

REAÇÃO DE COAGLUTINAÇÃO ESTAFILOCÓCICA NA IDENTIFICAÇÃO DE MICOPLASMAS

Jorge TIMENETSKY (1) & Melissa CURCIO (2)

RESUMO

A reação de coaglutinação estafilocócica foi utilizada como metodologia de identificação rápida de micoplasmas para ser aplicada em laboratórios não especializados. Amostras selvagens de micoplasmas isoladas de humanos, culturas celulares, ratos e camundongos foram identificados através da reação de coaglutinação estafilocócica utilizando-se do *Staphylococcus aureus* produtor de proteína A (amostra Cowan I) sensibilizado com anticorpo de coelho contra amostra padrão micoplasma. Na identificação, os micoplasmas estavam em suspensão concentrada provenientes de 4,0 ml de cultivo. Quarenta e oito amostras de *M. pulmonis*, 6 de *M. arthritis*, 8 de *M. arginini*, 3 de *M. orale*, 15 de *A. laidlawii*, 8 de *M. hominis* e 3 de *M. pneumoniae* foram identificadas pela coaglutinação estafilocócica e confirmadas pela inibição de crescimento. Parâmetros ótimos no preparo do conjugado e da reação de coaglutinação foram estabelecidos; o conjugado coaglutinante manteve-se estável por 90 dias quando adicionado com acetilcisteína; a coaglutinação foi visualizada sem auxílio óptico. Os soros foram absorvidos com espécies padrões heterólogas e com o precipitado de caldo estéril.

UNITERMOS: Coaglutinação estafilocócica; Identificação de micoplasma.

INTRODUÇÃO

A reação de coaglutinação estafilocócica tem sido proposta para a identificação de algumas espécies bacterianas, vírus e toxina de *Escherichia coli*^{3, 8, 10, 13, 17, 20, 22, 25}. Em 1979 KALUZEWSKI et al. compararam os resultados da coaglutinação estafilocócica com a reação de fixação de complemento utilizando-se do sonicado de algumas cepas padrões de micoplasma para sua identificação. MORSY et al. utilizaram-se desta reação como recurso adicional na evidencição de aglutinações de *M. gallisepticum* com anticorpos monoclonais.

A identificação dos micoplasmas é realizada com soros específicos, pois as provas bioquímicas são insuficientes. Os soros contra estas bactérias são produzidos

por centros de excelência e não são comercializados. A inibição de crescimento é uma metodologia específica e adequada na caracterização das espécies destes microrganismos, entretanto, este procedimento poderá estender-se por algumas semanas a partir da colheita do material biológico^{4, 5, 6, 12, 23}.

Considerando as limitações na caracterização de micoplasmas, propõe-se aplicar a coaglutinação estafilocócica como alternativa de identificação rápida destes microrganismos e torná-la viável para laboratórios não especializados. Serão utilizadas algumas amostras padrões e selvagens de interesse humano e na pesquisa biomédica^{1, 12}. Os resultados serão comparados com a inibição de crescimento.

⁽¹⁾ Professor Assistente Doutor do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

⁽²⁾ Estagiária em nível de Iniciação Científica (FAPESP), São Paulo, SP, Brasil.

Endereço para correspondência: Dr. Jorge Timenetsky, Depto. de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 1374, 05508-900 São Paulo, SP, Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

1. **Amostras padrões de micoplasma; *Acholeplasma laidlawii*^a NCTC 10116, *Mycoplasma arginini*^a NCTC 10129, *Mycoplasma orale*^a NCTC 10112, *Mycoplasma hominis*^b NCTC 10111, *Mycoplasma pneumoniae*^b NCTC 10119 e *Mycoplasma pulmonis*^c NCTC 10139, *Mycoplasma arthritidis*^c NCTC 10162.** Espécies representantes de interesse em: a) culturas celulares, b) humanos, c) ratos e camundongos^{1,12}.
2. **Obtenção do soro de coelho para a elaboração do conjugado^{6,9,19,21}.** Os soros foram obtidos de coelhos inoculados com amostras padrões de micoplasmas (10^9 células/ml contidos em 5,0 ml de PBS) obtidos de 500 ml de cultura e emulsificado a 50% com adjuvante completo de Freund. Os soros foram absorvidos em alíquotas, por uma hora a temperatura ambiente, com os concentrados de micoplasma das espécies heterólogas e com o sedimento proveniente de 500 ml de meio de cultura estéril contido em 5,0 ml de PBS (0,5 ml de soro + 0,2 ml do concentrado de micoplasma ou sedimento de meio estéril). A atividade específica dos soros contra os micoplasmas foi verificada antes e após a inoculação, através da inibição de crescimento segundo a técnica descrita por CLYDE.
3. **Cultivo e Isolamento de amostras selvagens de micoplasma^{2,4,5,7,14,23,24}.** Amostras selvagens de micoplasmas foram isoladas de ratos e camundongos através lavagem traqueobrônquica, com perfusão de pulmão e lavagem do conduto auditivo com perfuração da membrana timpânica. Das culturas celulares, os microrganismos foram isolados de 0,5 ml de suspensão recente de cultura celular em meio sem impedientes e não tripsinizado. As amostras humanas foram obtidas do raspado de uretra masculina e lavado intranasal de crianças com pneumonia. Os caldos para a cultura além dos componentes básicos possuíam glicose e arginina e estavam contidos em tubos de ensaio com tampa rosqueada em volumes de 4,0 ml. A alteração do pH nos caldos após o cultivo indicavam o crescimento destes microrganismos. O crescimento dos micoplasmas em meio líquido foi confirmado observando-se as colônias em meio sólido e realizando-se a prova da digitonina e a coloração de Dienes.
4. **Preparo do Conjugado Coaglutinante^{8,11}.** Obtido

com amostra de *S.aureus*, produtora de proteína A (amostra Cowan J), sensibilizada com soro de coelho anti-micoplasma. A amostra do estafilococo foi cultivada em 1,0 litro de BHI, por 24 horas à 37°C sob agitação. A cultura foi concentrada e lavada em PBS (pH-7,4) a 2000 g, por 20 minutos, à 4°C. Ressuspendeu-se o sedimento a 10% em PBS (pH-7,4) com 0,5% de azida sódica. A suspensão a 10% foi estocada à 4°C até o momento da sensibilização.

Da suspensão estoque a 10% elaborou-se outra a 50%. Em 0,4 ml de soro de coelho não diluído adicionou-se 0,2 ml de estafilococo à 50%. Para verificar as condições ótimas de sensibilização do estafilococo à temperatura ambiente, manteve-se o sistema em repouso por 30, 60, 120 e 240 minutos. Após a separação do soro e no sentido de adaptar melhor a metodologia, elaboraram-se os conjugados coaglutinantes à 0,25%, 1,25%, 2,5%, 6,25% e 12,5% em solução de PBS (pH-7,4) com 0,5% de azida sódica e mantidos à 4°C até o momento do uso.

A reação de coaglutinação estafilocócica foi realizada em lâminas de vidro com 12 escavações. A cada escavação depositou-se, em partes iguais (50 µl), a suspensão de micoplasma e em seguida o conjugado coaglutinante. O sistema ficou sob agitação branda por 10 minutos à temperatura ambiente. As reações foram observadas com e sem auxílio de lupa (40 X), iluminadas obliquamente pela face inferior e acompanhadas de reações controle.

Dois tipos de suspensões concentradas de micoplasma foram testadas. Uma era constituída pela suspensão das amostras padrões utilizadas na inoculação em coelhos (10^9 células/ml) e a outra era constituída de amostras padrões e selvagens provenientes das culturas com 4,0 ml de caldo (10^6 células/ml), concentrada em 100 µl com PBS, utilizada nos procedimentos de cultivo isolamento.

As possíveis reações inespecíficas dos conjugados e/ou dos concentrados de micoplasma, foram observadas através das seguintes associações em volumes de 50 µl; a) CONJUGADO COAGLUTINANTE com: Concentrado de micoplasma de espécie heteróloga proveniente do cultivo de 4,0 ml (volume do caldo utilizado no isolamento de micoplasma) e 500 ml (volume de caldo utilizado na preparação de antígeno para a inoculação nos coelhos), soro normal e heteroimune de coelho e

precipitado de caldo estéril. b) CONCENTRADO DE MICOPLASMA com: Soro normal de coelho, precipitado de caldo estéril, suspensão de *S.aureus* nas concentrações de 0,25% a 12,5% e estafilococo tratado com soro normal de coelho.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os soros anti-micoplasma de coelho inibiram, respectivamente, o crescimento das amostras padrões de micoplasma em meio sólido. Os soros obtidos antes da imunização, não demonstraram atividade inibitória de crescimento. Os conjugados coagulantes permitiram identificar e confirmar as respectivas amostras padrões de micoplasma quando concentrados para inoculação (10^9 células/ml) nos coelhos ou provenientes do concentrado do crescimento em 4,0 ml (10^6 células/ml) de caldo após revelarem o consumo de glicose ou arginina. (Tabela 1)

Considerou-se o conjugado coagulante a 2,5%, a condição mais adequada para evidência da coaglu-

tinação estafilocócica (aproximadamente 90% de coaglutinação) sendo evidenciada sem auxílio óptico. O conjugado a 1,25% permitiu a visualização de aproximadamente 40% de coaglutinação das amostras padrões com auxílio de lupa (40X).

Verificou-se que 60 minutos de sensibilização do estafilococo com o soro de coelho à temperatura ambiente, foi a melhor condição para a evidência da reação. A sensibilização superior a 60 minutos, não intensificou a reação e não identificou suspensões de micoplasma mais diluídas.

Os conjugados coagulantes preparados nas condições descritas mantiveram-se estáveis por 30 dias a 4°C e não apresentaram reações inespecíficas. Os conjugados anti-*M. orale* e anti-*A. laidlawii* apresentaram auto-aglutinações após 30 dias de estoque. A adição de acetilcisteína à 0,3% aumentou a estabilidade dos reagentes por 90 dias¹⁵.

Após a padronização da metodologia, iniciaram-se as identificações das amostras selvagens a partir do concentrado de cultivo de 4,0 ml em caldo.

Quarenta e oito amostras de *M.pulmonis* foram identificadas do lavado traqueobrônquico de ratos e camundongos e 6 amostras de *M.arthritis* foram identificadas do lavado de ouvido de ratos (Tabela 1). Do ouvido de 4 ratos caracterizou-se a presença simultânea de *M.pulmonis* e *M.arthritis*⁶.

Os respectivos conjugados coagulantes foram portanto capazes de identificar micoplasmas de espécies diferentes contidos em 4,0 ml em cultura mista.

Três amostras de *M.orale*, 8 de *M.arginini* e 15 de *A.laidlawii* foram identificados de culturas celulares. Três amostras de *M.pneumoniae* e 8 amostras de *M.hominis* foram caracterizadas do lavado intranasal e raspado de uretra humana respectivamente (Tabela 1).

Todas as amostras selvagens de micoplasma identificadas pela reação de coaglutinação estafilocócica foram confirmadas quanto à espécie na prova de inibição de crescimento pelos soros dos coelhos. KALUZEWSKI et al. em 1979, utilizaram basicamente o lisado de micoplasmas, volumes maiores de cultura e a reação de fixação do complemento na identificação de micoplasmas revelou reações cruzadas.

A reação de coaglutinação estafilocócica na identificação dos micoplasmas envolvidos, apresentou-se

TABELA 1

Amostras de micoplasma identificadas através da Reação de Coaglutinação Estafilocócica

	MPU P 48*	MAT P 6*	MAG P 8*	MO P 3*	AL P 15*	MH P 8*	MPN P 3*
RMPU	++	—	—	—	—	—	—
RMAT	—	++	—	—	—	—	—
RMAG	—	—	++	—	—	—	—
RMO	—	—	—	++	—	—	—
RAL	—	—	—	—	++	—	—
RMH	—	—	—	—	—	++	—
RMPN	—	—	—	—	—	—	++

MPU- *M.pulmonis*; MAT- *M.arthritis*; MAG- *M.arginini*; MO- *M.orale*; AL- *A.laidlawii*; MH- *M.hominis*; MPN- *M.pneumoniae*

RMPU/RMAT/RMAG/RMO/RAL/RMH/RMPN (50 µl) : Reagentes coagulantes sensibilizados com soro de coelho contra as correspondentes espécies padrões de micoplasma (MPU/MAT/MAG/MO/AL/MH/MPN).

P - Concentrado da respectiva amostra padrão de micoplasma (50 µl) proveniente do crescimento de 4,0 ml de (10^6 células/100µl) ou 500 ml (10^9 células/ml) do respectivo caldo.

* - Número de amostras de micoplasma identificadas do concentrado de 4,0 ml (10^6 células/100 µl) do respectivo caldo, provenientes de: MPU- 31 ratos e 17 camundongos

MAT- 6 ratos

MAG, MO e AL - culturas celulares.

MH, MPN - uretra e lavado intranasal humano respectivamente.

+ Evidência de coaglutinação estafilocócica (aproximadamente 90%).

- Ausência de coaglutinação estafilocócica.

específica e foi confirmada pela inibição de crescimento. A metodologia utilizada mostrou-se rápida e de fácil execução com a utilização de aparelhos e reagentes acessíveis para laboratórios clínicos e de apoio a pesquisa não especializados.

SUMMARY

Staphylococcal coagglutination for mycoplasma identification

Staphylococcal Coagglutination was used as method for a rapid identification of mycoplasmas that could be performed by non specialized laboratories. Suspensions of *Staphylococcus aureus* (Cowan I) sensitized with rabbit antibodies against NCTC mycoplasma strains have identified these microorganisms and the strains isolated from humans, cell cultures rats and mice in concentrated suspensions from cultures of 4.0 ml. Forty eight strains of *M. pulmonis*, 6 of *M. arthritidis*, 8 of *M. arginini*, 3 of *M. orale*, 15 of *A. laidlawii*, 8 of *M. hominis* and 3 of *M. pneumoniae* were identified by staphylococcal coagglutination and confirmed by Growth Inhibition Test. Optimal parameters of coagglutination were established and the stability of the conjugates were preserved for 90 days when added with acetyl cistein. The reaction was visualized without optical resources. The sera were previously absorbed with heterologous NCTC strains and with the pellet of the steril broth.

AGRADECIMENTOS

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo. Instituto Butantan. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARILE, M.F.; BOVE, S.M.; BRADBURY, J.M.; CASSEL, G.H.; CLYDE Jr., W.A.; COTTEW, G.S. & WHITTLESTONE, P. - Current status on control of mycoplasma diseases of man, animals, plants and insects. Bull. Inst. Pasteur, 83: 3339-3373, 1985.
2. BARILE, M.F. & McGARRITY, G.J. - Isolation of mycoplasmas from cell cultures by agar culture medium techniques. In: RAZIN, S. & TULLY, J.G., ed. *Methods in mycoplasmaology*. New York, Academic Press, 1983. v.2, p.159-166.
3. BARNHAM, M. & GLYN, A.A. - Identification of clinical isolates of *N. gonorrhoeae* by coagglutination test. J.clin. Path., 31: 189-193, 1978.
4. CASSELL, G.H.; DAVIDSON, M.K.; DAVIS, J.K. & LINDSEY, J.R. - Recovery and identification of murine mycoplasmas. In: RAZIN, S. & TULLY, J.G., ed. *Methods in mycoplasmaology*. New York, Academic Press, 1983. v.2, p. 129-142.
5. CLYDE Jr., W.A. - Recovery of mycoplasmas from respiratory tract. In: RAZIN, S. & TULLY, J.G., ed. *Methods in mycoplasmaology*. New York, Academic Press, 1983. v.2, sec. A-2.
6. CLYDE Jr., W.A. - Growth inhibition test. In: RAZIN, S. & TULLY, J.G., ed. *Methods in mycoplasmaology*. New York, Academic Press, 1983. v. 1, p. 404-410.
7. CUNHA, R.A.F.; TAKIMOTO, S. & CURY, M. - *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum*: research in pregnant cervical mucus specimens. Rev. Microbiol., 19: 379-384, 1988.
8. DURIGON, E.L.; CANDEIAS, J.A.N.; JEREZ, J.A.; BITTENCOURT, M.J. & ORTOLAN, E.L. - Comparison of staphylococcal co-agglutination with other assays for rapid diagnosis of rotavirus infection in humans, calves and piglets. J.med. Virol., 35: 73-77, 1991.
9. FREUNDT, E.A. - Culture media for classic mycoplasma. In: RAZIN, S. & TULLY, J.G., ed. *Methods in mycoplasmaology*. New York, Academic Press, 1983. v. 1, p. 127-145.
10. HEBERT, J.P. & CAILLET, R. - Intéraction du groupage des streptocoques Béta-Hémolytiques par agglutination sur lame. Path. et Biol., 3-4: 205-208, 1978.
11. KALUZEWSKI, S. & JAGLIESSKI, M. - Identification of mycoplasma by slide coagglutination test with specific antibodies complexed with the staphylococcal protein A. Med. doswiad. Mikrobiol., 31: 27-37, 1979.
12. MacGARRITY, G.J.; SARAMA J. & VANAMAN, V. - Cell cultures techniques. Amer. Soc.Microbiol. News, 51: 170-183, 1985.
13. MONGENSEN, S. & DISIION, T. - Rapid detection of herpes simplex virus and varicella zoster virus in clinical specimens by use of *Staphylococcus aureus* rich in protein A. Acta pathol. microbiol. immunol. scand, sect. B Microbiol., 91: 83-88. 1983.
14. MORENO, N.E.O. - *Análise comparativa entre métodos microbiológicos, sorológicos e de hibridização de ADN, para diagnóstico de Mycoplasma pneumoniae em maiores de 14 anos*. São Paulo, 1990. (Tese de Doutorado - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.)
15. MONTASSIER, H.J.; ARAUJO Jr., J.P.; MONTASSIER, M.F.S.; TAMANINI, M.L.F.; LIMA, A.E.G. & PINTO, A.A. - Storage and durability of coagglutination conjugates for use in direct diagnostic of foot and mouth disease virus(FMDV). In: NATIONAL MEETING OF VIROLOGY. São Lourenço, MG., 1990. Abstracts. p. 100.
16. MORSY, M.A.; PANANGALA, V.S. & GRESHAM, M.M. - Identification of *Mycoplasma gallisepticum* by use of monoclonal antibody in a rapid slide coagglutination test. Amer. J. vet. Res., 52: 1602-1605, 1991.
17. RAJAGOPALAN, M.S. & JOHN, T.J. - Passive bacterial agglutination. A new sensitive technique for the detection of hepatitis B surface antigen. Indian J. med. Res., 78: 509-517, 1983.
18. ROCKHILL, R.C.; RUMANS, L.W. & LESMANA, M. - Slide coagglutination for *S.typhi* antigen in broths inoculated with feces from typhoid fever patients. Southeast Asian J. trop. Med. Publ. IIIth., 12: 528-532, 1981.

19. RODWELL, A.W. & WHITCOMB, R.F. - Method for direct and indirect measurement of mycoplasma growth. In: RAZIN, S. & TULLY, J.G., ed. *Methods in mycoplasmaology*. New York, Academic Press, 1983. v. 1, p. 185-196.
20. SENTERFIT, L.B. - Preparation of antigens and antisera. In: RAZIN, S. & TULLY, J.G., ed. *Methods in mycoplasmaology*. New York, Academic Press, 1983. v. 1, p. 401-403.
21. SUSANONG, M. & DAJANI, A.S. - Detection of *H. influenza* type B antigens in body fluid, using specific antibody coated staphylococci. *J.clin.Microbiol.*, 5: 81-85, 1977.
22. TAYLOR-ROBINSON, D. - Recovery of mycoplasmas from genitourinary tract. In: RAZIN, S. & TULLY, J.G., ed. *Methods in mycoplasmaology*. New York, Academic Press, 1983. v. 2, p. 19-26.
23. YIDA, O. - *Contribuição ao estudo do diagnóstico microbiológico da micoplasmose murina*. São Paulo, 1987. (Dissertação de Mestrado-Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo).
24. YOH, M.; HONDA, T.; MIWATANI, T.; UEMURA, T.; KUWATA, H. & FUKAI, K.A. - Staphylococcal coagglutination test for detecting and serogroups *Legionella pneumophila*. *Microbiol. Immunol.*, 29: 413-419, 1985.

Recebido para publicação em 14/04/1993
Aceito para publicação em 20/08/1993