

ESTUDO DO COMPORTAMENTO "IN VITRO" E EM ANIMAIS INOCULADOS, DE 29 AMOSTRAS PATOGÊNICAS DE *Staphylococcus aureus* RECONHECIDAS PELA FAGOTIPAGEM.*

Divina Aparecida Oliveira Queiroz**

RESUMO

29 amostras de *Staphylococcus aureus*, padronizadas e pertencentes aos diversos tipos bacteriológicos: I: 52/52A-79/80, II: 3A/3C/ 55/71, III: 42E/47/53/54/75/77/83A/84/85, não Classificados: 94/95/96/81, Experimentais: 86/88/89/90/92/DIIHK2, Extra - 42D/187, foram submetidas aos testes clássicos de reconhecimento de patogenicidade. Alguns foram feitos "in vitro" tais como: DNase, lecitinase, coagulase em lâminas e em tubos, produção de hemólise em ágar sangue de carneiros, coelhos e humanos, sensibilidade a 6 agentes antibióticos e fermentação do manitol. Outros testes, "in vivo", foram realizados em camundongos e coelhos de algumas das amostras escolhidas aleatoriamente.

Pretendeu-se avaliar o valor prático de cada um dos testes e a sensibilidade dos mesmos na detecção das amostras patogênicas, comparando-os com os resultados encontrados na literatura pertinente (4, 5, 10, 12). Todas as amostras, com exceção da PS 52 demonstraram a atividade de DNase, embora em diferentes níveis; alguns quase imperceptíveis. Quanto à prova de lecitinase foi considerada fortemente positiva e fraca para outras, como por exemplo a PS 52. A coagulase ocorreu em todas as amostras testadas em lâminas e em tubos, também em diferentes níveis, à exceção da PS 3A que não apresentou coagulase livre.

Nem todas as amostras foram hemolíticas no ágar sangue: humano, de coelho ou de carneiro. As PSs 52 e 47 não foram hemolíticas em nenhum destes tipos de ágar sangue utilizados.

Todas as amostras foram sensíveis à rifamicina e resistentes à penicilina natural. O manitol foi fermentado por todas as amostras, em 36 horas.(4).

Apenas a PS 84 foi fatal para o camundongo (injeção intraperitoneal de 0,1 ml, aproximadamente 100.000 germes), em 72 horas; e várias provocaram reações inflamatórias localizadas em coelhos (inoculações da mesma suspensão utilizada para camundongos), na coxa direita.

* Trabalho realizado no Laboratório de Fagotipagem do Depto. de Microbiologia do IPTESP/ UFG

** Prof. Auxiliar do Departamento de Microbiologia do IPTESP/UFG.

Não foi possível observar diferenças entre os microrganismos dos diversos grupos, mas, pode-se confirmar que são confiáveis os testes utilizados rotineiramente para reconhecimento do estafilococo patogênico.

UNITERMOS: STAPHYLOCOCCUS AUREUS; PATOGENICIDADE. FAGOTIPAGEM. EXPERIMENTAL.

INTRODUÇÃO

É conhecida a participação de determinados grupos fágicos de estafilococos em patologias definidas, como por exemplo as amostras do grupo II (PS 71) no desencadeamento da "scalded skin", devido à ampla produção de exfoliatina; do grupo II nas enteroinfecções, pela capacidade de produção da pré-enterotoxina humana em alimentos (3).

Todavia, ainda não se sabe, visto que não existem dados na literatura especializada, se ocorre alguma diferença entre os grupos fágicos, através dos testes de patogenicidade realizados rotineiramente, para que se possa, mesmo que de maneira presumível, na leitura dos testes rápidos, evidenciar germes responsáveis por determinadas patologias.

Pretendeu-se, neste trabalho, executar muitas das técnicas usuais e verificar a possibilidade de distinção entre as amostras e os grupos fágicos a que elas pertencem, além de verificar a adequação destas técnicas na detecção de amostras realmente patogênicas, como as que foram reconhecidas anteriormente e enquadradas nos diversos tipos fágicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Utilizou-se amostras disponíveis de *Staphylococcus aureus* conhecidas através

de bacteriófagos. Não foram testadas as PS 29 e 6 por não se encontrarem em boas condições à época da realização do trabalho. Para os testes foram utilizados 20 camundongos de peso variável (18 a 30g) e 10 coelhos machos adultos, além de meios de cultura tais como: Plasma de coelho; DNase tese ágar (Dfco): Ágar Mueller Hinton (Dfco), com gema de ovo; Ágar Mueller Hinton com sangue de coelho, carneiro e humano, a 3%; discos de antibióticos (Vitor Lorian): Penicilina, Oxacilina, Cefalosporina de 1ª geração, Eritromicina, Rifamicina e Amicacina.

As leituras dos resultados experimentais foram realizados em intervalos de 24h., 48h., e 120 h., após inoculação.

Métodos

Para a execução das técnicas de coagulase ligada e livre, atividade de DNase, lecitinase, observações de hemólise foram empregados os métodos descritos na bibliografia (4, 6, 9). Os testes de sensibilidade aos antibióticos foram realizados pelo método da difusão em ágar preconizado pela OMS/OPAS (1, 2). A observação de fermentação do manitol foi realizada de acordo com a técnica de CHAMPMAN (4, 5). As inoculações de 0,1 ml de suspensão de germes em salina 0,85% com a concentração aproximada de 100.000 bactérias foram feitas intraperitonealmente

te nos camundongos e, sistematicamente, na coxa direita dos coelhos.

RESULTADOS

01) A prova de DNase foi negativa para a amostra PS 52, fracamente positiva para as PS 52A/79, PS 3A, PS 71, PS 47 e positiva para as demais;

02) Com relação ao teste de lecitinase algumas amostras mostraram ser fracamente positivas tais como a PS 52, PS 54, PS 85, PS 88, PS 89, PS 90 e PS 92, os restantes deram resultados fortemente;

03) No teste da coagulase ligada, a amostra PS 52 mostrou ser autoaglutinável e a PS 187 deu uma reação positiva fraca, sendo que as demais foram coagulase ligada positivas. O teste de coagulase livre realizado em tubos mostrou negatividade para PS 3A, sendo que a Ps HK₂ deu reação positiva fraca. Todas as outras foram positivas;

04) Na verificação de hemólise, muitas das amostras testadas apresentaram positividade nos três tipos de ágar sangue utilizados, enquanto que as amostras PS 52 e PS 47 foram negativas nos referidos tipos, entretanto, as demais foram positivas, fracamente positivas ou até negativas para alguns dos ensaios citados (conforme Tabela I);

05) Todas as amostras apresentaram resistência às penicilinas, sensibilidade às rifamicinas e os demais resultados foram Sensíveis, Intermediários ou Resistentes (Tabela II);

06) Todas as amostras que foram semeadas em ágar manitol apresentaram crescimento, mas nem todas, fermenta-

ram o açúcar no tempo de 24 horas, requerendo assim, um período de incubação maior, por volta de 36 horas.

As provas de patogenicidade foram realizadas a partir do crescimento em A. S. I. (Ágar Simples Inclinado).

07) Com relação à inoculação intraperitoneal em camundongos, apenas o camundongo inoculado com a amostra PS 84, pertencente ao II grupo fágico, morreu no período de 72 horas, os demais não apresentaram nenhuma alteração aparente.

Os resultados obtidos através de leituras dos testes 24h., 48h., e 120h., estão contidos no Quadro I.

DISCUSSÕES E CONCLUSÕES

Não se detectou, qualitativamente, diferenças palpáveis entre as amostras para todas as reações realizadas não havendo assim, possibilidade de distinção entre as amostras de cada grupo pelo comportamento bioquímico, sensibilidade às drogas antimicrobianas ou capacidade de produção de abscessos nos animais de experimentação.

Hemolisina predominante (alfa e beta) deve determinar a ausência de uma ou outra na hemólise do sangue utilizado (humano, coelho e carneiro). A fermentação do manitol, por todas as amostras em até 36h., não pode ser comentada como validade na detecção do estafilococo patogênico.

A resistência à penicilina das amostras usadas no antibiograma deve ser atribuída pela elaboração de betalactamase por todas elas.

TABELA I – Testes de patogenicidade, in vitro, de 29 amostras padronizadas de *Staphylococcus aureus* frente à coagulase ligada, livre, DNase, lecitinase, além da hemólise em ágar sangue.

PS	Coag. ligada	Coag. livre	DNase	Lecitinase	ASH	ASCo	ASCa
52	A	+	–	(+)	–	–	–
52A/79	+	+	(+)	+	(+)	(+)	–
80	+	+	+	+	+	+	+
3A	+	–	(+)	+	+	+	(+)
3C	+	+	+	+	+	+	+
55	+	+	+	+	+	+	+
71	+	+	(+)	+	+	+	+
42E	+	+	+	+	(+)	(+)	+
47	+	+	(+)	+	–	–	–
53	+	+	+	+	–	(+)	(+)
54	+	+	+	(+)	+	(+)	+
75	+	+	+	+	+	+	(+)
77	+	+	+	+	+	(+)	(+)
83A	+	+	+	+	+	+	–
84	+	+	+	+	+	+	+
85	+	+	+	(+)	+	(+)	+
94	+	+	+	+	+	+	+
95	+	+	+	+	–	+	–
96	+	+	+	+	(+)	(+)	(+)
81	+	+	+	+	+	+	+

Cont.

86	+	+	+	+	+	(+)	+
88	+	+	+	(+)	+	(+)	+
89	+	+	+	(+)	+	(+)	+
90	+	+	+	(+)	+	(+)	+
92	+	+	+	(+)	+	(+)	+
D11	+	+	+	+	+	(+)	+
HK2	+	(+)	+	+	+	+	+
42D	+	+	+	+	+	(+)	+
187	(+)	+	+	+	(+)	(+)	(+)

A = Autoaglutinável

+ = Positivo

(+) = Positivo fraco

– = negativa

*Ágar sangue a 3% (humano, coelho e carneiro).

TABELA II – Testes de sensibilidade, in vitro, de 29 amostras padronizadas de *Staphylococcus aureus* frente a seis antibióticos.

PS	PENICILINA	OXACILINA	CEFALOSP.19 G	ERITROMIC.	RIFAMICINA	AMICACINA
52	R	S	S	S	S	S
52A/79	R	S	S	S	S	S
80	R	S	S	S	S	S
3A	R	R	R	R	S	R
3C	R	S	R	S	S	S
55	R	S	S	S	S	S

Cont. Tabela II

PS	PENICILINA	OXACILINA	CEFALOSP.19 G	ERITROMIC.	RIFAMICINA	AMICACINA
71	R	S	S	S	S	S
42E	R	S	S	S	S	I
47	R	S	S	S	S	S
53	R	S	S	S	S	I
54	R	R	S	S	S	I
75	R	S	S	S	S	I
77	R	S	S	S	S	S
83A	R	S	S	S	S	I
84	R	S	S	R	S	I
85	R	S	S	R	S	I
94	R	S	S	S	S	R
95	R	S	S	S	S	I
96	R	S	S	S	S	I
81	R	S	S	S	S	I
86	R	S	S	R	S	I
88	R	S	S	S	S	I
89	R	R	R	S	S	I
90	R	S	S	R	S	I
92	R	S	S	R	S	I
D11	R	S	S	S	S	I
HK2	R	S	S	S	S	I
H2D	R	S	S	S	S	I
187	R	S	S	S	S	I

R = Resistente
 I = Intermediária
 S = Sensível

TABELA III – Resultados das leituras dos graus de patogenicidade pela inoculação em coelhos, de 10 amostras padronizadas de *Staphylococcus aureus*, 24 h, 48h, e 120h, após inoculação.

PS	24 h	48 h	96 – 120 h
HK2	nenhuma alteração	nenhuma alteração	nenhuma alteração
3C	ponto necrótico no local da inoculação	ponto necrótico no local da inoculação	2 pontos necróticos e esfoliação do epitélio
52	ligeiro eritema	aumento do eritema	desaparecimento do eritema
52A/79	nenhuma alteração	pequeno nódulo sem eritema	ponto cicatricial e esfoliação do epitélio
71	pequeno edema sem eritema	pequeno edema sem eritema	presença de um nódulo grande e esfoliação do epitélio
77	abscesso inicial, eritema pronunciado	abscesso inicial; aumento do eritema	ponto cicatricial e esfoliação do epitélio
95	nenhuma alteração	pequeno nódulo com ligeiro eritema e 4 pequenos pontos necróticos	pontos levemente avermelhados com nódulo
D11	ligeira necrose no ponto de inoculação	aumento da necrose	ponto cicatricial e esfoliação do epitélio
81	abscesso inicial, eritema e aumento de temperatura	abscesso, eritema, temperatura elevada e nódulo	pequeno nódulo com ligeiro eritema e ponto cicatricial
92	nenhuma alteração	ligeiro eritema com 2 pontos necróticos	ponto cicatricial e esfoliação do epitélio

As reações provocadas na inoculação de uma pequena concentração de microrganismos não possibilita nenhuma conclusão definitiva e, em maior concentração de germes, poderíamos conhecer reações mais positivas em todos os casos.

Os testes, rotineiramente utilizados, na detecção dos estafilococos mostram sempre sua eficácia e comprovam o acerto da sua escolha. Preferimos acreditar na maior difusão do uso do ágar-gema-de-ovo em substituição ao teste da DNase pela visualização mais elucidativa das reações dos testes positivos e por ser mais econômico.

SUMMARY

Behaviour "in vitro" and "in vivo" of 29 strains of *Staphylococcus aureus* detected by Phagotyping.

Twenty-nine samples of standardized staphylococcus aureus all belonging to bacteriophagous group were submitted to classical tests for the recognition of pathogenic staphylococci and inoculated in rats and rabbits.

The activity of DNA-se was demonstrated by all samples, in different levels, except the PS 52, that did not present this enzymatic activity. The lecithinase was regarded strongly positive for most of the samples and frankly positive for the other, but much more evident than the previous test. The coagulase on lamina PS 3A, in the tests of tubes.

Not all of them were hemolytics in the blood-agar (sheep, rabbits and human). All samples were sensitive to rifampicin and resistant to penicillin.

The mannitol was fermented by all samples, in thirty-six hours.

Only the PS 84 was fatal to the rat (intraperitoneal injection with approximately a thousand germs), in seventy-two hours; and several samples caused (the same suspension in inoculations in the right thigh and inflammatory reactions on rabbits).

Difference in biochemistry activities were not detected and tests of pathogenicity among the member of each phagous group, but it was possible an assurance in the tests used particularly to isolate the pathogenic staphylococci.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. AMATO NETO, V. et alii. Antibióticos na prática médica. EDUSP, 1982.
02. BAUER, A. W. et alii. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. Am. J. Clin. Pathol., 45: 493, 1966.
03. BERGDOLL, M. S.; CHU, F. S.; BORGA, C. R.; HUANG, I.; WEISS, K. F. The Staphylococcal enterotoxins. Iap. J. Microbiol., 11: 358, 1967.
04. CHOUDHURY, K. K. & AIKAT, B. K. Carbohydrate fermentation reactions of coagulase positive and coagulase negative Staphylococci and their correlation with pathogenicity. Indian J. Med. Res., 40: 406, 1968.
05. CRUICKSHANK, R. Microbiologia Médica. Trad. M. Serpa dos Santos. Lisboa, Fund. Calouste - Gulbeukian, 1968. p. 876-877.
06. DUTHIE, E. S. Evidence for two forms of staphylococcal coagulase. Gen. Microbiol., 10: 437-444, 1954.
07. GOSHI, K.; CLUFF, L. E. E.; NORMAN, P. S. Studies on the pathogenesis of Staphylococcal infection. Bull. Johns Hopkins Hosp., 112: 15-31, 1963.
08. MELISH, M. E. The staphylococcal scalded skin syndrome. J. Infect. Dis., 125: 129, 1972.
09. MORDINOVA, N. B. et alii. Determination of DNA activity in Staphylococci. Zh. Microbiol. Epidemiol., 44: 37-42, 1969.
10. REIS, C. Testes de Patogenicidade para o Estafilococo. Rev. Pat. Trop., 1(4): 457-462, 1972.
11. SOLÉ-VERNIN, C. Anotações e Correspondências sobre Fagotipagem. 1984 e 1985.
12. THAL, A. P. & EGNER, W. The site of action of the staphylococcus alfa toxin. J. Exp. Med., 113: 67, 1962.