

Caracterização de *Staphylococcus* sp. isolados de processos infecciosos de caninos utilizando plasmas de diferentes espécies animais.

Characterization of Staphylococcus sp. isolated from infectious process of dogs, with plasmas of different animals species.

MARTINEZ, T.C.N.; LABORDA, S.S.; ANUNCIAÇÃO, A. V. M. ; ALMEIDA, M. G.A. A.; ROCHA, C.C.M; PINHEIRO, D.P. M.; FIGUEIREDO, A.

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da EMV - UFBA

RESUMO: Foram avaliadas 71 amostras de *Staphylococcus* sp. isoladas de diversos processos infecciosos de caninos frente à capacidade de coagular plasmas de diferentes espécies animais, verificando também a correlação entre os testes de coagulase em tubo e em lâmina. Os resultados demonstraram que o teste da coagulase em tubos com o plasma comercial de coelho foi o mais eficiente, podendo porém ser substituído pelo método em lâmina com plasma canino.

PALAVRAS CHAVES: *Staphylococcus*, cães, plasmocoagulase, plasma, teste de coagulase.

SUMMARY: A total of 71 *Staphylococcus* sp. strains isolated from dogs clinical specimens was examined for coagulase test with plasmas from several animals species. A comparison was made between conventional tube coagulase and slide coagulase. The results obtained demonstrate that the tube coagulase using rabbit plasma was the more efficient and could be replaced by slide coagulase test.

KEYWORDS: *Staphylococcus*, dogs, staphylo-coagulase, coagulase production, plasma.

Rev. Bras. Saúde Prod. An. 1(2):48-53; 2001.

Publicação Online da EMV - UFBA

INTRODUÇÃO

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são as que provavelmente produzem o maior número de toxinas extracelulares, hemolisinas e componentes celulares, sendo que a coagulase tem sido apontada como a primeira linha de defesa dessas bactérias e principal responsável pela virulência (YOUMANS et al. 1975 ; MERCHANT & PACKER 1986 ; SHULZ 1988 ; QUINN et al. 1994).

A enzima coagulase está presente em duas formas: coagulase ligada ou "fator clumping" e coagulase livre (Duthrie apud MACFADDIN 1980). Segundo DAVIS (1973), enquanto a coagulase livre coagula amostras de plasmas tendo como substrato o fibrinogênio ou os monômeros de fibrina, a coagulase ligada ou "fator clumping" causa um acúmulo dos microrganismos, semelhante a uma aglutinação.

A coagulase em tubo, com plasma de coelho é, provavelmente, o teste mais comumente usado para diferenciar as espécies coagulase positivas das negativas, entretanto os plasmas de outros animais são também utilizados e podem produzir resultados similares aqueles obtidos com o de coelho (COX et al. 1985; GUARDATI et al. 1993).

A variação na habilidade de cepas de estafilococos coagular plasmas de diferentes espécies animais vem sendo observada ao longo dos anos e, para superar a possibilidade de falsos resultados, alguns autores sugerem a utilização do plasma da espécie animal do qual o organismo foi isolado (ADESYIUN & SHEHU 1985; RAUS & LOVE 1991).

LIVE (1985) estudando *S. aureus* de origem canina e humana verificou que as amostras de origem humana coagularam plasma

humano (com ou sem coagulação do plasma canino) enquanto que as amostras de origem canina coagularam somente plasma canino, sugerindo que o intercâmbio de estafilococos entre humanos e caninos é comum, sem dúvida pelo contato íntimo entre pessoas e cães, sendo este fato epidemiologicamente importante.

BERG et al. (1986), examinando material de 44 cães sadios e de 12 com lesões piogênicas, isolaram 72 amostras de *Staphylococcus* que foram biotipadas por testes bioquímicos, produção de hemolisina e coagulase com plasma de coelho, humano e canino. As 70 amostras identificadas como *S. intermedius* coagularam plasma de canino mas destas, quatro foram negativas com plasma de coelho. As duas amostras identificadas como *S. aureus* não coagularam em plasma de canino ou humano porém foram positivas em plasma de coelho.

ADESYIUN & SHEHU (1985) avaliando a eficiência dos plasmas de coelho (comercial), humano, canino, bovino, suíno, pato, caprino, galinha, asinino e eqüino para detectar as estafilocogulases de origem animal e alimentar, verificaram que todas as amostras de origem animal coagularam plasma de coelho sendo que a superioridade relativa dos plasmas de origem animal para detecção da coagulase foi bovino>suíno>humano>pato>caprino>canino>coelho>galinha>asinino. De 10 amostras isoladas de cães, somente quatro coagularam plasma canino, enquanto que plasmas de outras espécies animais coagularam mais amostras, indicando que nem todos os 10 estafilococos isolados de cães eram do biotipo canino. Concluíram que é imperativo utilizar plasmas de várias espécies animais, atentando-se para o efeito decorrente da origem das cepas e variações na qualidade dos plasmas.

COX et al. (1985) testaram 115 amostras de estafilococos isolados de cães utilizando seis métodos comerciais e o método

convencional com plasmas de coelho e de cão para verificar a atividade coagulase. Dos 105 *S. intermedius* isolados, 98,1% e 45,5% foram positivos para o teste em tubo com plasmas de coelho e de cão respectivamente. Nos testes de coagulase em lâmina, apenas 52,4% e 48,5% das amostras foram positivas nos respectivos plasmas. As percentagens nos testes comerciais variaram de 0% a 54,1% e 0 a 42,2%, respectivamente, para os testes de coagulase em tubo e em lâmina. Foi concluído que, quando comparados com o método convencional do tubo usando plasma de coelho, nenhum dos seis métodos comerciais foi capaz de identificar o *S. intermedius*, porém identificaram corretamente *S. aureus*, além disso, o teste em tubo com plasma de coelho identificou maior número de *S. intermedius* do que o de cão.

MULLER et al. (1986) estudaram 71 cepas de *Staphylococcus* isoladas de cães realizando a prova de coagulase em tubo com plasmas humano e de coelho, enquanto que fibrinogênio bovino foi utilizado para detecção de fator clumping. Todas as 71 culturas foram positivas com plasma de coelho mas negativas com plasma humano; na detecção do fator clumping foram obtidas 88,46% e 68,42% de amostras positivas para *S. intermedius* e *S. aureus*, respectivamente.

Os exames realizados por DEVRIESE & OEDING (1976), demonstraram que o teste de coagulase em lâmina, considerado valioso para o reconhecimento de *S. aureus* por seu desempenho e baixo custo deve ser realizado apenas com amostras de origem humana, bovina e de aves. CHATERJEE et al. (1990) realizando estudos sobre as características bioquímicas dos estafilococos de origem animal, analisaram 102 amostras, verificando que 82 coagularam no plasma de coelho e 20 mostraram-se negativas.

RAUSS & LOVE (1991) analisaram 40 amostras de *S. aureus* e 20 de *S. intermedius* de origens animal e humana comparando as

afinidades das estafilocagulases para protrombina bovina, eqüina e humana. O *S. intermedius* mostrou uma fraca especificidade para protrombina humana, com 15% das coagulases reagindo no fibrinogênio humano, 25% no eqüino e 40% no bovino. Entretanto, quando protrombina bovina foi usada obteve-se 75% , 65% e 100% em fibrinogênio humano, eqüino e bovino respectivamente.

As amostras de *S.aureus* isoladas de animais demonstraram uma maior especificidade. Quando a protrombina humana foi usada, 85% das amostras coagularam no fibrinogênio humano e bovino e 70% no eqüino. Usando-se protrombina bovina, 62,5%, 45% e 20% coagularam respectivamente no fibrinogênio humano, bovino, e eqüino, demonstrando que a origem do fibrinogênio não parece ser um fator determinante no processo de coagulação. O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade das amostras de *Staphylococcus* coagular plasmas de diferentes espécies animais, além de

verificar a correlação entre os testes de coagulase em tubo e em lâmina, analisando a possibilidade de substituição do primeiro pelo segundo, visando obter uma metodologia de identificação prática, rápida e econômica.

MATERIAL E MÉTODOS

a) Amostras bacterianas: Um total de 71 amostras de *Staphylococcus* sp. isoladas no Laboratório de Bacterioses do Departamento de Medicina veterinária Preventiva da escola de Medicina Veterinária da UFBA de diversos processos infecciosos de cães (tabela 1), foram conservados em meios de estoque (Meio de estoque(peptona-6g , NaCl-3g ,extrato de carne-1,8g ,agar-24g , água destilada- 600 mL) e recuperadas em caldo infuso de cérebro e coração (Difco) (BHI), crescidas por 24 horas a 37 °C e então semeadas em agar-Baird-Parker (V) (ABP) para proceder as técnica de detecção de coagulase.

Tabela 1. Staphylococcus isolados de cães e respectivos processos infecciosos

Processo infeccioso	Staphylococcus sp	
	Nº	%
Otite	53	74,65
Conjuntivite	07	9,86
Urogenital*	05	7,03
Dermatite	04	5,63
Septicemia	01	1,41
Osteomielite	01	1,41
Total	71	100

* Incluindo mastite

Lab. Bacterioses-DMVP/EMV/UFBA. 1995-1997.

b) Plasmas: Foram utilizados plasma de humano, cães, galináceo, bovino, caprino e de coelho. O plasma humano foi obtido por intermédio do Laboratório de Bacteriologia do Instituto de Ciência da Saúde. Os plasmas de cães, galináceo, bovino e caprino, foram obtidos por sangria

pelas vias indicadas para cada espécie, utilizando - se uma solução de citrato de sódio a 10% como anticoagulante, na proporção de 25% e centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos, retirando - se o sobrenadante e dividindo - o em alíquotas de

0,5 mL. O plasma de coelho utilizado foi o liofilizado comercial padrão preparado de acordo com orientação do fabricante.

c) Teste de coagulase

Para verificação do "fator clumping" (coagulase ligada), foi utilizado o método em lâmina, onde uma gota de plasma era misturada com uma suspensão homogênea densa (uma colônia bacteriana dissolvida em uma gota de água destilada estéril) da cepa em teste sobre uma lâmina

histológica. Qualquer grau de deposição ocorrido entre 30 a 120 segundos constituía um teste positivo.

Para verificação da coagulase livre foi utilizado o método em tubo. Uma alçada da amostra a ser testada crescida em ABP foi misturada com 0,5 mL de plasma em tubo de hemólise e incubada a 37 °C, sendo observada a cada 30 minutos nas primeiras quatro horas. Após este tempo, outra observação era realizada com 24 horas. Qualquer grau de formação de coágulo constituiu um teste positivo.

Foram utilizadas amostras comprovadamente positiva (ATCC 25923) e negativa (LABAC 60/97), além de amostras do plasma em teste sem inóculo. O plasma comercial de coelho foi o método de referencia em ambos os testes.

RESULTADOS

A tabela 2 apresenta os resultados da produção de estafilocagulase em tubo e em lâmina com plasmas de diversas espécies animais (coelho, cães, caprino e bovino) e de plasma humano, tendo como referência a plasmocoagulase em tubo utilizando plasma comercial de coelho. Das 71 amostras examinadas, 53(74,65%) foram coagulase positiva e 18(25,35%) foram negativas. Das 53 amostras coagulase positiva no método de referencia, 39 (73,58%) foram positivas

em plasma humano e apenas 24(45,28%) em plasma cães. Quando foram utilizados plasmas de caprino, bovino e galináceo, obtiveram - se índices de positividade de 39(73,58%), para plasmas de caprino e galináceo e 14 (26,41%) para plasma de bovino.

Na plasmocoagulase em lâmina utilizando plasma comercial de coelho, obteve-se 25(47,16) amostras positivas com uma concordância em relação ao método em tubo de apenas 25(47,16) amostras. Quando plasma humano e canino foram utilizados, a concordância foi de 35(66,03%) e 51(96,22) amostras respectivamente. Em relação aos plasmas de caprino, bovino e galináceo, a concordância foi de 41 (77,35%), 47 (88,67%) e 26 (49,05%)

DISCUSSÃO

A análise das 71 amostras demonstrou que 74,64% das cepas foram coagulase positivas e 25,35% foram coagulase negativa no plasma comercial de coelho (tabela 1). Estes resultados estão de acordo com CHATTERJEE et al. (1990) (80,39% e 19,61%), GUARDATI et al. (1993) (73%), entretanto diferem dos resultados obtidos por DEVRIESE OEDING (1976) ,ADESYIUN & SHEHU(1985) (50%), e MULLER et al.(1986) (100%). As espécies *S. aureus* e *S. intermedius* são apresentadas como coagulase positiva e o *S. hyicus* como sendo coagulase variável por BERG et al.(1986) e QUINN(1994), entretanto COX et al. (1985), afirmam que a presença da enzima coagulase é uma característica variável na espécie *S.intermedius*.

DEVRIESE & OEDING (1976) ; BERG et al. (1984) ; COX et al. (1985) ; LIVE(1985); ADESYIUN & SHEHU (1985) ; MULLER et al. (1986) e RAUS & LOVE (1991), verificaram que plasmas de diferentes espécies animais não reagem igualmente para a prova de coagulase. Neste experimento, observou-se que das 53

amostras coagulase positivas pelo método padrão com plasma comercial de coelho, apenas 39(73,58%) foram positivas com plasma humano. Este resultado difere dos índices obtidos quando foram utilizados fibrinogênio e protrombina humanas por

DEVRIESE & OEDING (1976) (2%), ADESYIUN & SHEHU(1985), (40%), LIVE (1985) ; MULLER et al. 1986 (0%) e RAUS & LOVE (1991) (37,88%).

TABELA 2-Comportamento de *Staphylococcus coagulase (+) e (-) em plasma de coelho, frente a plasmas de outras espécies animais. Método em tubo(T)e em lâmina(L)*

Amostras	Plasmas											
	Coelho		Humano		Canino		Caprino		Bovino		Galináceo	
Coagulase (+)	T	L	T	L	T	L	T	L	T	L	T	L
Total(+)	53	25	39	35	24	51	39	41	14	47	39	26
%(+)	100	47,20	73,6	66,03	45,28	96,22	73,58	77,30	26,41	88,67	73,58	49,05
Total(-)	0	28	14	18	29	02	14	12	39	06	14	27
%(-)	0	52,83	26,41	33,96	54,71	3,77	26,41	22,64	73,58	11,32	26,41	50,94
Coagulase(-)	T	L	T	L	T	L	T	L	T	L	T	L
Total(-)	18	13	11	15	15	10	13	14	18	07	15	14
%(+)	100	72,22	61,11	83,33	83,33	55,55	72,22	77,77	100	38,88	83,33	77,77
Total(+)	0	05	07	03	03	08	05	04	0	11	3	04
%(+)	-	27,77	38,88	16,66	16,66	44,44	27,77	22,22	-	61,11	16,66	22,22

Lab.Bacterioses.DMVP/EMV/UFBA.1997

Quando plasma canino foi utilizado, o número de amostras positivas reduziu para 24(45,28%), estando este resultado de acordo com COX et al. (1985) (45,5%) e ADESYIUN & SHEHU (1985) (40%), mas diferem dos resultados obtidos por LIVE (1985) (100%). De acordo com LIVE (1985), os estafilococos caninos só coagulam em plasma cães. Para ADESYIUN & SHEHU (1985), o fato dos estafilococos isolados de cães não coagularem plasma canino indica que nem todas as amostras são biotipos de cães.

O plasma de caprino apresentou índices iguais aos do plasma humano e galináceo(73,58%), sendo esses resultados semelhantes aos obtidos por ADESYIUN & SHEHU(1985) (100% e 90%,para os plasmas caprino e avícola respectivamente. Apenas 14(26,41%) amostras coagularam no plasma bovino, resultado conflitante com a maioria dos autores pesquisados. (DEVRIESE & OEDING (1976), 68%, ADESYIUN & SHEHU (1985) 80% e RAUS & LOVE (1991), 92,19%.

Com relação ao "fator clumping", 25(47,16%) das amostras foram positivas com plasma comercial de coelho, resultado este de acordo com os estudos realizados por COX et al. (1984) (52,4%), COX et al. (1985) (56,67%), mas diferem dos resultados de MULLER et al.(1986) e dos de DEVRIESE & OEDING(1976), (86%).Quando utilizou-se plasma canino, verificou-se que 51(96,22%) amostras apresentaram fator clumping diferindo dos índices obtidos por COX et al.(1985) (48,5%). Estes resultados permitem pensar na substituição do teste de coagulase em tubo com plasma comercial da coelho pela detecção do fator clumping com plasma de cães quando estafilococos de origem canina estiver sendo testado.

CONCLUSÕES

Baseado na análise do presente estudo, conclui-se que:

.O teste de coagulase em tubo com plasma comercial do coelho é o critério mais seguro para identificação das espécies de estafilococos patogênicos.

O teste da coagulase em tubo com plasma de coelho pode ser substituído pela detecção do fator clumping com plasma de cães quando estafilococos de origem canina estiver sendo testado em vista do alto índice de

.O teste de coagulase em tubo pode ser realizado com plasma humano, caprino ou avícola tendo em vista o alto índice de concordância(73,58%) com o método padrão utilizando plasma comercial de coelho.

concordância (96,22%), sendo que no caso de amostras negativas, deve-se realizar o método de referência.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADESYIUN, A. A ; SHEHU, L.M. Detection of staphylo-coagulase using plasmas from various animals. **Veterinary Microbiology**, v.10,n.4, p.387-392, 1985.
- BERG,J.N. et al. Identification of the major coagulase-positive *Staphylococcus* sp of dogs as *Staphylococcus intermedius*. **American Journal of Veterinary Research** v.45,n.7,p.1307-1309,1984.
- CHATTERJEE, C. et al. Studies on coagulase status and biochemical characters of animal strains of *Staphylococci*. **Indian Journal of Animal Health**, v. 29, n. 2, p. 157-161, 1990.
- COX, H.U., et al. Comparison of coagulase test methods for identification of *Staphylococcus intermedius* from dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v.46, p.1522-1525, 1985.
- DAVIS,B.D. **Microbiology**. Maryland: Harper e Rom, 1973. 1562p. p.727-740.
- DEVRIESE, L. A.; OEDING, P. Characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolates from different animal species. **Research in Veterinary Science**, v.21, p.284-291, 1976.
- GUARDATI, M. C. et al. Rapid methods for identification of *Staphylococcus aureus* when both human and animal staphylococci are tested: Comparison with a new immunoenzymatic assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n.6, p.1606-1608, 1993.
- LIVE, I. specific and cross- reacting antigens of *Staphylococcus aureus* of human and canine origins. **Journal of Clinical Microbiology**, v.21, n. 1, p.43-45, 1985.
- MACFADDIN,J. F. **Pruebas Bioquímicas para la identificación de bacterias de Importancia Clínica**. Buenos Aires: Panamericana, 1980. 301p.
- MERCHANT, I. A.; PACKER, R. A . **Bacteriologia y Virologia Veterinarias**. Zaragoza: Acribia, 1970. 768p. p. 248-262.
- MULLER, E.E. et al. Isolamento, caracterização e susceptibilidade a antimicrobianos de estafilococos coagulase-positivos (*Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus intermedius*). **Semina**, v.7, p.34-37, 1986.
- QUINN, N. E. **Clinical veterinary microbiology**. London : Wolfe, 1994. 730p. p.118-126.
- RAUS, J.; LOVE,D.N. Comparison of the affinities to bovine and human prothromb of the staphylocoagulases from *Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus aureus* of animal origin. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 3, p. 570-572, 1991.
- SHULZ,W. Infecções por estafilococos. In: BEER, J. **Doenças infecciosas dos animais domésticos**. São Paulo: Roca, 1988. 380p. p. 1-9.
- YOUMANS, G.P. et al. **The biologic and clinical basis of infectious diseases**. North Caroline: Saunders,1975. 813p.p.596-609.