

LISOGENIA EM ESTREPTOCOCOS DO GRUPO A E AVALIAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA PARA DETECÇÃO DE BACTERIÓFAGOS TEMPERADOS OBTIDOS DESSES MICRORGANISMOS

Agnes Marie Sá FIGUEIREDO (1), Leslie C. BENCHETRIT (1), Stephen S. SKJOLD (2), Mary DEZIEL (2) e Lewis W. WANNAMAKER (2)

R E S U M O

Cento e trinta e quatro amostras de estreptococos do grupo A foram examinadas quanto a ocorrência de lisogenia. Utilizando-se quatro meios de cultura diferentes para o preparo do crescimento confluyente da amostra indicadora em placas de ágar, observamos uma porcentagem de detecção de lisogenia de 14,2%. Dos 19 bacteriófagos obtidos, apenas 10 produziram lises na amostra indicadora preparada em quaisquer dos meios. Os restantes falharam para a produção de "plaque" em um ou mais meios. A taxa de lisogenia das amostras isoladas da orofaringe foi de 16,7% e 13,5% para as amostras obtidas de lesões na pele. As porcentagens de amostras lisogênicas nos estreptococos M-tipáveis e nos M-não tipáveis, para os microrganismos isolados da orofaringe, foram 16,7% e 20% respectivamente. Entretanto, para os estreptococos isolados de lesões na pele, esta taxa foi de 24,2% para as amostras M-tipáveis e, 9,1% para as amostras M-não tipáveis.

I N T R O D U Ç Ã O

Lisogenia é comum nos estreptococos beta-hemolíticos do grupo A de LANCEFIELD⁷. Entretanto, seus bacteriófagos não têm sido estudados tão exaustivamente como os que infectam outras espécies bacterianas, como *E. coli* e os *Staphylococcus*. Isto talvez possa ser explicado pelas dificuldades técnicas encontradas no trabalho com este sistema hospedeiro-fago, pela patogenicidade, e facilidade de transmissão desses estreptococos para o homem⁸. Nos últimos anos, os pesquisadores têm concentrado suas atenções sobre o possível papel desses fagos na epidemiologia das infecções estreptocócicas, e das suas seqüelas não supurativas, a febre reumática e a glomerulonefrite difusa aguda. Esses bacteriófagos, podem influenciar na produção de certas substâncias liberadas pelos estreptococos deste grupo como, por exemplo, a hialuronidase¹ e a toxina eritrogênica¹⁹. Além

disso, estão envolvidos em um dos poucos mecanismos conhecidos de intercâmbio genético (transdução) entre amostras de estreptococos do grupo A¹⁰.

Tem sido sugerido uma relação entre lisogenia, infecções estreptocócicas e glomerulonefrite aguda. Uma taxa de lisogenia de 28% foi observada quando apenas uma amostra indicadora era utilizada⁷. Entretanto, durante a infecção nosocomial com uma amostra do tipo T 12⁷ e um surto de escarlatina com uma amostra do tipo M 19¹⁹, as taxas de detecção de fagos foram bem mais elevadas, 83 e 84% respectivamente. Lisogenia pôde ser detectada em 100% das amostras de estreptococos do grupo A obtidos de área com alta incidência de glomerulonefrite. Porém, apenas 10% dos estreptococos foram lisogênicos quando isolados de área com baixa incidência desta seqüela¹⁶. Em

(1) Departamento de Microbiologia Médica, Instituto de Microbiologia da UFRJ, Caixa Postal 68040, 21944, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

(2) Departments of Pediatrics and Microbiology, University of Minnesota Medical School, Minneapolis, MN 55455, USA

adição a esses dados, foi demonstrado que bacteriófagos puderam ser obtidos de 45%, das amostras isoladas de crianças que possuíam infecções estreptocócicas. Por outro lado, apenas 20% das amostras eram lisogênicas, quando isoladas de crianças portadoras de microrganismos, mas que não possuíam evidência clínica de doença estreptocócica¹⁴.

Este trabalho apresenta o resultado do exame de 134 amostras de estreptococos do grupo A, isoladas em nosso laboratório, quanto a presença de bacteriófagos temperados. Meios de cultura diferentes foram também avaliados para a detecção de bacteriófagos temperados obtidos deste microrganismo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras — As 134 amostras de estreptococos do grupo A foram obtidas de pacientes com infecções estreptocócicas ou suas complicações, na cidade do Rio de Janeiro². As amostras foram classificadas sorologicamente como grupo A de Lancefield, através da técnica de EL KHOLY^{4,5}. A tipagem sorológica quanto a proteína M foi feita através de reação de precipitação em tubo capilar, utilizando-se a extração com ácido a quente¹⁵. A classificação sorológica quanto a proteína T, através da técnica de aglutinação¹⁸, e a reação de opacidade do soro¹² foram também realizadas. A amostra não lisogênica, designada K56 (estreptococo do grupo A, tipo M 12), foi utilizada como amostra indicadora para detecção de fagos⁷.

Meios para a preparação de bacteriófagos — O caldo para o crescimento bacteriano e indução de fagos foi designado como caldo n.º 1¹⁷, anteriormente por MALKE¹⁰. Este meio contém 6% de proteose peptona n.º 3 (Difco Laboratories, Detroit, MI., EUA.) 0,05M de NaCl, 0,5 mM de glicose, 0,01M de Na₂HPO₄, 5% de soro de cavalo (Instituto Vital Brazil, Niterói, RJ) e 2mM de CaCl₂. "Trypticase Soy Broth" (BBL Microbiology Systems, Cockeysville, MD., EUA.) e dializado do caldo "Todd Hewitt" (Difco) foram também utilizados. Este último foi obtido a partir da dissolução a quente de 33,3g de "Todd Hewitt" em 50ml de água destilada. Após diálise por 18 horas a 4°C, contra 500ml de tampão fosfato de sódio 0,01M, pH 7,2, contendo 0,15M de NaCl, o meio foi novamente dializado por mais 5 horas contra outros 500ml

do tampão. Os tampões de diálise foram juntos e esterilizados por autoclavação.

Meios para o preparo do crescimento confluyente da amostra indicadora — Utilizou-se os seguintes meios, todos contendo ágar a 1%:

Meio 286 — Constituído de 8% de proteose peptona n.º 3, 0,02M de beta-glicerofosfato de sódio (E. Merck, Darmstadt, República Federativa da Alemanha), 0,01M de tampão tris (hidroximetil) aminometano (Tris-hidroclorido; Intermat Indústria e Comércio, São Paulo, SP), 0,2% de extrato de levedura (Difco), 0,01M de glicose e 4mM de CaCl₂.

Meio R6 — Composto de 3% de proteose peptona n.º 3, 0,05M de NaCl, 0,01M de Na₂HPO₄, 5,5mM de glicose, 5% de soro de cavalo e 2mM de CaCl₂.

Meio N6 — Descrito anteriormente por CLEARY & col.³, sendo composto de 4% de proteose peptona n.º 3, 2% de extrato de levedura, 0,1M de NaCl, 5M de Na₂HPO₄, 2,8mM de glicose e 2mM de CaCl₂.

Meio 191 — Contendo 9% de proteose peptona n.º 3, 0,1M de NaCl, 1,3mM de tampão Tris-hidroclorido, 5,5mM de glicose, 3,6 mM de beta-glicerofosfato de sódio, 5% de soro de cavalo e de 2mM de CaCl₂.

Os meios foram autoclavados sem a glicose, o cloreto de cálcio e o soro de cavalo, sendo estes esterilizados separadamente e adicionados aos meios, quando indicado. Hialuronidase testicular bovina (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, EUA) foi adicionada quando necessária, para a concentração final de 40 µg/ml do meio após a autoclavação.

Preparo do crescimento confluyente da amostra indicadora — A amostra K56 crescida em caldo n.º 1 durante 18 horas a 30°C foi semeada nos meios sólidos citados, conforme já descrito anteriormente^{1,17}.

Detecção de lisogenia — As amostras de estreptococos do grupo A foram inicialmente testadas para a liberação espontânea de fagos¹⁷. Nas amostras que falharam na demonstração de lisogenia por este teste, foi feita indução com mitomicina C (0,1 µg/ml, Sigma) durante 2 horas^{1,17}. Os lisados foram esterilizados por filtração em membrana (tipo HA, Millipore Corp.

Bedford, MA., EUA), e gotejados no crescimento confluyente da amostra indicadora, após diluições decimais (10^{-1} a 10^{-5}) em caldo n.º 1 a 37°C^{17} .

RESULTADOS

Meios — Três meios líquidos ("Trypticase Soy Broth", dializado do caldo "Todd Hewitt" e caldo n.º 1) foram avaliados para indução com mitomicina C de três amostras de estreptococos do grupo A. Observamos que os títulos dos fagos variaram em função do meio utilizado, e que a indução em caldo n.º 1 foi a que permitiu melhores resultados, com um aumento de aproximadamente 2 log nos títulos dos fagos (Tabela I). Uma das amostras testadas, apesar de ter apresentado um bom crescimento em "Trypticase Soy", não foi capaz de libe-

rar bacteriófagos após a indução neste meio, possuindo entretanto atividade lítica na amostra K56 após indução em caldo n.º 1 (resultado não mostrado). Em relação aos meios sólidos utilizados para o preparo do crescimento confluyente da amostra indicadora K56, dos 19 bacteriófagos isolados, conforme podemos observar na Tabela II, apenas 10 produziram lises na amostra indicadora, preparada em quaisquer dos meios usados. Os bacteriófagos restantes falharam para a produção de "plaques" em um ou mais meios. As placas de ágar contendo meios com soro de cavalo (meios 191 e R6), foram as que forneceram melhores resultados: do total de fagos testados, apenas dois não foram capazes de produzir "plaques" no meio 191, e dois falharam para a produção de "plaques" no meio R6.

T A B E L A I

Título dos fagos obtidos de duas amostras de estreptococos do grupo A, após indução com mitomicina C em três meios líquidos diferentes

Lisado da amostra	Origem da amostra	Tipo M	Padrão T	Reação de opacidade do soro	Título dos fagos (UFP/ml) ^a		
					Caldo "Trypticase Soy"	Dializado do caldo "Todd Hewitt"	Caldo no.º 1
78-082	Orofaringe	NT ^b	3/13/B3264	A ^c	5 1,2 x 10	6 2,6 x 10	7 3,3 x 10
78-020	Pele	NT	11/12/27/44/ 8/25/Imp. 19/ 23/5/27/44	A	5 1,1 x 10	6 3,6 x 10	7 3,1 x 10

a — UFP/ml, Unidades formadoras de "plaques" por mililitro. Os lisados foram titulados no crescimento confluyente da amostra K56, preparado no meio R6, conforme descrito em Materiais e Métodos

b — NT, Não tipável

c — A, Ausência da reação de opacidade do soro

Lisogenia — Das 134 amostras de estreptococos do grupo A testadas, apenas 3 (2,2%) liberaram fagos espontaneamente. A indução com mitomicina C aumentou a frequência de detecção de bacteriófagos, 16 (12,2%) dessas amostras foram lisogênicas. Três (15,8%) dos dezoito bacteriófagos temperados obtidos, apenas produziram "plaques" quando hialuronidase bovina foi adicionada aos meios de cultura. Conforme observamos na Tabela III, as porcentagens de lisogenia nas amostras M-tipáveis e das amostras M-não tipáveis foram 16,7% e 20% respectivamente, para as amostras isoladas da orofaringe. Entretanto, para os microrganismos isolados de lesões na pele, a taxa de lisogenia foi de 24,2% para as M-tipáveis e

de 9,1% para os M-não tipáveis. Ao relacionarmos a detecção de lisogenia com a origem das amostras isoladas, as porcentagens de detecção de fagos foram de 13,5 e 16,7% para as amostras da pele e garganta, respectivamente. De cinco amostras do tipo M 69, 3 foram por nós verificadas como lisogênicas. Em quatro amostras que possuíam tipo M nefritogênicos, 2 do tipo M 12 e 2 do tipo M 55, não detectamos lisogenia.

DISCUSSÃO

A taxa de lisogenia (14,2%) encontrada nas 134 amostras de estreptococos do grupo A, por nós estudadas, foi menor do que os 85% obser-

FIGUEIREDO, A. M. S.; BENCHETRIT, L. C.; SKJOLD, S. S.; DEZIEL, M. & WANNAMAKER, L. W. — Lisogenia em estreptococos do grupo A e avaliação de meios de cultura para detecção de bacteriófagos temperados obtidos desses microrganismos. *Rev. Inst. Med. São Paulo* 25:16-21, 1983.

T A B E L A II
Atividade lítica de 19 bacteriófagos temperados no crescimento confluyente da amostra K56, preparado em 4 meios diferentes

Origem da amostra	Lisado da amostra	Tipo M	Padrão T	Reação de opacidade do soro	Meio de Cultura									
					286	191	R6	N6						
Pele	78-020	NT ^a	11/12/27/ 44/8/25/ Imp. 19/23	A ^b	}									
	78-025	NT	5/27/44/3	A										
	78-052	53	3/13/B3264	A										
	79-031	NT	B3264	A						}	+	+	+	+
	79-333	NT	B3264/9	A										
	80-017	69	3/13/B3264	A										
	80-018	72	3/13/B3264/ /12	A						}				
	80-019	69	3/13/B3264	A										
	78-053	NT	8/25/Imp. 19/2	P						}	+	+	+	-
	79-187	69	3/13/B3264.	A										
	78-049	NT	6/23	P						}	-	+	+	+
	79-037	60	4	P										
	79-301	32	3/13/B3264	A						}	+	+	-	+
	80-022	2	8/25/Imp.19	P										
Orofaringe	78-082	NT	3/13/B3264	A	}	+	+	+	+					
	78-129	NT	2	P										
	79-032	70	28	A						}	-	-	+	-
	79-215	NT	4	P										
	79-270	NT	6	P										

a - NT, Não-tipável

b - A, Ausência da reação de opacidade; P, presença

c - +, Presença de atividade lítica na amostra indicadora; -, ausência.

Os lisados foram obtidos por indução com mitomicina C dos estreptococos em caldo N° 1 conforme descrito em Materiais e Métodos.

T A B E L A III
Ocorrência de lisogenia em 125 amostras de estreptococos do grupo A

Origem das amostras	Amostras lisogênicas ^a	
	M-tipáveis (39) ^b	M-não tipável (86) ^c
Orofaringe	^d 1 (16,7)	4 (20)
Pele	8 (24,2)	6 (9,1)

a - As amostras foram testadas quanto a lisogenia na amostra indicadora K56, após a indução com mitomicina C, como descrito em materiais e métodos

b - Número de amostras M-tipáveis testadas

c - Número de amostras M-não tipáveis testadas

d - Número de amostras lisogênicas (porcentagem)

vado por ZABRISKIE¹⁹ em 88 amostras isoladas de pacientes com escarlatina, o qual utilizou cinco amostras indicadoras para a detecção de fagos. Entretanto, taxas de lisogenia de 28 e 10% tem sido verificadas por outros autores^{7,16}, mesmo quando mais de uma amostra indicadora foram utilizadas. Vários fatores poderiam estar contribuindo para a baixa taxa de lisogenia por nós encontrada como, por exemplo, falhas no processo de indução com mitomicina C⁹, a amostra indicadora universal não ter sido adequada e uma possível existência de fagos defectivos. Da mesma forma, existe ainda a possibilidade de que as amostras, onde liso-

gena não pôde ser detectada, não possuem profagos. Por outro lado, a resposta da bactéria ao agente indutor parece estar na dependência das condições fisiológicas do meio de cultura⁹. Em nossos estudos, uma amostra lisogênica M-não tipável, perdeu sua capacidade de liberar fagos quando a indução com mitomicina C passou a ser feita em caldo "Trypticase Soy" ao invés de caldo n.º 1. Entretanto, duas amostras M-não tipáveis, foram capazes de liberar fagos após indução nos meios citados. A indução em caldo n.º 1, que contém soro de cavalo, foi a que forneceu melhor título de fagos, sugerindo que a inclusão de soro no meio de cultura parece ser importante na liberação de bacteriófagos pelos estreptococos do grupo A durante o tratamento com mitomicina C.

KRAUSE⁸ verificou que o caldo "Todd-Hewitt", apesar de ser um meio geralmente adequado e recomendado para o crescimento de estreptococos do grupo A, não permitiu a produção de "plaques" visíveis pelos bacteriófagos desses estreptococos, quando foi usado como única fonte de nutrientes em placas de ágar. Isto poderia indicar que outros fatores além de um bom crescimento da amostra indicadora parecem ser necessários para a adsorção e infecção produtiva por estes bacteriófagos. Ao utilizarmos quatro meios sólidos para a detecção de fagos, observamos que apesar da amostra indicadora ter crescido satisfatoriamente em todos os meios testados, apenas 10 dos 19 bacteriófagos obtidos foram capazes de apresentar atividade lítica na amostra indicadora, quando esta era crescida em quaisquer um desses meios. Nossos resultados parecem sugerir que os meios sólidos contendo soro de cavalo seriam os mais indicados para a produção de "plaques" por estes bacteriófagos.

A hialuronidase, enzima que depolimeriza o ácido hialurônico, está associada aos bacteriófagos dos estreptococos do grupo A⁶. A maior parte desta atividade enzimática se encontra solúvel nos lisados destes fagos, o restante da atividade está firmemente ligada à partícula viral^{1,6}. Esta enzima, essencial para a penetração dos fagos na cápsula mucóide de ácido hialurônico da bactéria hospedeira¹¹, encontra-se provavelmente localizada no talo desses vírus¹. Nesse contexto, a hialuronidase fágica é um pré-requisito para a adsorção do fago na parede celular bacteriana e para sua posterior

infecção produtiva no estreptococo. Os fagos virulentos possuem baixos níveis da enzima¹, necessitando assim, de fontes exógenas de hialuronidase para infectar algumas amostras de estreptococos do grupo A, que possuem características mucóides¹¹. Ao contrário, níveis mais elevados da enzima têm sido observado em bacteriófagos temperados¹. No presente estudo, o fato de três dos fagos só terem produzido "plaques" quando a hialuronidase bovina foi adicionada ao meio de cultura, sugere que estes bacteriófagos possuem baixos níveis da enzima. Este resultado, também observado por outros autores¹⁷, indica a adição de hialuronidase exógena, como rotina, em meios de cultura para a detecção de bacteriófagos obtidos de estreptococos do grupo A.

A partir do estudo de 49 amostras de estreptococos do grupo A isolados de crianças com infecções estreptocócicas no trato respiratório superior, foi sugerido uma possível relação entre lisogenia e infecções causadas pelos estreptococos do grupo A M-não tipáveis¹⁴. Esses resultados não foram verificados por nós em 26 amostras isoladas de pacientes com infecções estreptocócicas no trato respiratório superior, onde a taxa de lisogenia entre as amostras M-tipáveis e M não-tipáveis foram semelhantes. Alguns pesquisadores tem sugerido uma possível relação entre lisogenia e glomerulonefrite difusa aguda¹⁶. Das nove amostras por nós isoladas, que possuíam tipos M associados com casos de glomerulonefrite pós-estreptocócica em outros países¹³, apenas 3, do tipo M 69, foram lisogênicas. Maiores estudos necessitam ser feitos para a elucidação do papel destes bacteriófagos na epidemiologia das infecções estreptocócicas e de suas complicações.

SUMMARY

Lysogeny among group A streptococci and appraisal of media for assay of temperate bacteriophages from these microorganisms

One hundred and thirty four strains of group A streptococci were tested for lysogeny with the use of only 1 indicator strain and 4 different media for preparation of the indicator lawns. Lysogeny was demonstrated in 14.2% of the strains. Only 10 of the bacteriophages showed lytic activity on the indicator lawn prepared in any one of the media. The 9 other

phages failed to show lytic activity on 1 or more of the media. The frequency of demonstration of lysogeny in throat and skin strains was 16.7 and 13.5% respectively. Lysogeny among throat isolates was observed in 16.7 and 20% of M-typable and M-nontypable strains respectively. Among skin strains that exhibited lysogeny 24.2% were M-typable and 9.1% M-nontypable.

AGRADECIMENTO

Este estudo recebeu auxílio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Auxílio n.º 40.0559/79, Dr. Benchetrit), da Financiadora de Estudos e Projetos, e CEPG da UFRJ. Gostaríamos de agradecer ao Dr. Richard R. Facklam e Lúcia M. Teixeira, pela classificação sorológica de nossas amostras.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. BENCHETRIT, L. C.; GRAY, E. D. & WANNAMAKER, L. W. — Hyaluronidase activity of bacteriophages of group A streptococci. *Infect. Immun.* 15: 427-532, 1977.
2. BENCHETRIT, L. C.; BORGES-NETO, A. A.; FIGUEIREDO, A. M. S. & OLIVEIRA, C. M. de — Occurrence of group A and non-group A beta-hemolytic streptococci in human infections in Rio de Janeiro. *Rev. Microbiol.* (São Paulo) 11: 50-54, 1980.
3. CLEARY, P. P.; WANNAMAKER, L. W.; FISHER, M. & LAIBLE, N. — Studies of the receptor for phage A25 in group A streptococci: The role of peptidoglycan in reversible adsorption. *J. Exp. Med.* 145: 578-593, 1977.
4. EL KHOLY, A.; WANNAMAKER, L. W. & KRAUSE, R. M. — Simplified extraction procedure for serological grouping of beta-hemolytic streptococci. *Appl. Microbiol.* 28: 836-839, 1974.
5. FIGUEIREDO, A. M. S.; BENCHETRIT, L. C.; BORGES-NETO, A. A. & OLIVEIRA, C. M. de — Evaluation of the El Kholy technique for grouping beta-hemolytic streptococci. *Rev. Brasil. Pesq. Med. Biol.* 13: 21-24, 1980.
6. KJEMS, E. — Studies on streptococcal bacteriophages. III — Hyaluronidase produced by the streptococcal phage host cell System. *Acta Path. Microbiol. Scand.* 44: 429-439, 1958.
7. KJEMS, E. — Studies on streptococcal bacteriophages. IV — The occurrence of lysogenic strains among group A haemolytic streptococci. *Acta Path. Microbiol. Scand.* 49: 199-204, 1960.
8. KRAUSE, R. M. — Studies on bacteriophages of hemolytic streptococci. I — Factors influencing the interaction of phage and susceptible host cell. *J. Exp. Med.* 106: 365-383, 1957.
9. LWOFF, A. — Conditions de l'efficacité inductrice du rayonnement ultraviolet chez une bactérie lysogène. *Ann. Inst. Pasteur* 81: 370-388, 1951.
10. MALKE, H. — Transduction of *Streptococcus pyogenes* K56 by temperature-sensitive mutants of the transducing phage A25. *Z. Naturforsch.* 24b: 1556-1561, 1969.
11. MAXTED, W. R. — Enhancement of streptococcal bacteriophage lysis by hyaluronidase. *Nature* (London) 170: 59-60, 1952.
12. MAXTED, W. R.; WIDDOWSON, J. P.; FRASER, C. A. M.; BALL, L. C. & BASSETT, D. C. J. — The use of the serum opacity reaction in the typing of group A streptococci. *J. Med. Microbiol.* 6: 83-90, 1973.
13. MAXTED, W. R. — Group A streptococci: pathogenesis and immunity. In: SKINNER, F. A. & QUESNEL, L. B., eds. — *Streptococci*. New York, Academic Press, 1978, p. 107-125.
14. QUINN, R. W. & LOWRY, P. N. — Streptococcal L forms and phage. A clinical-epidemiologic study. *Yale J. Biol. Med.* 47: 86-92, 1974.
15. SWIFT, H. F.; WILSON, A. T. & LANCEFIELD, R. C. — Typing group A haemolytic streptococci by M-precipitation reactions in capillary pipettes. *J. Exp. Med.* 78: 127-133, 1943.
16. UBUKATA, K.; KOMMO, M. & FUJJI, R. — The lysogeny of group A beta-hemolytic streptococci isolated from infectious disease of children. *Med. & Biol.* 90: 359-362, 1975.
17. WANNAMAKER, L. W.; SKJOLD, S. A. & MAXTED, W. R. — Characterization of bacteriophages from nephritogenic group A streptococci. *J. Infect. Dis.* 121: 407-418, 1970.
18. WILLIAMS, R. E. O. — Laboratory diagnosis of streptococcal infections. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 19: 153-176, 1958.
19. ZABRISKIE, J. B. — The role of temperate bacteriophage in the production of erythrogenic toxin by group A streptococcal. *J. Exp. Med.* 119: 761-780, 1964.

Recebido para publicação em 15/12/1981.