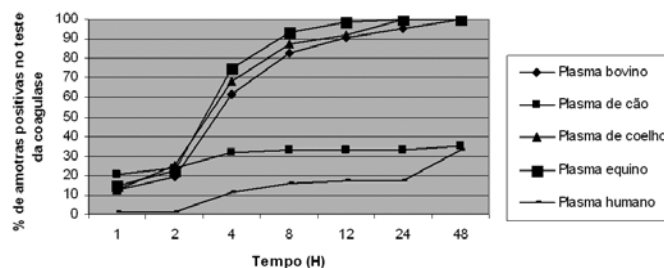


Figura 1. Porcentagens de amostras positivas nos testes de coagulase em tubo, utilizando plasma de diferentes espécies, para identificação de *Staphylococcus* spp. coagulase-positiva isolados de origem canina

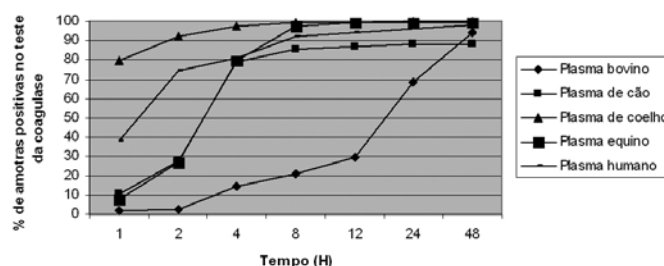


Figura 2. Porcentagens de amostras positivas nos testes de coagulase em tubo, utilizando plasma de diferentes espécies, para identificação de *Staphylococcus* spp. coagulase-positiva isolados de origem humana

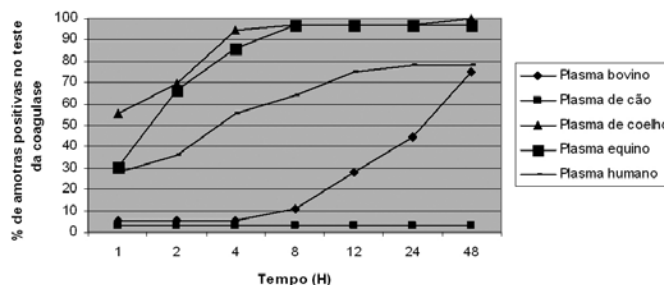


Figura 3. Porcentagens de amostras positivas nos testes de coagulase em tubo, utilizando plasma de diferentes espécies, para identificação de *Staphylococcus* spp. coagulase-positiva isolados de bovinos

teste de coagulase para o plasma de coelho e resultados variáveis para os demais plasmas testados. Nenhuma amostra apontada como coagulase-negativa ao se utilizar o plasma de coelho apresentou resultado positivo para os demais plasmas analisados.

Os resultados dos testes de coagulase obtidos para as amostras SCP podem ser visualizados nas Figuras 1, 2 e 3. Como pode observar-se, para os isolados de bovinos e de seres humanos, o plasma de coelho apresentou as maiores taxas de coagulação nos menores tempos de incubação em relação aos demais plasmas testados (Fig. 2 e 3).

Para os SCP isolados de cão (Figura 1), o plasma de equino foi o que apresentou os melhores resultados entre 4 e 12 horas de incubação, mas com resultados

semelhantes ao plasma leporino a partir da 24<sup>a</sup> hora de incubação. O plasma de bovino também apresentou bons resultados para estes isolados, com 95% deles com reação positiva após 24 horas de incubação. Por outro lado, os plasmas de origens humana e canina apresentaram baixa eficiência na discriminação dos SCP obtidos de cães.

Para os SCP de origem humana (Figura 2), os plasmas leporino e equino foram os que apresentaram os melhores resultados, ambos com resultados positivos para 97% dos isolados a partir da oitava hora de incubação. O plasma canino foi o que apresentou o pior desempenho para isolados de origem humana, com apenas 3% dos isolados com resultados positivos frente ao teste após 48 horas de incubação. Também, os plasmas obtidos de caninos e de seres humanos apresentaram baixa eficiência para SCP de origem canina, respectivamente, com apenas 34% e 18% das amostras positivas após 24 horas de incubação (Figura 1).

O plasma de coelho apresentou melhor eficiência para SCP de origem bovina (Figura 3), verificando-se que 92,30% e 99,02% das amostras apresentaram resultados positivos após duas e oito horas de incubação, respectivamente. Para estes mesmos isolados, o plasma de equino apresentou resultados equivalentes aos obtidos para o plasma de coelho a partir da oitava hora de incubação. O plasma bovino foi o que apresentou a menor eficiência para os isolados obtidos de bovinos, com apenas 30% e 69% de reações positivas após 12 e 24 horas de incubação, respectivamente.

Os resultados obtidos mostraram-se concordantes com os relatados por Silva et al.<sup>12</sup> que utilizando 410 amostras de *Staphylococcus* associadas à mastite bovina, verificaram concordância de 100% entre os resultados obtidos para a prova de coagulase realizada com os plasmas de equino e de coelho. Também foram endossados pelos resultados de Bettencourt et al.<sup>13</sup> que demonstraram que os plasmas de coelho e equino apresentaram melhores resultados que o plasma humano para realização do teste de coagulase para amostras de *S. aureus* isoladas de seres humanos. No entanto, foram diferentes daqueles obtidos por Adesyun e Shehu<sup>14</sup> que observaram, em estudo semelhante, que o plasma de bovino apresentou resultados superiores ao plasma de coelho para amostras de *Staphylococcus* isoladas de swabs nasais de cães. Para os isolados de seres humanos, o plasma de cão apresentou melhores resultados que o plasma de coelho. Neste estudo, embora o plasma de bovino tenha proporcionado resultados satisfatórios

em relação à identificação dos SCP de origem canina, os melhores resultados foram obtidos com o plasma de coelho, seguido pelo plasma de equino (Figura 1). Além disto, o plasma canino foi o que apresentou os piores resultados para os SCP de origem humana (Figura 2). No entanto, estes autores verificaram maior eficiência do plasma de coelho para a discriminação de SCP de origem bovina, em concordância com nossos resultados.

O tempo de leitura demonstrou ser mais relevante para a caracterização de SCP isolados de casos de mastite bovina, verificando-se que a coagulação do plasma de coelho ocorreu em até duas horas de incubação em 92% destas amostras. Para estes mesmos isolados, os plasmas de bovino, equino, canino e humano apresentaram coagulação após duas horas de incubação para 2,8%, 26,9%, 27,8% e 74% das amostras, respectivamente. Também observou-se que uma proporção elevada de amostras de origem humana (30,5%) somente coagulou o plasma bovino entre 24 e 48 de incubação (Figura 2), o mesmo ocorrendo com os *Staphylococcus* de origem canina (15,9%), quando foi utilizado o plasma humano (Figura 1).

A produção de coagulase é considerada por diferentes autores como importante fator de virulência para os *Staphylococcus*<sup>1,4,5</sup>. Assim, esperava-se que o plasma obtido da espécie homóloga, da qual se obteve o isolado, apresentasse maior eficiência para o teste de coagulase, o que não se verificou em nosso estudo. Em geral, ocorreu exatamente o contrário para a maioria dos isolados testados, com o plasma homólogo apresentando os piores desempenhos (Figuras 1, 2 e 3). Uma possível explicação para este resultado é que, embora bem adaptados aos seus hospedeiros, existe uma diversidade muito grande nas populações de *S. aureus*<sup>8,15-17</sup> e de *S. intermedius*<sup>10,11</sup> que se pressupõe representar a maior parte dos isolados de SCP testados neste experimento. Esta heterogeneidade estende-se à enzima coagulase, com a existência de diferentes sorotipos de estafiloagulase e de variações nas sequências de nucleotídeos no sítio ativo da enzima<sup>3,18</sup>. Pode-se também pressupor a presença, no plasma do animal doador, de anticorpos específicos contra a estafiloagulase produzida por certos clones de SCP comuns à espécie, inativando-a por ocasião da realização da prova, resultando na baixa eficiência do teste de coagulase. Tais fatos podem justificar as variações observadas na habilidade dos diferentes isolados testados em coagular os diferentes tipos de plasma.

É uma prática comum nos laboratórios de patologia utilizar plasma humano para a execução do teste de coagulase

em isolados obtidos de casos clínicos desta mesma espécie (informação pessoal). Este fato gera preocupação quando se nota, de acordo com os resultados do nosso estudo, que aproximadamente 22% das amostras de *Staphylococcus* coagulase-positiva de origem humana não foram corretamente identificadas quando se utilizou o plasma humano (Figura 2), o que pode gerar sérias implicações na abordagem epidemiológica e clínica dos pacientes.

## CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nos permitem recomendar a utilização de plasma equino em substituição aos plasmas de coelho e humano para a realização dos testes de coagulase para identificação de *Staphylococcus* isolados a partir de cães, bovinos e seres humanos.

Por questões de bem-estar animal, nossos resultados também endossam a utilização de plasma equino, pois a obtenção do plasma de coelho é realizada por punção cardíaca, o que, na maioria das vezes, requer o sacrifício do animal. A obtenção do plasma equino pode ser realizada de forma menos traumática, por punção da jugular, preservando-se o doador.

## REFERÊNCIAS

1. Koneman EW, Allen SD, Janda WD, Schreckenberger PC, Winn WC. Diagnóstico Microbiológico. 5ª ed. Rio de Janeiro: MEDSI; 2001.
2. Deleo FR, Chambers, H.F. Reemergence of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* in the genomics era. *J Clin Invest*. 2009;119(9): 2464-74.
3. Watanabe S, Ito T, Takeuchi F, Endo M, Okuno E, Hiramatsu K. Structural comparison of ten serotypes of staphylocoagulases in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 2005;187 (11): 3698-707.
4. Shulz W. Infecções por estafilococos. In: BEER, J. Doenças infecciosas dos animais domésticos. São Paulo: Roca; 1988.
5. Quinn PJ, Carter MJ, Markey B, Carter GR. Clinical veterinary microbiology. London: Wolfe; 1994.
6. Holt JG, editor . *Bergey's: manual of determinative bacteriology*. 9a ed. Baltimore: Williams & Williams; 1994.
7. Martinez TCN, Laborda SS, Anunciação AVM, Almeida MGAA, Rocha CCM, Pinheiro DPM, et al. Caracterização de *Staphylococcus* sp. isolados de processos infecciosos de caninos utilizando plasmas de diferentes espécies animais. *Rev Bras Saúde Prod Anim*. 2001;1(2): 48-53.
8. Schlegelová JM, Dendis M, Benedík J, Babák V, Ry ánek D. *Staphylococcus aureus* isolates from dairy cows and humans on a farm differ in coagulase genotype. *Vet Microbiol*. 2003;92(4): 327-34.
9. Santos MV, Fonseca LFL. Estratégias para controle da mastite e melhoria da qualidade do leite. São Paulo: Manole Ltda; 2007.
10. Greence C E, Watson J. In: Greene, C. E. Infectious diseases of the dog and cat. 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: WB Saunders; 1998.
11. May ER. Bacterial Skin Diseases: Current Thoughts on Pathogenesis and Management. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2006;36(1): 185-202.
12. Silva LHC, Monteiro AA, Beloti V, Barros MAF, Nero LA, Santana EHW, et al. Utilização de plasma de cavalo no teste de coagulase em Estafilococos isolados de leite cru. *Semina: Ciênc Agrár*. 2005;26(3): 381-6.
13. Betancourt OH, Méndes DR, Guerra BRS, Almeida YF, Hernández IC, Galdós MC. Plasma equino como sustituto del plasma humano en la identificación del *Staphylococcus aureus* en los laboratorios de microbiología. *Rev Cubana Invest Biomed*. 2005;24 (2): 1-12.
14. Adesyun AA, Shehu LM. Detection of staphylo-coagulase using plasmas from various animals. *Vet Microbiol*. 1985;10(4): 387-92.
15. Enright MC, Day NPJ, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG. Multilocus Sequence Typing for Characterization of Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible Clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. 2000;38: 1008-15.
16. Silva ER, Silva N. Coagulase gene typing of *Staphylococcus aureus* isolated from cows with mastitis in southeastern Brazil. *Can J Vet Res*. 2005;69(4): 260-4.
17. Smith EM, Green LE, Medley GF, Bird HE, Fox LK, Schukken YH, et al. Multilocus sequence typing of intercontinental bovine *Staphylococcus aureus* isolates. *J Clin Microbiol*. 2005;43: 4737-43.
18. Kanemitsu K, Yamamoto H, Takemura H, Kaku M, Shimada J. Relatedness between the coagulase gene 3'-end region and coagulase serotypes among *Staphylococcus aureus* strains. *Microbiol Immunol*. 2001;45(1): 23-7.