

TESTES DE PATOGENICIDADE PARA O ESTAFILOCOCO.
Observações sobre o comportamento de estafilococos quanto à plasmocoagulase, desoxirribonuclease, fermentação de carboidratos e patogenicidade para camundongos. *

CLEOMENES REIS **

RESUMO

Cem amostras de estafilococos provenientes de infecções humanas de diversos locais foram submetidas às provas de coagulase, desoxirribonuclease e fermentação de carboidratos.

Dezoito destas cem amostras foram selecionadas pelos seus caracteres culturais e bioquímicos para inoculação, por via intraperitoneal, em camundongos. A maioria das dezoito amostras (onze) originava-se de infecções do trato gênito-urinário humano.

Estafilococos incapazes de coagular o plasma (humano e de coelho), mas que mostraram capacidade de produzir desoxirribonuclease, não sendo fermentadores de muitos carboidratos produziram infecção e septicemia no camundongo, da mesma maneira que estafilococos coagulase e DNase positivos e fermentadores de vários carboidratos.

INTRODUÇÃO

Inúmeros trabalhos têm sido publicados sobre os caracteres

bioquímicos diferenciais entre o estafilococo patogênico e o não patogênico. (1,2,4,6,7,8,9,10.)

Há alguns anos Baird-Parker (2) afirmou que os estafilococos patogênicos são microorganismos que produzem fosfatase, coagulase e utilizam o manitol em anaerobiose, enquanto os não patogênicos são fosfatase e coagulase negativos, sendo, ainda incapazes de produzir ácidos através do manitol, em anaerobiose.

Recentemente, Mabeck e Mortensen (11,12) apresentaram resultados de infecções do trato urinário devidas a estafilococos coagulase negativos.

Choudhury & col. (4), correlacionando a produção de coagulase e fermentação de carboidratos com patogenicidade, demonstraram ser pequena a reação entre a fermentação da glicose e do manitol com a coagulação do plasma e patogenia.

* Trabalho realizado no Laboratório de Bacteriologia do Instituto de Patologia Tropical da UFGO.

** Professor Titular do Dept. de Microbiologia. IPT-UFGO.

TESTES DE PATOGENICIDADE PARA O ESTAFILOCOCO.
Observações sobre o comportamento de estafilococos quanto
à plasmocoagulase, desoxirribonuclease, fermentação de
carboidratos e patogenicidade para camundongos. *

CLEOMENES REIS **

RESUMO

Cem amostras de estafilococos provenientes de infecções humanas de diversos locais foram submetidas às provas de coagulase, desoxirribonuclease e fermentação de carboidratos.

Dezoito destas cem amostras foram selecionadas pelos seus caracteres culturais e bioquímicos para inoculação, por via intraperitoneal, em camundongos. A maioria das dezoito amostras (onze) originava-se de infecções do trato gênito-urinário humano.

Estafilococos incapazes de coagular o plasma (humano e de coelho), mas que mostraram capacidade de produzir desoxirribonuclease, não sendo fermentadores de muitos carboidratos produziram infecção e septicemia no camundongo, da mesma maneira que estafilococos coagulase e DNase positivos e fermentadores de vários carboidratos.

INTRODUÇÃO

Inúmeros trabalhos têm sido publicados sobre os caracteres

bioquímicos diferenciais entre o estafilococo patogênico e o não patogênico. (1,2,4,6,7,8,9,10.)

Há alguns anos Baird-Parker (2) afirmou que os estafilococos patogênicos são microorganismos que produzem fosfatase, coagulase e utilizam o manitol em anaerobiose, enquanto os não patogênicos são fosfatase e coagulase negativos, sendo, ainda incapazes de produzir ácidos através do manitol, em anaerobiose.

Recentemente, Mabeck e Mortensen (11,12) apresentaram resultados de infecções do trato urinário devidas a estafilococos coagulase negativos.

Choudhury & col. (4), correlacionando a produção de coagulase e fermentação de carboidratos com patogenicidade, demonstraram ser pequena a reação entre a fermentação da glicose e do manitol com a coagulação do plasma e patogenia.

* Trabalho realizado no Laboratório de Bacteriologia do Instituto de Patologia Tropical da UFGO.

** Professor Titular do Deptº. de Microbiologia. IPT-UFGO.

Nossa intenção, diante deste assunto tão discutido e em muitos pontos controvertido, foi a de comparar os estafilococos originados de infecções do trato gênito urinário humano com os de outras infecções humanas, quanto ao comportamento bioquímico, produção de DNase e coagulase de um número aceitável de casos e patogenicidade.

MATERIAL E MÉTODOS

Microorganismos

Foram utilizadas cem amostras de estafilococos: oitenta amostras foram selecionadas pela capacidade de coagular o plasma humano em testes realizados em tubo, originados de várias fontes de infecção humana: furunculoses 13; encefalites 2; Uretrites 51; abscessos faciais 2; otites 5; amigdalites 7; outras dezessete amostras foram incapazes de coagular plasma humano, originadas de infecções do trato gênito-urinário (T.G.U.) humano: Uretrites (secreções uretrais) 11; Uretrites (urinoculturas) 6; e para completar a centena, três amostras plasmocoagulase positivas foram utilizadas como testemunhas: uma amostra da A.T.C.C. 6538P, uma amostra Oxford e a outra proveniente do Laboratório da Faculdade de Medicina da U.F. Minas Gerais.

Provas Bioquímicas

Fermentação de carboidratos

Todas as amostras foram submetidas às provas de fermentação em aerobiose, utilizando-se

os seguintes carboidratos: glicose, lactose, sacarose e manitol. O meio empregado foi o de Barsiekow simplificado (água peptonada mais os carboidratos acima mencionados, tendo como indicador de pH, o indicador de Andrade). As verificações de fermentação eram feitas em 18-24 hs.

O manitol foi utilizado também sob a forma sólida (agar manitol — Oxoid), em tubos, para as provas de fermentação em anaerobiose. Os resultados desta fermentação eram observados até 5 dias.

Produção de coagulase

Foram realizados testes de coagulase em tubos, utilizando-se plasmas dos seguintes animais: cão, cavalo, coelho, carneiro, coelho, galinha e boi.

Os plasmas eram obtidos oxalados, em Paul-Heller. As amostras eram adicionadas a eles após crescimento de 24 horas em caldo simples. Não foram administrados ativadores séricos nos testes.

Para a leitura dos resultados empregou-se o esquema de Salle (13).

Produção de DNase

As amostras eram semeadas em agar DNA (BBL). A leitura efetuada com a adição de algumas gotas de solução Normal de ácido clorídrico.

Inoculação em camundongos —

Foram inoculadas 18 amostras em camundongos, por via intraperitoneal, sendo as amostras es-

colhidas pelos caracteres bioquímicos, produção de coagulase e DNase, pelo aspecto colonial em agar sangue (hemólise e pigmentação) e sua relação com a intensidade das lesões de que se originaram, sendo que três destas amostras foram as testemunhas anteriormente citadas.

Foram inoculadas 11 amostras coagulase positivas e DNase positivas (de diversas infecções humanas), 4 coagulase negativas e DNase positivas (de infecções do trato urinário humano), além das 3 amostras controle.

Os germes eram suspensos em cerca de 10 ml. de salina até se obter a densidade semelhante a do tubo número 4 da Escala de McFarland. Desta suspensão foi inoculado 0,1 ml. por camundongo.

RESULTADOS

De cem amostras (oitenta e três coagulase positivas, com a inclusão das amostras controle), menos da metade conseguiu fermentar o manitol, em anaerobiose, enquanto que pouco mais da metade fermentou esse carboidrato, em aerobiose. O número de amostras que, coincidentemente, fermentava o carboidrato na presença ou ausência de oxigênio era bem mais elevado.

Grande parte das amostras fermentou a sacarose, tanto as coagulase positivas como coagulase negativas. A glicose e a lactose foram menos fermentadas por amostras de ambos os grupos.

Os resultados dos testes de fermentação dos carboidratos, a coagulação dos plasmas de animais e dos testes de DNase estão resumidos na Tabela I.

As amostras coagulase positivas selecionadas pela coagulação do plasma humano também coagularam o plasma de coelho, mas não conseguiram coagular os plasmas de cão e boi. Cerca de 50% destas amostras conseguiu coagular os plasmas de cavalo, carneiro, coelho e galinha, não havendo, contudo, coincidência total na maioria das coagulações.

Os plasmas de galinha perdiam a capacidade de coagulação, após 3 dias, guardados em geladeira.

Para estes testes tivemos que utilizar sempre plasma fresco dessa ave.

Todas as amostras coagulase positivas (plasmas humano e de coelho foram DNase positivas. Mas, de 17 coagulase negativas do T.G.U. humano, 8 amostras mostraram capacidade de produção de DNase.

De 11 amostras coagulase e DNase positivas, 6 não produziram abscessos ao serem inoculadas nos camundongos, enquanto 5 amostras deste grupo mataram o animal em 24-72 horas. As amostras controle mataram os camundongos também entre 24, 72 horas.

De 4 amostras coagulase negativas e DNase positivas, obtidas de infecções de trato gênito urinário humano, 2 conseguiram matar os camundongos entre 48-72 horas. Estas amostras patogênicas para os camundongos

TABELA I

Comportamento bioquímico das amostras de estafilococos quanto a plasmocoagulase, DNase, fermentação de carboidratos e aspecto colonial (quantitativamente).

AMOSTRAS EXAMINADAS	COAGULASE								CARBOIDRATOS					DNase		Hemólise
	Plasma Humano	Plasma Coelho	Plasma Cobaia	Plasma Galinha	Plasma Cavalo	Plasma Carneiro	Plasma Boi	Plasma Cão	Manitol Aerobiose	Manitol Anaerobiose	Glicose	Lactose	Sacarose	Agar DNA (BBL)	Pigmento Amarelo	
80 amostras selecionadas (Plasma humano) (A)	80	80	43	39	34	23	0	0	56	39	36	33	31	80	67	61
17 amostras coagulase negativas (Plasma humano) (B)	0	0	0	0	0	0	0	0	9	0	6	4	11	8	5	2
3 amostras controle (C)	3	3	2	1	3	1	0	0	3	2	1	1	1	3	3	3

eram hemolíticas, fermentadoras da sacarose, mas não da glicose, lactose e manitol.

Estas 10 amostras patogênicas foram re-isoladas de vários órgãos portadores de micro abscessos, como rins, fígado, pulmões e coração. Os camundongos apresentaram abscessos também no local da inoculação.

DISCUSSÃO

De acordo com os trabalhos de Mordvinova & cols (10), Mabeck (11) e Mortensen (12), o teste realizado para a verificação da produção de desoxirribonuclease parece ser o mais útil e completo para a detecção de amostras patogênicas.

No presente trabalho conseguiu-se observar em dezessete amostras coagulase negativas, 8 amostras desoxirribonuclease positivas; e utilizando a metade destas amostras para a inoculação em camundongos, 50% produziu abscessos necróticos no local da infecção, septicemia e morte do animal.

Levando-se em consideração que o camundongo é menos suscetível às infecções estafilocócicas do que o coelho (4), por isso mesmo, talvez, se o animal inoculado tivesse sido o coelho, possivelmente maior seria o número de reprodução de infecções.

Não se encontraram macroscopicamente diferenças entre os abscessos, nem se observou predileção para determinados órgãos dos camundongos pelas amostras coagulase positivas (DNase posi-

vas) e coagulase negativas (DNase positivas).

O teste da coagulase parece trazer informações mais seguras nas estafilococcias humanas, à exceção das infecções gênito urinárias, quando o plasma utilizado é o humano ou o de coelho, pois os de outros animais, como coelho, galinha, cavalo e carneiro não são coagulados por todas as amostras capazes de coagular aqueles plasmas descritos.

Os plasmas de cão e boi não foram coagulados por nenhuma amostra, não sendo possível comparar os resultados das experiências de Duthie (6), que utilizou ativadores séricos para o plasma bovino, mas se identificam com os resultados obtidos por Alexander, citados por Burrows (3).

Os testes laboratoriais baseados unicamente na diferenciação do estafilococo pela capacidade de fermentação de carboidratos parecem não caracterizar a amostra patogênica não havendo correlação das amostras fermentadoras deste ou daquele carboidrato com patogenicidade.

SUMMARY

DETERMINATION OF PATHOGENICITY OF STAPHYLOCOCCI.

Observations on the behavior of staphylococci as to plasma coagulase, deoxyribonuclease activity, carbohydrate fermentation and pathogenicity for mice.

100 samples of staphylococci from several human infections were submitted to the coagulase test, deoxyribonu-

clease activity and carbohydrate fermentation.

18 of these samples were selected on account of their colonial features and biochemical reactions, for intraperitoneal inoculation in mice. 11 of these samples were from human urinary tract infections.

Staphylococci incapable of coagulating human and rabbit plasma but showing deoxyribonuclease activity and incapacity to ferment many carbohydrates caused infection and septicemia in mice in the same way as did coagulase and DNase positive staphylococci being capable of fermenting several carbohydrates.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à colaboração do Prof. Luis Carlos Netto, do Departamento de Medicina Tropical do Instituto de Patologia Tropical da Universidade Federal de Goiás, do Técnico de Laboratório Hugo da Rocha Silva, do auxiliar Sebastião Dias Batista, e dos estagiários Lázaro Borges e Marco Antônio Lisboa Cesarino.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BAILEY, W.R. & SCOTT, E.G. — Diagnostic microbiology. The C.V. Mosby Co. St. Louis, 2ª. edit. 106, 1966.
2. BAIRD-PARKER, A.C. — Staphylococci and their classification. Annals of the N.Y. Academy of Sciences, 128: 4-25, 1965.
3. BURROWS, W. — Tratado de Microbiología. Trad. Alberto Foch Y Pi. 18ª ed. Ed. Interamericana, México, 395 1965.
4. 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. 56: 402-406, 1968.
5. CRUICKSHANK, R. — Microbiologia médica. Trad. M. Serpa dos Santos, F. Calouste Gulbenkian. Lisboa. 145-160, 1968.
6. DUTHIE, E.S. — Evidence for two forms of staphylococcal coagulase. J. Gen. Microbiol. 10: 437-444, 1954.
7. ELKSTED, R.D. & NUNGESTER, W.J. — Coagulase in reversing antibacterial activity of normal human serum on *Micrococcus pyogenes*. Proc. Soc. Exptl: Biol. Med. 89: 90-94, 1955.
8. EVANS, J.B. — Current views and problems relating to the taxonomy of the Micrococcaceae. Inst. Bull. Bact. and Taxon 15 (2): 111-112, 1965. International Subcommittee on Staphylococci and Micrococci. Inst. Bull. Bact. Nomencl. Taxon. 15, 109, 1965.
9. MORDINOVA, N.B., VYGOSCHICOV, G.V., BAKLAGOVA, A.M. & ROGUINOVA, K. — Determination of DNA activity in Staphylococci. Zh. Microbiol. Epidemiol. Nol. 44: 37-42, 1967.
10. MABEK, C.E. — Studies in urinary tract infection due to coagulase negative Staphylococci. Acta Med. Scand. 186: 39-45, 1969.
11. MORTENSEN, N. — Studies in urinary tract infections. Biochemical characteristics of coagulase negative Staphylococci associated with urinary tract infections.
12. SALLE, J.B. — Fundamental principles of Bacteriology. McGraw Hill Co. N. Bacteriology. McGraw Hill Co. N. York. 5ª edit. 739, 1965.