

APROVA DA COAGULASE RELACIONADA AO MEIO DE CULTIVO DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* CONTENDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CLORETO DE SÓDIO *

Rosana Gleicy de Paiva **

RESUMO

A realização deste trabalho teve como principal objetivo observar, em 45 amostras de *Staphylococcus aureus*, influências significativas nos resultados dos testes de coagulase em tubo usando diferentes meios de cultivo com variadas concentrações de NaCl.

A prova da coagulase em tubo tem sido alvo de comparações frente aos mais novos métodos, tendo sempre se destacado como sendo um teste de grande eficiência na identificação dos *Staphylococcus aureus* (1, 9, 11).

Os resultados da plasmocoagulase em tubos, em diferentes meios de cultivo, sofrem alterações tanto em relação ao tempo necessário para que a coagulação se processe, como também no resultado final do teste, podendo apresentar um percentual significativo de resultados falsos-negativos. Sendo, portanto, motivo de tantas divergências na determinação do meio de cultivo ideal para a retirada do inóculo utilizado na realização do Teste de Coagulase.

Através dos resultados, os autores perceberam que as amostras de *Staphylococcus* testadas apresentavam resultados positivos em menor tempo e sem falsos-negativos quando utilizavam, para a realização do teste de inóculo, meios de cultivo com baixa concentração de NaCl (Ágar simples 0,5%, 2,5% e 3,5% NaCl) ou sem interferência de NaCl (Ágar sangue - 10% sangue de coelho).

O ágar manitol foi o meio de cultivo para as amostras de *Staphylococcus aureus* que apresentaram percentuais falsos-negativos (16% das amostras) em maior número. Não demonstrando ser meio de cultivo seguro para a obtenção de inóculo para a plasmocoagulase.

UNITERMOS: Coagulase, coagulase livre, plasmocoagulase, evidenciação de estafilococos patogênicos pela capacidade de coagulação do plasma humano ou de coelho.

* Trabalho apresentado como exigência parcial para a obtenção do grau de especialista em Microbiologia, sob a orientação do Prof. Dr. Cleómenes Reis.

** Biomédica, estagiária do Depto. de Microbiologia, IPTSP/UFG.

INTRODUÇÃO

Vários são os critérios utilizados na identificação dos estafilococos, entre eles, a morfologia colonial e bacteriana, catalase, lecitinase, DNase e Coagulase.

O aspecto das colônias em meio sólido: redondas, lisas, elevadas e brilhantes, formando pigmentos de tonalidades variadas, são geralmente características comuns aos estafilococos.

Atualmente, a produção de hemolisinas não vem sendo considerada na diferenciação entre o *S. aureus* e o *S. epidermidis*. Os estafilococos chamados não patogênicos (*S. epidermidis* e *S. saprophyticus*), geralmente, não produzem hemolisinas e são coagulase-negativos, apesar de estarem ocupando, atualmente, importante destaque nas infecções estafilocócicas mostrando que, provavelmente, o fator de virulência destes estafilococos estão relacionados à produção de substâncias mucosas, capacidade de aderência às células epiteliais do trato urinário (*S. saprophyticus*) e produção de B-lactamase, sendo resistentes até à metilicina (2).

A fermentação do manitol não é característica específica dos *S. aureus* pois existem outras bactérias da família micrococcaceae com esta mesma propriedade. Também a produção de DNase e lecitinase é comum aos estafilococos plasmocoagulase-positivos, embora possa ocorrer em muitos outros microrganismos (2). Estes testes somente têm valor na identificação dos estafilococos quando associados e em presença de testes definitivos como no caso, a plasmocoagulase.

O teste da coagulase em tubo ou em lâmina (prova diferencial entre os *Staphylococcus aureus* e os estafilococos coagulase-negativos), ainda hoje continua, sendo o teste mais empregado pela sua precisão e funcionalidade. Contudo, o método em tubo com diferentes plasmas, ainda é visto como sendo mais digno de confiança que o rápido teste em lâmina (1). A plasmocoagulase consiste na mistura de uma solução espessa de estafilococos ao plasma humano ou de coelho. A leitura é realizada após 1 e 2 horas de incubação, a 37°C ou 1 a 4 horas, na mesma temperatura. A coagulase é uma enzima capaz de coagular o plasma oxalato ou citrato na presença de um cofator plasmático (CRF) contido em muitos soros. O CRF reage com a coagulase gerando atividades semelhantes à ativação da protrombina levando à transformação do fibrinogênio em fibrina na superfície dos estafilococos, alterando, talvez, sua ingestão pelas células fagocitárias ou sua destruição no interior destas, protegendo os estafilococos na sua propagação pelos tecidos (6).

A prova da coagulase em tubo tem sido alvo de comparações frente aos mais novos métodos para identificação de estafilococos, tendo sempre se destacado como de grande eficiência na conclusão dos resultados obtidos (1, 3).

Para a realização do teste de coagulase, usamos plasma fresco de coelho diluído em salina, tendo, em cada tubo, 0,5 ml (padronizada e comparada pela turbidez da escala nº 2 de MacFarland). GOLDSTEIN e ROBERTS relataram algumas diferenças no resultado do Teste de Coagulase, utilizando diferentes porções de plasmas em diferentes formas de preparo e usando a mesma quantidade de inóculo em diferentes porções de plasmas (11). Por isso, na montagem dos gráficos, consideraram-se coagulase-positivas as amostras com coagulase total "+" e coagulação parcial "(+)" e como coagulase negativa, as amostras com coagulação negativa "-" e coagulação inicial "(-)".

Algumas amostras, que durante o tempo de incubação apresentaram-se como coagulase-positivas, após 24 horas, foram consideradas coagulase-parciais. Isto pode ter sido devido aos distúrbios, agitação dos tubos na leitura anterior ou da atividade de proteases bacterianas (1).

Um padrão referência recomenda ser suficiente a realização do teste. SALLY T. SELEPAK & FRANK WITEBSKY (11) demonstraram, em seus estudos que, somente uma colônia bacteriana não fornece um inóculo suficiente para um teste coagulase-positivo. Expressando mais quantitativamente, como sendo no mínimo 10⁸ organismos/ml, o inóculo a ser utilizado sempre que possível para cada teste de coagulase em tubo. Verificaram, também, que o *Staphylococcus aureus* não cresce na plasmocoagulase. Por isso, um pequeno inóculo pode não coagular o plasma, mesmo após 18 horas de incubação em estufa a 37°C.

MATERIAIS E MÉTODOS:

Foram coletadas 88 amostras de swab de orofaringe no Hospital das Clínicas e P.A.M (INPS), durante 3 meses (10/06 a 19/09/88). As amostras foram colhidas, aleatoriamente, em crianças com idades superiores a 1 ano até jovens de 16 anos, com ou sem sintomatologia.

Para observar se a composição do meio de cultivo tem influência no resultado desta prova, basearam-se nos meios utilizados no trabalho de GODOY e LOPES FERNANDES (4) da seguinte forma:

1. Semeadura das amostras em caldo BHI e em ágar sangue (10% de sangue de coelho);
2. Incubação em estufa a 37°C por 24 horas;
3. Catalase e Gram das prováveis colônias de estafilococos;
4. Semeadura das amostras catalase-positivas em Ágar Manitol (7,5% NaCl);
5. Incubação em estufa a 37°C por 24 horas;
6. Obtenção de resultado de crescimento e fermentação do Manitol após 24, 48 e 72 horas de incubação em estufa a 37°C;

PAIVA, R. G. A prova da coagulase relacionada ao meio de cultivo de *Staphylococcus aureus* contendo diferentes concentrações de cloreto de sódio. Rev. Pat. Trop. 20(1):21-33, jan./jun. 1991.

7. Semeadura de todas as amostras que cresceram no manitol, em ágar sangue (10% sangue de coelho);

8. Incubação em estufa a 37°C por 24 horas;

9. Observação da presença de hemólise;

10. Plasmocoagulase, DNase e Lecitinase das amostras.

Para cada amostra realizaram-se duas provas de plasmocoagulase, uma com as colônias desenvolvidas no ágar sangue e outra com as colônias tiradas do ágar manitol. O teste de coagulase foi realizado em tubo com plasma fresco de coelho na diluição de 1/4 e sua leitura efetuada após 1, 2, 3, 4, 8 e 24 horas de incubação em estufa a 37°C. Usou-se também um tubo controle positivo inoculado com amostra comprovadamente patogênica.

As amostras de *Staphylococcus aureus* a partir de um dos meios de cultivo ou de ambos, foram semeadas em ágar sangue (4,5% NaCl) e ágar sangue manitol (7,5% NaCl) e incubadas em estufa a 37°C, por 24 horas.

A mistura do sangue ao ágar contendo NaCl foi realizada para observar se a presença do sangue interfere ou não nos resultados obtidos com as amostras cultivadas nos meios citados acima. Para cada uma das amostras foram realizadas provas de coagulase com colônias provenientes dos diferentes meios e os resultados comparados.

Para verificar se existem diferenças significativas nos resultados da plasmocoagulase, a partir do cultivo das amostras em meio contendo diferentes concentrações de NaCl, semeou-se as mesmas amostras partindo do cultivo em ágar sangue, em ágar simples nas seguintes concentrações de NaCl: 0,5, 1,5, 2,5, 3,5, 4,5, 5,5, 6,5 e 7,5%. Foram incubadas em estufa a 37°C, por 24 horas. Após incubação, realizou-se o teste da coagulase em cada amostra cultivada em ágar simples nas diferentes concentrações. Foram incubadas simultaneamente e os resultados obtidos após 1, 2, 3, 4, 8 e 24 horas de incubação em estufa a 37°C.

RESULTADOS:

Das 88 amostras coletadas, 64,7% foram catalase-positivas e 41% apresentaram hemólise quando cultivadas em ágar sangue (10% de sangue de coelho).

As amostras semeadas em ágar manitol e que obtiveram crescimento e fermentação após 24, 48 e 72 h de incubação em estufa a 37°C foram, respectivamente, 24,6%, 50,9% e 8,8%. Foram semeadas em ágar manitol apenas as amostras catalase-positivas.

Após 72 h de incubação a 37°C, 68,4% das amostras cresceram e fermentaram o manitol e foram DNase e lecitinase-positivas. Destas, 5,3% foram coagulase-negativas. Devemos ressaltar que, 8,8% das amostras que cresceram e fermentaram o manitol, após 72 h, foram lecitinase-negativas e DNase-positivas; 1,7% das amostras não fermentadoras do manitol foram DNase-positivas e lecitinase-negativas. Destas, 15,8% foram coagulase-negativas.

PAIVA, R. G. A prova da coagulase relacionada ao meio de cultivo de *Staphylococcus aureus* contendo diferentes concentrações de cloreto de sódio. Rev. Pat. Trop. 20(1):21-33, jan./jun. 1991.

Foram feitos gráficos correspondentes a cada tabela de resultados dos testes de coagulase, a partir dos meios de cultivo, analisando-se os resultados.

Comparando-se os gráficos correspondentes aos testes da coagulase a partir de ágar sangue, ágar manitol, ágar sangue (4,5% NaCl) e ágar sangue manitol, concluiu-se que:

Gráfico 1 – Ágar sangue: 100% das amostras foram coagulase-positivas, após 3 h de incubação em estufa a 37°C.

Gráfico 2 – Ágar manitol: 84% das amostras apresentaram-se coagulase-positivas, após 24 h e 16% apresentaram resultados falsos-negativos;

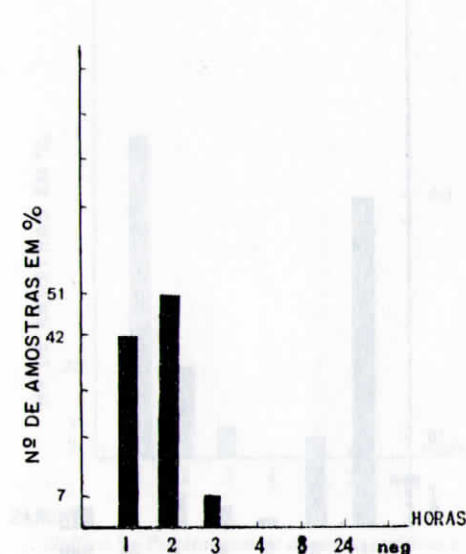


Gráfico 1 – Percentagem de amostras positivas e negativas no Teste da Coagulase, com cepas de *S. aureus* cultivadas em Ágar sangue (10% sg. de coelho).

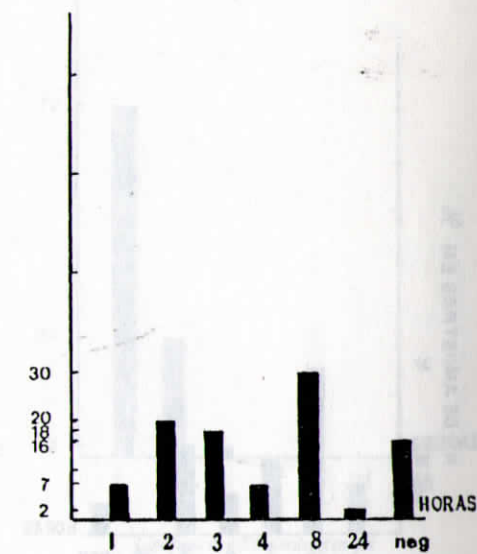


Gráfico 2 – Percentagem de amostras positivas e negativas de *S. aureus* cultivadas em Ágar Manitol (7,5% NaCl).

PAIVA, R. G. A prova da coagulase relacionada ao meio de cultivo de *Staphylococcus aureus* contendo diferentes concentrações de cloreto de sódio. Rev. Pat. Trop. 20(1):21-33, jan./jun. 1991.

Gráfico 3 – Ágar sangue (4,5% NaCl): 93% das amostras apresentaram coagulase positivas após 8 h e 7% apresentaram resultados falsos-negativos;

Gráfico 4 – Ágar sangue-manitol: 98% das amostras apresentaram-se coagulase-positivas após 8 h e 4% apresentaram resultados falsos-negativos.

Compararam-se os resultados dos gráficos correspondentes ao teste de coagulase, a partir de ágar simples nas seguintes concentrações:

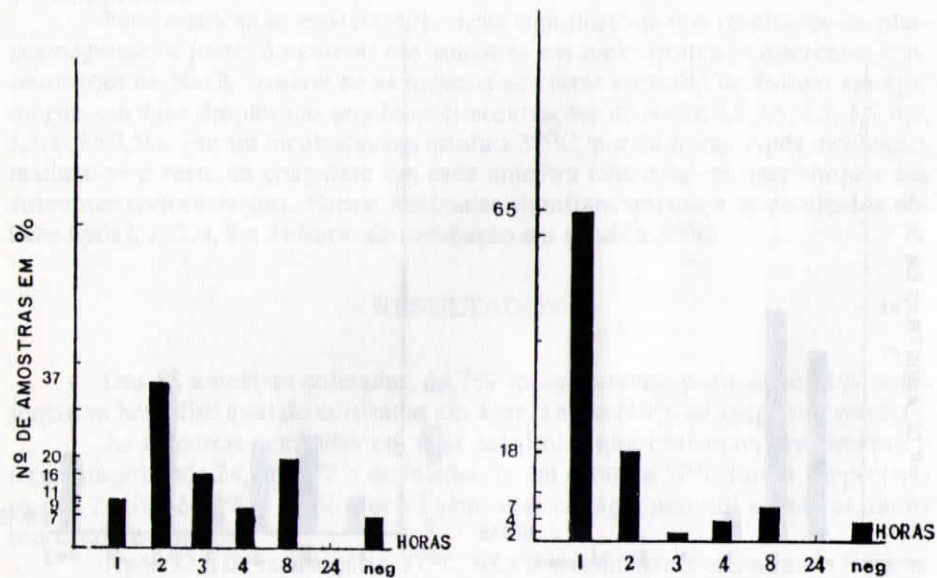


Gráfico 3 – Percentagem de amostras positivas e negativas no Teste da Coagulase, com cepas de *S. aureus* cultivadas em Ágar Sangue (4,5% NaCl);

Gráfico 4 – Percentagem de amostras positivas e negativas no Teste da Coagulase, com cepas de *S. aureus* cultivadas em Ágar Sangue-Manitol.

PAIVA, R. G. A prova da coagulase relacionada ao meio de cultivo de *Staphylococcus aureus* contendo diferentes concentrações de cloreto de sódio. Rev. Pat. Trop. 20(1):21-33, jan./jun. 1991.

Gráfico 5 – 0,5% NaCl: 97,8% das amostras apresentaram-se coagulase-positivas, após 3 h de incubação em estufa a 37°C e 2,4% apresentaram coagulase total após 24 h;

Gráfico 6 – 1,5% NaCl: 97,8% das amostras apresentaram-se coagulase-positivas, após 3 h de incubação e 2,2% apresentaram resultados falsos-negativos

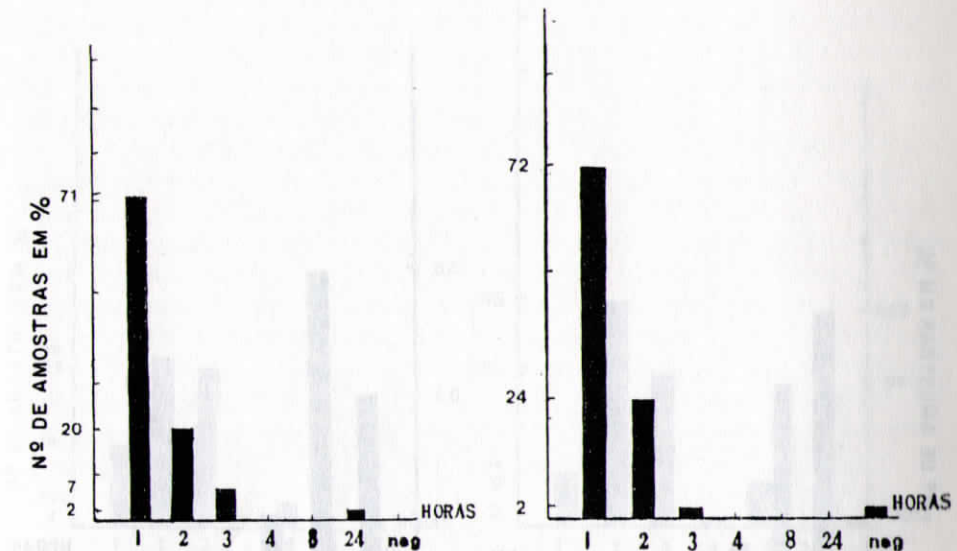


Gráfico 5 – Percentagem de amostras positivas e negativas no Teste da Coagulase, com cepas de *S. aureus* cultivadas em Ágar Simples (0,5% NaCl).

Gráfico 6 – Percentagem de amostras positivas e negativas no Teste da Coagulase, com cepas de *S. aureus* cultivadas em Ágar Simples (1,5% NaCl).

PAIVA, R. G. A prova da coagulase relacionada ao meio de cultivo de *Staphylococcus aureus* contendo diferentes concentrações de cloreto de sódio. Rev. Pat. Trop. 20(1):21-33, jan./jun. 1991.

Gráfico 7 – 2,5% NaCl: 100% das amostras apresentaram-se coagulase-positivas, após 3 h de incubação em estufa a 37°C;

Gráfico 8 – 3,5% NaCl: 100% das amostras apresentaram-se coagulase-positivas, após 3 h de incubação em estufa a 37°C;

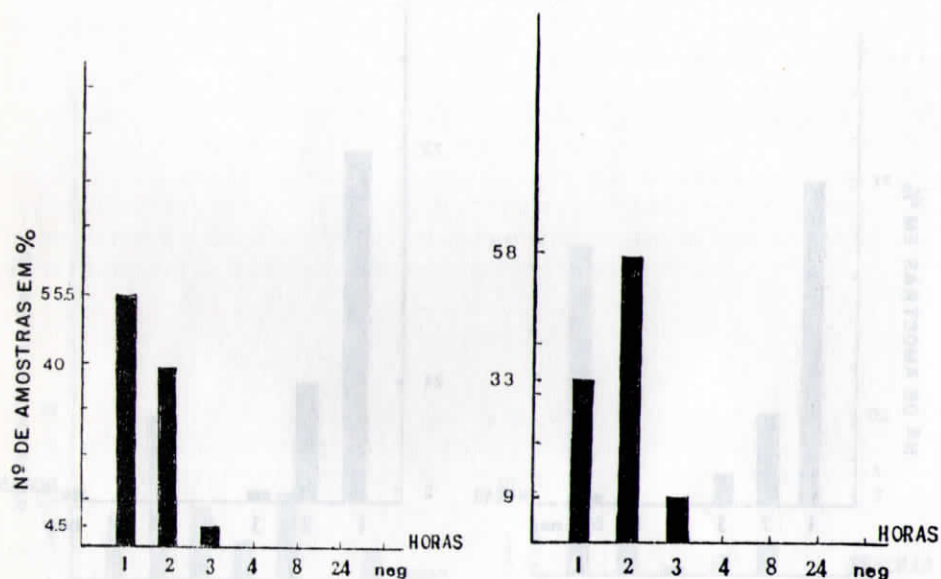


Gráfico 7 – Percentagem de amostras positivas e negativas no Teste da Coagulase, com cepas de *S. aureus* cultivadas em Ágar Simples (2,5% NaCl).

Gráfico 8 – Percentagem de amostras positivas e negativas no Teste da Coagulase, com cepas de *S. aureus* cultivadas em Ágar Simples (3,5% NaCl).

PAIVA, R. G. A prova da coagulase relacionada ao meio de cultivo de *Staphylococcus aureus* contendo diferentes concentrações de cloreto de sódio. Rev. Pat. Trop. 20(1):21-33, jan./jun. 1991.

Gráfico 9 – 4,5% NaCl: 97,8% das amostras apresentaram-se coagulase-positivas, após 8 h de incubação e 2,2% apresentaram resultados falsos-negativos;

Gráfico 10 – 5,5% NaCl: 97,8% das amostras apresentaram-se coagulase-positivas, após 8 h de incubação e 2,2% apresentaram resultados falsos-negativos;

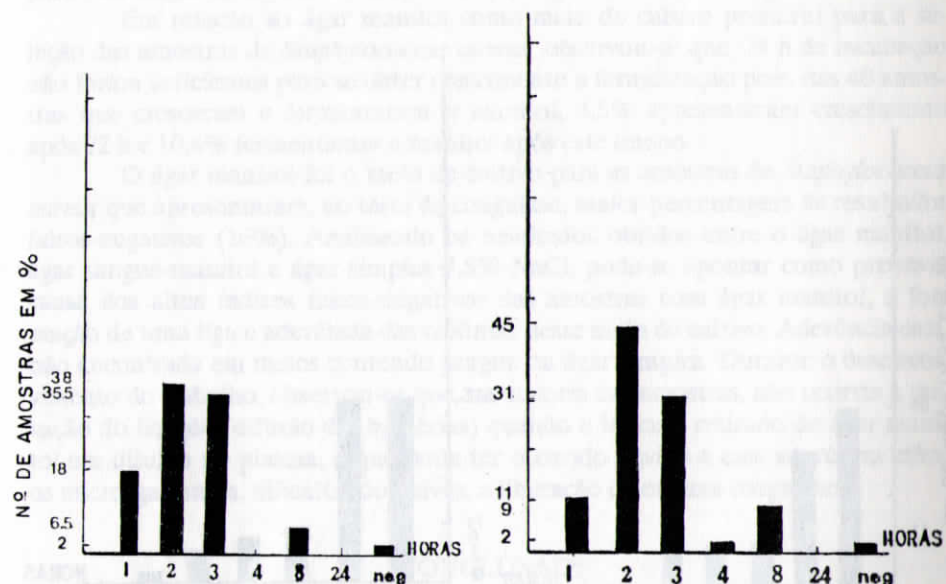


Gráfico 9 – Percentagem de amostras positivas e negativas no Teste da Coagulase, com cepas de *S. aureus* cultivadas em Ágar Simples (4,5% NaCl).

Gráfico 10 – Percentagem de amostras positivas e negativas no Teste da Coagulase, com cepas de *S. aureus* cultivadas em Ágar

PAIVA, R. G. A prova da coagulase relacionada ao meio de cultivo de *Staphylococcus aureus* contendo diferentes concentrações de cloreto de sódio. Rev. Pat. Trop. 20(1):21-33, jan./jun. 1991.

Gráfico 11 – 6,5% NaCl: 100% das amostras apresentaram-se coagulase-positivas, após 8 h de incubação em estufa a 37°C;

Gráfico 12 – 7,5% NaCl: 100% das amostras apresentaram-se coagulase-positivas, após 24 h de incubação em estufa a 37°C;

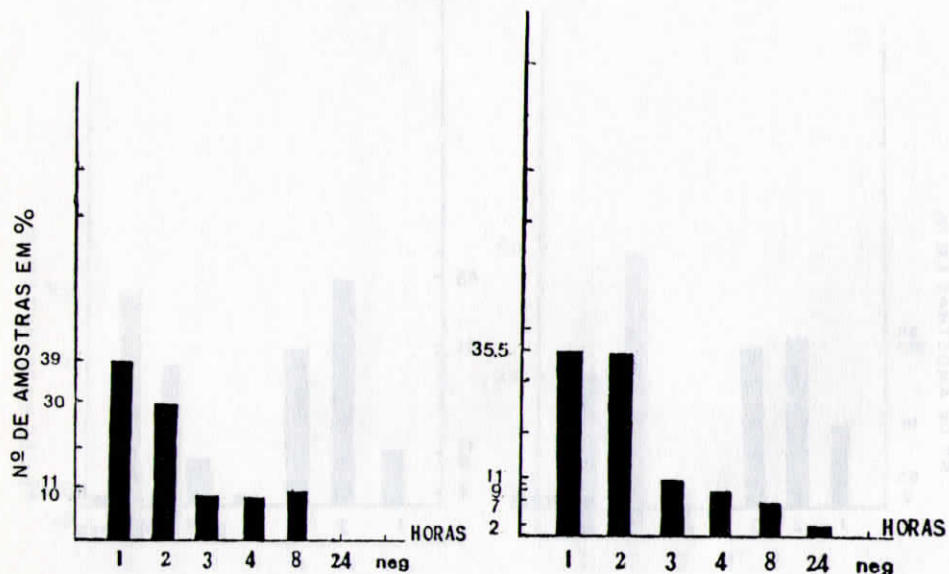


Gráfico 11 – Percentagem de amostras positivas e negativas no Teste da Coagulase, com cepas de *S. aureus* cultivadas em Ágar Simples (6,5% NaCl).

Gráfico 12 – Percentagem de amostras positivas e negativas no Teste da Coagulase, com cepas de *S. aureus* cultivadas em Ágar Simples (7,5% NaCl).

PAIVA, R. G. A prova da coagulase relacionada ao meio de cultivo de *Staphylococcus aureus* contendo diferentes concentrações de cloreto de sódio. Rev. Pat. Trop. 20(1):21-33, jan./jun. 1991.

DISCUSSÃO:

As variações no tempo de coagulação do plasma encontradas em cada uma das amostras, não apresentaram sequência lógica. Algumas obtiveram melhores resultados no teste de coagulase com inóculo de ágar com concentração de NaCl e outras com ágar sangue ou com quantidades mínimas de NaCl. Por este motivo, existem tantas divergências na determinação do meio de cultivo ideal para a realização do teste de coagulase.

As amostras de *Staphylococcus aureus* testadas apresentaram, em termos de percentagem, resultados mais rápidos e sem falsos-negativos quando retiradas dos seguintes meios de cultivo: ágar sangue e ágar simples nas concentrações de 0,5, 2,5 e 3,5% NaCl. Apesar dos meios de ágar simples 6,5 e 7,5% NaCl não apresentarem resultados falsos-negativos, as amostras foram se positivando em pequenas percentagens. Nos outros meios de cultivo tivemos níveis crescentes de resultados falsos-negativos, não sendo estes portanto, meios de cultivo seguros para a obtenção do inóculo utilizado na realização do teste da coagulase.

Em relação ao ágar manitol como meio de cultivo primário para a seleção das amostras de *Staphylococcus aureus*, observou-se que, 24 h de incubação não foram suficientes para se obter crescimento e fermentação pois, das 48 amostras que cresceram e fermentaram o manitol, 4,5% apresentaram crescimento após 72 h e 10,4% fermentaram o manitol após este tempo.

O ágar manitol foi o meio de cultivo para as amostras de *Staphylococcus aureus* que apresentaram, no teste da coagulase, maior percentagem de resultados falsos-negativos (16%). Analisando os resultados obtidos entre o ágar manitol, ágar sangue-manitol e ágar simples 7,5% NaCl, pode-se apontar como provável causa dos altos índices falsos-negativos das amostras com ágar manitol, a formação de uma liga e aderência das colônias neste meio de cultivo. Aderência esta, não encontrada em meios contendo sangue ou ágar simples. Durante o desenvolvimento do trabalho, observou-se que, na maioria das amostras, não ocorria a turvação do líquido (difusão das bactérias) quando o inóculo retirado do ágar manitol era diluído no plasma, o que pode ter ocorrido devido a essa aderência entre os microrganismos, dificultando, talvez, a liberação da enzima coagulase.

CONCLUSÃO:

Com os resultados obtidos das amostras de *Staphylococcus aureus*, cultivadas em meios contendo diferentes concentrações de NaCl para a realização do teste de coagulase em tubos, pode-se concluir que meios de cultivo sem interferência de NaCl ou com quantidades mínimas deste, são, sem dúvida, os mais indicados para a realização do teste, com mais segurança e rapidez.

PAIVA, R. G. A prova da coagulase relacionada ao meio de cultivo de *Staphylococcus aureus* contendo diferentes concentrações de cloreto de sódio. *Rev. Pat. Trop.* 20(1):21-33, jan./jun. 1991.

SUMMARY

Coagulase test production by *Staphylococcus aureus* in different culture media with varied sodium chloride concentrations.

The main purpose this experiment is to determine significant influences over different culture media with varied sodium chloride concentrations in 45 *Staphylococci* strains.

The coagulase test (tube test) in comparison to the newest methods has demonstrated a large efficiency in *Staphylococci* identification. Through different ways of growing the results of plasmocoagulase suffer alterations as much in time necessary to processing coagulase as in the final results, when a significant average of false negative tests can be observed. So many different opinions about the ideal medium of culture therefore of coagulase tests.

Through the results obtained it can be observed for that strains of *Staphylococci* show a positive result in a short time without negative false when it's used to inoculum test in types of culture with a low concentration sodium chloride (Simple agar - 0,5, 2,5 and 3,5% NaCl) or without the interference of NaCl (Blood agar - 10% of rabbit blood).

The Manitol agar (Chapman medium) was the medium of culture *Staphylococcus aureus* strains that showed the highest false-negative percentage (16% of strains). Therefore, it is not a safe medium of culture for obtaining inoculum for plasmocoagulase test use.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DICKSON, JANET & MARPLES, R.R. Coagulase production by Strains of *Staphylococcus aureus* of differing resistance characters: comparison of two traditional methods with a latex agglutination system detecting both clumping factor and protein. *A. Journal of Clinical Pathology*, 39(4):371-5, 1986.
- DONAYRE, CORCINA V. Estudo de *Staphylococcus* coagulase-negativos. Tese apresentada ao Instituto de Microbiologia da UFRJ, visando obtenção do grau DR em ciências, 1987.
- FLESLAND, O. Comparison of two agglutination test for differentiation between coagulase positive and coagulase negative *Staphylococci*. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.*, 8(9):83-4, 1987.
- GODOY, G.F. & LOPES FERNANDES, L.W. A prova da plasmocoagulase relacionada ao meio de cultivo dos estafilococos. *Rev. Bras. Anal. Clín.* 10(1):29-41, 1978.
- GORDON, L. & ARCHER, M.D. Coagulase-negative *Staphylococcus* in Blood Cultures: The clinician's dilemma. *Infection control*, 6(12):477-8, 1985.
- JAWETZ, E.; MALNICK, J.L. & ADELBERG, E.A. Os estafilococos. *Microbiologia Médica. Review of Medical Microbiology*, 197 p, 1984.

PAIVA, R. G. A prova da coagulase relacionada ao meio de cultivo de *Staphylococcus aureus* contendo diferentes concentrações de cloreto de sódio. *Rev. Pat. Trop.* 20(1):21-33, jan./jun. 1991.

- KIRCCOFF, LOUIS V. & SHEAGREN, JOHN N. Epidemiology and Clinical significance of blood cultures positive for coagulase negative *Staphylococcus*. *Infection Control*, 6(12):479-486, 1985.
- LEIGHTON, PETER M. & LITTLE, JEAN A. Identification of coagulase negative *Staphylococcus* isolated from urinary tract infections. *A. Journal of Clinical Pathology*, 85(1):92-5, 1986.
- QUEIROZ, D.A.O. Estudo do comportamento "in vitro" e animais inoculados de 29 amostras patogênicas de *Staphylococcus aureus* reconhecidos pela fagotipagem. *Rev. Pat. Trop.*, 16(1):13-21, 1987.
- RUSSEL, PAMELA B.; KLINE, J.; YODER, M.C. & POLIN, R.A. *Staphylococcal* adherence to polyvinyl chloride and heparin-banded polyurethane catheters is species dependent and enhanced by fibronectin. *Journal of Clinical Microbiology*, 25(6):1083-1087, 1987.
- SELEPAK, SALLY T. & WITEBSKY, FRANK G. Inoculum size and lot-to-lot variation as significant variables in the tube coagulase test for *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 22(5):835-7, 1985.
- SMITH, M. B.; VAN DER LINDEM & LOCKWOOD, B.M. Problems with the coagulase negative *Staphylococci*. *Pathology*, 18(1):148-52, 1985.
- THOMAS, J. MARRIE; KWAN, C.; NOBLE, A.M.; WEST, A. & DUFFIELD, L. *Staphylococcus saprophyticus* as a cause of Urinary Tract Infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 16(3):427-431, 1982.