

CAPACIDADE LETAL DE RAÇAS DE *Staphylococcus* COAGULASE NEGATIVAS E DESOXIRRIBONUCLEASE POSITIVAS, PARA CAMUNDONGOS

Vera Fantinato DAMETTO*
Flávio ZELANTE**

RESUMO: A existência de alta correlação entre as provas de coagulase e DNAase em bactérias do gênero *Staphylococcus* levou-nos a verificar a capacidade patogênica de raças coagulase negativas e DNAase positivas, através de sua inoculação em animais experimentais. Foi inoculado 0,5ml de uma suspensão contendo 1×10^8 ufc/ml, em grupo de seis camundongos albinos, sem distinção de sexo, pesando 20 ± 2 g, sendo observados por sete dias. Apenas uma das raças testadas provocou a morte dos animais. Assim, o uso da prova da DNAase em substituição à coagulase, induz a resultado falso-positivo estimado em 8,62%.

UNITERMOS: Estafilococos; enzimologia; patogenicidade.

INTRODUÇÃO

De acordo com o estabelecido pelo Subcomitê de Taxonomia de *Staphylococcus* e *Micrococcus*¹⁷, a prova de coagulase constitui o critério básico para a identificação da espécie *Staphylococcus aureus*, a única reconhecidamente patogênica do gênero *Staphylococcus*. Todavia, segundo alguns autores^{1,6,8}, 100% das raças desta espécie são sintetizadoras da enzima desoxirribonuclease (DNAase).

Tal fato induziu a que determinados meios profissionais viessem a adotar a prova da desoxirribonuclease na identificação de tais raças. A simplicidade desta prova, pode ter contribuído para a adoção deste critério.

Apesar da existência de alta correlação entre os resultados das provas de coagulase e DNAase, vários autores^{3,5,14} têm observado a existência de raças de *Staphylococcus* coa-

gulase negativas, que apresentam positividade na prova da DNAase.

Dada a importância de que se reveste o gênero *Staphylococcus* para a patologia humana e animal, torna-se fundamental a existência de conduta experimental que aquilate, adequadamente, "in vivo" o comportamento das raças DNAase positivas e coagulase negativas, de estafilococos.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção das amostras

Foram obtidas a partir de mucosa nasal de aspecto normal de estudantes de Odontologia⁹ e de amostras de água, cedidas pela Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB).

Coleta e semeadura das amostras

As amostras, colhidas da mucosa nasal com o auxílio de zaragatoa estéril previa-

* Departamento de Patologia - Faculdade de Odontologia - UNESP — 12.200 — São José dos Campos — SP.

** Departamento de Microbiologia — Instituto de Ciências Biomédicas — USP — Professor Colaborador da Disciplina de Microbiologia e Imunologia — Faculdade de Odontologia - UNESP — 12.200 — São José dos Campos — SP.

mente umidecida em solução salina (solução de NaCl 0,85%), também estéril, eram imediatamente semeadas em placas de Petri, contendo o meio seletivo "*Staphylococcus 110*".

As placas eram identificadas e incubadas a 37°C durante 24 horas, permanecendo, em seguida, mais 24 horas à temperatura ambiente.

Identificação das espécies

A identificação da espécie *Staphylococcus aureus* foi realizada através das provas recomendadas pelo Subcomitê de Taxonomia de *Staphylococcus* e *Micrococcus*¹⁷ e adotada pela 8a. edição do Manual de Bergey⁴. Foram realizadas as provas da catalase, da oxidação e fermentação da glicose (teste O-F), da coagulase em tubo e da desoxirribonuclease (DNAase).

Inoculação em animais

Cada raça de estafilococos coagulase negativa e DNAase positiva foi semeada em erlenmeyer de 150ml contendo 50ml de meio de cultura "Brain Heart Infusion Broth" (DIFCO) e incubada a 37°C/24h.

Dessa cultura, foram transferidos 30 ml para tubo estéril de centrifuga, com tampa de rosca. Após centrifugação a 5000 rpm / 20 min. / 4°C em centrifuga refrigerada, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspenso a 10 ml com salina estéril, homogeneizado por agitação mecânica durante três minutos e centrifugado novamente. Repetiu-se a lavagem das células por mais duas vezes. Após ressusensão final, o material foi novamente submetido à agitação mecânica por três minutos.

A suspensão assim preparada foi submetida ao espectrofotômetro Coleman Jr. e ajustada a concentração para a leitura final, correspondente à concentração de $1,0 \times 10^9$ ufc/ml, com salina estéril.

A determinação do potencial patogênico das raças coagulase negativas e desoxirri-

bonuclease positivas, foi realizada pela inoculação da suspensão de microrganismos contendo 10^9 ufc/ml, por via endovenosa em camundongos albinos, de ambos os sexos, pesando $20 \text{ g} \pm 2 \text{ g}$.

Para cada raça de *Staphylococcus* utilizou-se um grupo de seis animais. O inóculo, de 0,5 ml da suspensão bacteriana, era administrado na veia da cauda, com o auxílio de seringa estéril tipo insulina e agulha estéril 20 x 5 mm.

Os seis animais de cada grupo eram mantidos na mesma gaiola, identificados e observados durante sete dias.

RESULTADOS

Em todos os experimentos, utilizaram-se raças conhecidas de *Staphylococcus* coagulase e DNAase positivas e coagulase e DNAase negativas, como controle.

Do material colhido dos alunos da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos (UNESP) obteve-se 872 raças de bactérias do gênero *Staphylococcus*, dentre as quais 20 (2,29%) delas revelaram ser coagulase negativas e desoxirribonuclease positivas.

A Tabela 1 apresenta o comportamento das 20 raças de estafilococos isoladas, segundo a intensidade de síntese de DNAase, no meio "DNAse Ágar" (DIFCO).

As raças que apresentaram reação fortemente positiva ao teste da DNAase — 14 de mucosa nasal e 10 de amostras de água — foram selecionados para inoculação.

TABELA 1 — Padrão de comportamento apresentado na prova de DNAase, das 20 raças de *Staphylococcus* isoladas.

N.º de amostras	Prova	
	coagulase	DNAase
14	—	fortemente positiva (+ +)
6	—	fracamente positiva (+)

A Tabela 2 apresenta os resultados dos ensaios de inoculação destas 24 raças, em ca-

mundongos. O denominador indica o número de animais inoculados e o numerador, o número de animais mortos.

TABELA 2 — Resultados das provas “in vivo” realizadas com raças de *Staphylococcus* coagulase negativos e DNAase positivas.

N.º	C	D	1.ºd	2.ºd	3.ºd	4.ºd	5.ºd	6.ºd	7.ºd
23	—	+	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
1	—	+	6/6	—	—	—	—	—	—
<i>S. aureus</i>	+	+	5/6	6/6	—	—	—	—	—
<i>S. epidermidis</i>	—	—	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6

Obs.: o numerador representa o número de animais mortos e o denominador o número de animais inoculados.

C = Coagulase

D = DNAase

d = dia

Nos ensaios realizados com as 24 raças, em somente um deles foi observada a morte da totalidade do lote dos animais, fato este constatado durante a primeira hora após a inoculação, e confirmado através de ensaios repetidos. Os demais animais inoculados com as 23 raças restantes, não apresentaram sinais ou sintomas detectáveis. No lote controle inoculado com *Staphylococcus aureus*, os animais apresentaram sintomas, como prostração e eriçamento dos pelos e evoluíram até a morte.

Os testes realizados com as raças controles, comprovaram a patogenicidade para camundongos da espécie *S. aureus*, levando à morte todos os animais inoculados no prazo máximo de até 48 horas. Por outro lado, no lote inoculado com *S. epidermidis* não foi observada ocorrência de mortes no prazo máximo de observação.

DISCUSSÃO

Foi observada a inexistência de uma correlação absoluta entre as provas da DNAase e coagulase, o que é concorde com JACOBS *et alii*¹², HOLT¹¹, REIS¹⁵, MORTON & COHN¹³, BOROBIO *et alii*³, DORNBUSCH *et alii*⁷, dentre outros.

Embora a partir dos trabalhos de WECKMAN & CATLIN¹⁸ se tenha difundido a prova da DNAase na identificação de estafilococos potencialmente patogênicos, os

esquemas propostos por BAIRD-PARKER², para a classificação de *Staphylococcus* e *Micrococcus*, não mencionam a prova da DNAase; o autor, porém, considerou que a correlação entre a produção desta enzima e o potencial patogênico, necessitava de maiores investigações.

Com base em nossos resultados, quando se considera apenas a prova da DNAase para identificação de estafilococos patogênicos, verifica-se um total de 232 raças positivas. Por este resultado, as 20 raças coagulase negativas as quais se comportaram de maneira diversa do controle positivo de patogenicidade “in vivo”, estariam incluídas neste resultado.

Assim, com o uso da prova da DNAase em substituição à coagulase, incorremos em resultado falso-positivo estimado em 8,62% (20/232). Considerando-se um intervalo de confiança de 98%, obtemos os limites de 4,32% e 12,91% para a estimativa da real proporção de erro.

Dessa forma, quer nos parecer que a prova da DNAase não deva ser utilizada como recurso substitutivo da prova de coagulase, para a identificação de raças de *S. aureus*. A margem de erro intrínseca à ausência de concordância (8,62%) quando da utilização da primeira prova não autoriza ser preconizada tal conduta laboratorial, na caracterização de raças de estafilococos dotados de atividade patogênica.

A produção de DNAase observada nas raças por nós estudadas, apesar de não ter sido quantificada foi, todavia, qualificada entre fortemente e fracamente positiva, demonstrando não ser semelhante para todas as raças.

Conforme os resultados inseridos na Tabela 2, os animais inoculados não evoluíram para o desfecho letal, com exceção de um único lote em que os animais apresentaram mortes imediatas. Aliás, este fenômeno que está merecendo observações subsequentes, não foi devido a qualquer fator tóxico elaborado pela bactéria, difusível no meio da cultura, pois os animais recebiam o inóculo constituído por células lavadas.

Ao contrário dos nossos atuais resultados, REIS¹⁵ estudando raças produtoras de DNAase verificou que duas dentre quatro delas foram letais para camundongos inoculados por via intraperitoneal. SHIMIZU *et alii*¹⁶, inoculando uma raça, também em camundongos e pela mesma via demonstraram que esta levou os animais utilizados à morte.

Todavia, FURUSAWA & MIYOSHI¹⁰, que também utilizaram a via endovenosa, verificaram que entre as duas raças de estafilococos coagulase negativas e DNAase positivas administradas em camundongos, somente uma delas provocou a morte de parte de um lote de animais.

CONCLUSÕES

A aplicação da conduta experimental descrita permitiu a obtenção de resultados que, discutidos e analisados nos possibilitam concluir que: 1. o grau de produção de DNAase não é o mesmo para todas as raças, merecendo cuidadoso exame as fracamente positivas; 2. as raças coagulase negativas e DNAase positivas, quando inoculadas por via intravenosa em camundongos, não reproduziram o quadro clínico semelhante ao observado quando da inoculação de raça de *S. aureus*, utilizada como controle positivo de patogenicidade; 3. a prova da DNAase, por si só, não é válida para a detecção de raças patogênicas de estafilococos.

DAMETTO, V.F. & ZELANTE, F. — Letality of coagulase negative and deoxyribonuclease positive *Staphylococcus* strains for mice. *Rev. Odont. UNESP, São Paulo*, 12(1/2):83-87, 1983.

ABSTRACT: The pathogenic capacity of negative coagulase and positive DNAse strains in the *Staphylococcus* genera was studied by inoculation in experimental animals. 24 strains were tested in 6 animals each. White mice, 20 ± 2g were inoculated with 0,5 ml of 1×10^9 cfu/ml, and observed for seven days. A single strain induced 100% mortality. The false results obtained when using the DNAse as only test were estimated in about 8.62%, according to laboratorial observations.

KEY-WORDS: *Staphylococci*; enzymology; pathogenicity.

REFERÊNCIAS-BIBLIOGRÁFICAS

1. ASHCAR, H. — *Staphylococcus aureus*. Avaliação de provas para sua identificação. Diferenças de comportamento bioquímico entre amostras de origem humana e animal. São Paulo, Faculdade de Medicina da USP, 1969. (Tese - Livre Docência).
2. BAIRD-PARKER, A.C. — The classification of *Staphylococci* and *micrococci* from world-sources. *J. gen. Microbiol.*, 38: 363-387, 1965.
3. BOROBIO, M.V.; MARTIN, R. & PEREA, E.J. — Criterios de patogenicidad en *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiol. Esp.*, 29:47-57, 1976.
4. BUCHANAN, R.E. & GIBBONS, N.E. ed. — *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 8. ed. Baltimore, Williams e Wilkins, 1974. p. 478-489.
5. BURNS, J. & HOLTMAN, D.F. — Biochemical properties of virulent and avirulent *staphylococci*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 88: 1115-1124, 1960.
6. DISALVO, J.W. — Desoxyribonuclease and coagulase activity of micrococci. *Med. Tech. Bull.*, 9: 191-196, 1958.
7. DORNBUSCH, K.; NORD, C.E.; OLSSON, B. & WADSTRÖM, T. — Some properties of coagulase-negative deoxyribonuclease producing strains of *staphylococci* from human infections. *Med. Microbiol. Immunol.*, 162: 143-152, 1976.
8. FANTINATO, V. & ZELANTE, F. — Verificação da existência de portadores de *Staphylococcus aureus* entre estudantes de Odontologia. *Rev. Fac. Odontol. Univ. São José dos Campos*, 6: 1-11, 1977.
9. FANTINATO, V. & ZELANTE, F. — Observações sobre portadores de *Staphylococcus aureus* entre estudantes de Odontologia. *Rev. Fac. Odont. Univ. São Paulo*, 19, 1981. (no prelo)
10. FURUSAWA, K. & MIYOSHI, Y. — Virulence of genus *Staphylococcus*. III Studies on pathogenicity to mice. *Bull. Tokyo Med. Dent. Univ.*, 22: 1-8, 1975.

11. HOLT, R.J. — The opportunist pathogenicity of coagulase - negative staphylococci. *J. clin. Pathol.*, 24: 770, 1971.
12. JACOBS, S.I.; WILLIS, A.T. & GOODBURN, G.M. — Significance of deoxyribonuclease production by staphylococci. *Nature*, London, 200: 709-710, 1963.
13. MORTON, H.E. & COHN, J. — Coagulase and deoxyribonuclease activities of staphylococci isolated from clinical sources. *Appl. Microbiol.*, 23: 725-733, 1972.
14. PIOCHI, B.J.A. — *Contribuição para o estudo de Staphylococcus isolados de saliva e de placa dentária*. São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas da USP, 1972. (Tese - Doutorado).
15. REIS, C. — Testes de patogenicidade para o estafilococo. Observações sobre o comportamento de estafilococos quanto à plasmocoagulase, desoxirribonuclease, fermentação de carboidratos e patogenicidade para camundongos. *Rev. Patol. Trop.*, 4: 457-462, 1972.
16. SHIMIZU, T.; ITO, Y. & SHIBATA, S. — A new type in experimental intraperitoneal infection of staphylococci in mice. *Nat. Inst. Anim. HEALTH Q.*, 8: 8-15, 1968.
17. SUBCOMMITTEE on Taxonomy of Staphylococci and Micrococci. Minutes of 1st Meeting, 5th-6th, 1964. *Int. Bull. Bacteriol. Nomencl. Taxon.* 15:107-108, 1965.
18. WECKMAN, B.G. & CATLIN, B.W. — Deoxyribonuclease activity of micrococci from clinical sources. *J. Bacteriol.*, 73: 747-753, 1957.

Recebido para publicação em 10.5.83.