

## **SUBSTITUIÇÃO DO PLASMA DE COELHO PELO PLASMA DE CAVALO NA PROVA DA COAGULASE PARA IDENTIFICAÇÃO DO GÊNERO *Staphylococcus***

**BÁRBARA PONZILACQUA<sup>1</sup>; TONY PICOLI<sup>2</sup>; CRISTINA MENDES PETER<sup>2</sup>;  
 BRUNA DA SILVA URRUTIA<sup>1</sup>; SAMANTA DA CUNHA RAMOS<sup>3</sup>; JOÃO LUÍZ  
 ZANI<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Graduanda em Veterinária UFPel – [bponzilacqua@hotmail.com](mailto:bponzilacqua@hotmail.com); [brunaurrutia@hotmail.com](mailto:brunaurrutia@hotmail.com)

<sup>2</sup> Aluno do Programa de Pós-Graduação em Veterinária UFPel – [picolivet@gmail.com](mailto:picolivet@gmail.com);  
[cristina\\_peter@hotmail.com](mailto:cristina_peter@hotmail.com)

<sup>3</sup> Médica Veterinária autônoma- [samantacramos@gmail.com](mailto:samantacramos@gmail.com)

<sup>4</sup> Professor do Departamento de Veterinária Preventiva UFPel – [jluizzani@ig.com.br](mailto:jluizzani@ig.com.br)

### 1. INTRODUÇÃO

A mastite bovina é uma das doenças mais corriqueiras em rebanhos leiteiros. Pode ser identificada tanto em sua forma clínica, pelo teste da caneca de fundo preto, quanto por sua forma sub-clínica, pelo teste de CMT (*California Mastitis test*). A presença do agente infeccioso no interior da glândula mamária promove contaminação no leite e nos equipamentos utilizados na ordenha, causando danos graves ao animal acometido e na qualidade do leite posteriormente consumido. *Staphylococcus aureus* é o agente de maior importância na etiologia das mastites e, conseqüentemente o micro-organismo infeccioso mais encontrado no leite cru contaminado (CENCI-GOGA, 2003).

O processo de pasteurização promove a eliminação da bactéria patogênica em questão por elevar a temperatura a níveis não aceitáveis de sobrevivência da mesma, entretanto as enterotoxinas produzidas são termoestáveis, e não são desnaturadas. Por não sofrerem com a elevação da temperatura essas toxinas podem ser ingeridas pelo consumidor, constituindo importantes causas de intoxicações alimentares (ZECCONI; HAHN, 2001). Dessa maneira a relevância da detecção de cepas enterotoxigênicas recai sobre o campo de pesquisa uma vez que constituem um problema de saúde pública.

Algumas provas para identificação de estafilococos foram desenvolvidas com o princípio de detectar enzimas produzidas por estes micro-organismos, dentre elas a coagulase. A ação da enzima é semelhante a da trombina no processo de coagulação sanguínea, onde o fibrinogênio é convertido em fibrina produzindo o coágulo. A enzima é considerada um fator de virulência já que a coagulação dificulta o reconhecimento da bactéria, no interior do coágulo, pelo sistema imune. As cepas capazes de produzir essa enzima são mais patogênicas do que às não produtoras. Por isso a presença da coagulase é considerada uma importante prova para detectar estafilococos enterotoxigênicos devido a alta correlação com produção de enterotoxinas (JASPER; INFANTE; DELLINGER, 1985).

Para a identificação dos estafilococos capazes de produzir coagulase, é utilizado plasma sanguíneo de coelho que pode ser realizada em lâmina ou em tubo. No entanto, o custo relativamente alto do plasma de coelho e a forma de extração (punção intracardíaca) são fatores que podem dificultar a sua realização. A utilização de plasma sanguíneo de outras espécies já foi relatada como alternativa ao de coelho. Plasma de bovinos, humanos e caninos foram testados para prova de coagulase em estafilococos provenientes de processos infecciosos de cães (MARTINEZ, 2005). Nesse sentido, objetivou-se comparar a utilização de

plasma de cavalo e plasma de coelho na prova de detecção da enzima coagulase para identificação de estafilococos coagulase positiva, isolados de leite cru proveniente de tanques.

## 2. METODOLOGIA

Foram utilizadas 32 cepas de *Staphylococcus aureus* e 17 cepas de *Staphylococcus intermedius*, totalizando 49 cepas isoladas de leite cru de tanques de refrigeração em propriedades leiteiras na região sul do Rio Grande do Sul. Essas cepas foram previamente identificadas segundo KRIEG & HOLT (1994) e posteriormente estocadas à temperatura inferior a -10°C em caldo enriquecedor BHI (Brain-Heart Infusion acrescido de glicerina). A obtenção do plasma de cavalo se deu pela punção intravenosa de animais pertencentes à Faculdade de Veterinária da UFPel. O material coletado em bolsa de sangue para coleta de 450 mL, contendo anticoagulante foi armazenado a 8°C até a sedimentação de hemácias. O plasma então foi retirado com auxílio de pipetas e armazenado em tubos de 50 mL na geladeira. O plasma de coelho utilizado foi o produto comercial Coagu-plasma® (LABORCLIN LTDA).

As cepas foram semeadas em meio de cultura ágar-sangue, contendo 5% de sangue ovino desfibrinado, e incubadas por 24 horas em estufa bacteriológica a 37°C. Após o crescimento, cada cepa teve duas alíquotas semeadas em dois tubos distintos: o primeiro contendo 1 mL de plasma de coelho e o segundo contendo 1 mL de plasma de cavalo. Os tubos foram incubados por 24 horas e, após esse período foi realizada a leitura. Tubos onde a formação de um coágulo, por menor que fosse, foram considerados positivos à prova (GARCIA et al., 1980). As análises estatísticas foram realizadas através do teste Qui-Quadrado com auxílio do software estatístico BioEstat versão 5.3.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Do total de 49 cepas de estafilococos testadas, 95,9% foram positivas ao teste da coagulase utilizando o plasma de coelho comercial e 85,7% foram positivas utilizando plasma equino. Das 32 cepas de *S. aureus* testadas todas foram consideradas coagulase positiva pelo teste com a utilização de plasma de coelho, e 28 utilizando plasma de cavalo. Das 17 cepas de *S. intermedius* testadas, 15 foram consideradas coagulase positiva pelo teste utilizando plasma de coelho, e 14 para plasma de cavalo. Comparados os resultados totais da utilização de plasma de coelho com o plasma de cavalo, independentemente da espécie da cepa utilizada, das 49 cepas 47 foram positivas utilizando plasma de coelho e 42 com plasma equino (Tabela 1).

As duas espécies estudadas são tidas como produtoras da enzima coagulase, no entanto apenas 88,2% das cepas de *S. intermedius* foram consideradas positivas mesmo na utilização do teste padrão com plasma de coelho. Segundo COX et al. (1985) a presença da enzima coagulase é uma característica variável nessa espécie, podendo ser uma causa provável para o resultado observado.

**Tabela 1.** Resultados no teste da coagulase comparando o uso de plasma de coelho e plasma de cavalo para identificação de bactérias do gênero *Staphylococcus*

	coagulase	Plasma de coelho	%	Plasma de cavalo	%
<i>Staphylococcus aureus</i>	positivo	32	100	28	87,5
	negativo	0	0	4	12,5
<i>Staphylococcus intermedius</i>	positivo	15	88,2	14	82,4
	negativo	2	11,8	3	17,6
<b>Total</b>	positivo	47	95,9	42	85,7
	negativo	2	4,1	7	14,3

A análise estatística comparando a utilização de ambos os plasmas revelou um resultado não significativo ao teste Qui-Quadrado ( $p=0,162$ ), confirmando a hipótese de que a utilização do plasma de cavalo pode-se equiparar a de plasma de coelho. Estudos realizados por SILVA et al. (2005), ao avaliar um maior número de cepas, demonstraram resultados semelhantes, corroborando com os dados aqui apresentados. Dessa forma, há a possibilidade da substituição do plasma de coelho pelo plasma de cavalo, já que não houve diferença nos resultados.

Sugere-se o uso de plasma eqüino para testes para identificação da enzima coagulase em bactérias do gênero *Staphylococcus* em laboratórios de análises clínicas e de alimentos, tornando-se uma alternativa viável, já que diminui os custos, aumenta a facilidade de obtenção e diminui a crueldade da prática de coleta de sangue de coelhos, favorecendo o bem estar animal.

#### 4. CONCLUSÕES

A produção da enzima coagulase por estafilococos pode ser identificada pela prova lenta de coagulase utilizando plasma de cavalo. A substituição do plasma de coelho pelo de cavalo é uma alternativa ao teste tradicional. Estudos complementares com cepas isoladas de outros alimentos são importantes para confirmar a viabilidade da técnica para provas com estafilococos provenientes de outras fontes alimentares.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CENCI-GOGA, B. T.; KARAMA, M.; ROSSITTO, P. V.; MORGANETE, R. A.; CULLOR, J. S. Enterotoxin production by *S. aureus* isolated from mastitic cows. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.66, n.9, p.1693-96, 2003.

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.

GARCIA, M. L.; MORENO, B.; BERGDOLL, M. S. Characterization of Staphylococci isolated from mastitic cows in Spain. **Applied Environmental Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 548-553, 1980.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Gram-positive cocci**. In: Bergey's manual of determinative bacteriology. 9. ed. Baltimore: Williams e Wilkins, p. 544-551, 1994.

JASPER, D. E.; INFANTE, F.; DELLINGER, J.D. Relationship among the results as coagulase, staphylococcal toxins and thermonuclease tests on staphylococci from cow milk. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.21, n.4, p.582-584, 1985

KRIEG, N. R. and HOLT, J.C. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 9 ed. Willians & Wilkins, Baltimore: 1994. 1268 p.

MARTINEZ, C.N.; LABORDA, T.S.; ANUNCIAÇÃO, S.V.M.; ALMEIDA, A.G.A.A.; ROCHA, M.C.M.; PINHEIRO, C.P.M.; FIGUEIREDO, D. Caracterização de *Staphylococcus* sp. isolados de processos infecciosos de caninos utilizando plasmas de diferentes espécies animais. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, América do Norte, 1, mar. 2005. Disponível em: <http://revistas.ufba.br/index.php/rbspa/article/view/590/311>. Acesso em: 20 Set. 2013.

SILVA, L. H. C.; MONTEIRO, A. A.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; NERO, L. A.; SANTANA, E. H. W.; MORAES, L. B. Utilização de plasma de cavalo no teste de coagulase em estafilococos isolados de leite cru, **Ciências Agrárias**, Londrina, v.26, n.3, p.381-386, jul./set, 2005.

ZECCONI, A.; HAHN, G. *Staphylococcus aureus* in raw milk and human health risk. Bulletin of IDF, **Brussels**, v.345, p.15-18, 2001.