

EFEITO DE CONCENTRAÇÕES SUBINIBITÓRIAS DE PENICILINA SOBRE ANTÍGENOS DE ESTREPTOCOCOS DO GRUPO G

Angela C. D. de CASTRO (1), Leslie C. BENCHETRIT (1) & César M. de OLIVEIRA (1)

RESUMO

O efeito de concentrações subinibitórias de penicilina sobre a produção do antígeno grupo-específico e da hialuronidase extracelular foi avaliado em uma amostra de estreptococo pertencente ao grupo G de Lancefield.

Em todas as concentrações uma maior quantidade de antígeno grupo-específico foi extraída das células e a atividade específica de hialuronidase se mostrou aumentada em até 1400% nos sobrenadantes das culturas. O maior aumento na expressão de ambos os antígenos foi observado em 1/2 da CMI.

UNITERMOS: Estreptococos grupo G — Penicilina — Antígenos estreptocócicos.

INTRODUÇÃO

Os efeitos de concentrações subinibitórias (subCMIs) de antimicrobianos são observados em vários produtos que são excretados por microrganismos. A hialuronidase extracelular de estreptococos do grupo A se mostrou quantitativamente alterada quando estes microrganismos foram expostos a concentrações subinibitórias de penicilina^{1,6,13,14}. O tratamento de estreptococos do grupo A com cloranfenicol provocou um aumento na formação da hialuronidase⁷.

Alterações a nível de antígenos de superfície foram também observadas. Cloranfenicol, eritromicina ou penicilina inibiram a produção de proteína M por estreptococos do grupo A⁷ e salmonelas tratadas com ampicilina, gentamicina, tetraciclina ou cloranfenicol apresentaram títulos aglutinantes anti-antígeno O mais elevados do que os apresentados pelas mesmas amostras não expostas aos agentes antimicrobianos¹¹. A fagocitose de *S. aureus* por leucócitos polimorfonucleares se mostrou aumentada quando estes microrganismos foram tratados com antibióticos inibidores da síntese pro-

téica¹². Aumento da fagocitose por macrófagos foi observado com estreptococos do grupo A tratados tanto com antibióticos que atuam na síntese protéica como com penicilina⁷. A aderência bacteriana também pode ser afetada por concentrações subinibitórias de agentes antimicrobianos¹⁵.

O nosso trabalho se propõe ao estudo da influência da penicilina, em subCMIs, sobre a biologia de uma amostra de estreptococos do grupo G, visto que, não encontramos na literatura estudos, com antibióticos, que envolvam este grupo de microrganismos. São avaliados os efeitos do agente antimicrobiano sobre a expressão de antígenos somático (carboidrato grupo-específico) e extracelular (hialuronidase).

MATERIAIS E MÉTODOS

AMOSTRA BACTERIANA — A amostra de estreptococo beta-hemolítico do grupo G foi isolada a partir de uma cultura proveniente de orofaringe. Foi classificada por reação de precipitação em tubo capilar⁸, na qual se utilizou

(1) Centro de Referência para Estreptococos, Instituto de Microbiologia da UFRJ. Caixa Postal 68040. CEP 21.944, Rio de Janeiro, R.J., Brasil

o extrato da cultura obtido pelo ácido nítrico⁴ e antisoros específicos para os grupos A, B, C e G de estreptococos, obtidos no próprio laboratório através de inoculação em coelhos, segundo a técnica dos Centers for Disease Control, Atlanta, GA, USA.

MEIOS DE CULTURA — Para o crescimento da amostra e determinação de carboidrato grupo-específico foi utilizado o caldo Todd-Hewitt (THB, Difco Laboratories). Para a determinação da atividade de hialuronidase usou-se o dialisado do caldo Todd-Hewitt (DTHB) preparado segundo BENCHETRIT e cols.¹ O meio Tryptose Agar Base (Difco) foi acrescido de 5% de sangue desfibrinado de carneiro para a elaboração do meio de ágar sangue.

O antibiótico utilizado foi a penicilina G potássica (potência 1580 U/mg; Indústrias Farmacêuticas Fontoura-Wyeth S/A) com a qual foi preparada uma solução (1 mg/ml) em água destilada. A solução foi esterilizada por filtração em membrana (tipo HA, Millipore Corporation) e distribuída em frascos (1ml por frasco) para estocagem a -20°C. Foi adicionada aos meios em concentrações correspondentes a 1/2, 1/4, 1/8 e 1/16 da Concentração Mínima Inibitória (CMI).

DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA — A CMI foi determinada utilizando-se o método de diluição em caldo¹⁶. O caldo usado foi o THB, sendo a CMI confirmada em DTHB. O inóculo constou de uma suspensão bacteriana oriunda de uma cultura de 24 horas, a qual foi diluída no próprio meio de trabalho de modo a conter 10 unidades (unidades Klett, UK) em fotocolorímetro Klett-Summerson equipado com filtro verde n.º 54 (aproximadamente 10⁶ unidades formadoras de colônias/ml, UFC/ml). A CMI foi considerada a menor concentração de antibiótico onde não se pode, visualmente, observar o crescimento bacteriano após incubação durante 16 horas a 37°C, em aerobiose.

PREPARO DAS CULTURAS BACTERIANAS — A amostra de microorganismo foi inoculada (aproximadamente 10⁶ UFC/ml) em 2,5 ml de THB ou DTHB contendo as subCMIs do antibiótico, bem como em tubo com meio isento da droga, perfazendo um volume total de 5 ml. Após uma incubação de 16 horas a 37°C, em aerobiose fo-

ram retiradas alíquotas para a determinação da viabilidade das culturas bacterianas. A absorvância do crescimento bacteriano foi lida em fotocolorímetro.

VIABILIDADE DAS CULTURAS BACTERIANAS — A viabilidade das culturas bacterianas, em subCMIs de penicilina e também na cultura controle, foi determinada ao término do crescimento bacteriano pela contagem das UFC/ml em placas contendo meio de ágar-sangue.

ANTÍGENO GRUPO-ESPECÍFICO — As suspensões bacterianas foram sedimentadas por centrifugação. O sedimento foi ressuspensão em 5 ml de meio e novamente foram determinadas as absorvâncias das culturas. Estas foram diluídas em caldo de modo a conterem o mesmo número de UK da cultura de menor crescimento. Destas suspensões foram retirados 5 ml, os quais foram centrifugados, sendo o sedimento utilizado para a extração do carboidrato específico pelo método do ácido nítrico⁴. Os extratos foram submetidos a diluições seriadas em água destilada pH 7,0 e testados quanto a capacidade precipitante⁸ até a diluição onde se observou ausência total de positividade de reação. A positividade foi visualizada, até 5 minutos após a realização da reação, à temperatura ambiente, pela formação de um precipitado grumoso espalhado por todo o capilar. A intensidade das reações de precipitação, variando de 1+ a 4+, foi dada pela medida da altura do precipitado após 24 horas de incubação a temperatura ambiente, por estar o precipitado, após este período, sedimentado a base do tubo capilar.

ATIVIDADE DE HIALURONIDASE NO SOBRENADANTE DAS CULTURAS BACTERIANAS — As culturas bacterianas em DTHB foram sedimentadas por centrifugação. Os sobrenadantes foram colocados para dialisar, contra 200 volumes de tampão acetato de sódio 0,02 M, pH 5,0 contendo NaCl 0,01 M, por 24 horas a 4°C com uma troca de tampão após as primeiras 18 horas de diálise. Os sobrenadantes assim tratados, foram esterilizados por filtração em membranas Millipore antes da determinação da atividade enzimática.

A medida da atividade de hialuronidase foi realizada utilizando-se o método espectrofotométrico² que se baseia na ligação de um corante do grupo das carbocianinas ao ácido hia-

urônico. Esta ligação resulta em uma mudança do comprimento de onda do máximo de absorção do corante de 500 para 640 nm³. A atividade enzimática específica é dada dividindo-se o número de unidades de enzima/ml de sobrenadante pela absorvância (UK) da cultura¹ ou pelo número de UFC/ml desta cultura.

RESULTADOS

A CMI de penicilina para a amostra estudada foi de 0,02 µg/ml.

A penicilina provocou um aumento do antígeno grupo-específico (Tabela 1). Este aumento

TABELA I

Influência da penicilina num antígeno de superfície de estreptococo do grupo G. Quantificação da reação de precipitação em tubo capilar utilizando-se o antígeno grupo específico, obtido de células crescidas na presença do antibiótico, e o antisoro específico*.

Nível de antibiótico	Intensidade da reação de precipitação nas diluições dos extratos de:					
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
Controle	1+**	—	—	—	—	—
1/8 da CMI***	2+	1+	—	—	—	—
1/4 da CMI	4+	1+	—	—	—	—
1/2 da CMI	4+	2+	1+	1+	1+	—

* Os extratos antigênicos foram obtidos por tratamento com ácido nítrico a partir de culturas bacterianas padronizadas para a mesma absorvância a 540 nm.

** 1+, altura do precipitado, até 1 mm; 2+, de 1 a 2 mm; 3+, de 2 a 3 mm; 4+, mais de 3 mm, —, ausência de reação de precipitação.

*** CMI = 0,02 µg/ml

foi revelado pela necessidade de maiores diluições dos extratos, oriundos das culturas crescidas em subCMIs, até a ausência total de reação de precipitação visível, quando estes extratos foram comparados com o da cultura controle. O antígeno grupo-específico das células crescidas na presença de 1/2 da CMI mostrou-se 16 vezes aumentado em relação ao das células da cultura não exposta ao antibiótico e 8 vezes aumentado em relação às células acrescidas em concentrações correspondentes as outras sub-CMIs.

Quando a atividade de hialuronidase foi avaliada por ml de sobrenadante, observou-se um aumento desta atividade para as culturas expostas ao antibiótico (Figura 1a). O maior aumento foi verificado para a cultura crescida

em 1/2 da CMI, correspondendo a 6,4 unidades de enzima por ml de sobrenadante. O aumento dessa atividade foi de aproximadamente 30% em relação a quantidade de enzima expressa pelas células crescidas na ausência de antibiótico. Levando-se em consideração que o agente antimicrobiano causou um decréscimo bem acentuado na população bacteriana (Figura 1c) achamos também necessário expressar a atividade de hialuronidase em termos de atividade específica. A cultura que apresentou maior atividade enzimática foi a tratada com 1/2 da CMI e este aumento correspondeu a aproximadamente 290 e 1400% em relação ao controle, quando a atividade foi relacionada a observância da cultura (Figura 1b) e ao número de UFC (Figura 1c), respectivamente. Tal como aconteceu com o crescimento bacteriano, a atividade enzimática específica quando relacionada com a absorvância da cultura, foi diminuindo a medida que a concentração de antibiótico se tornava mais baixa. Assim, em 1/4 da CMI esta

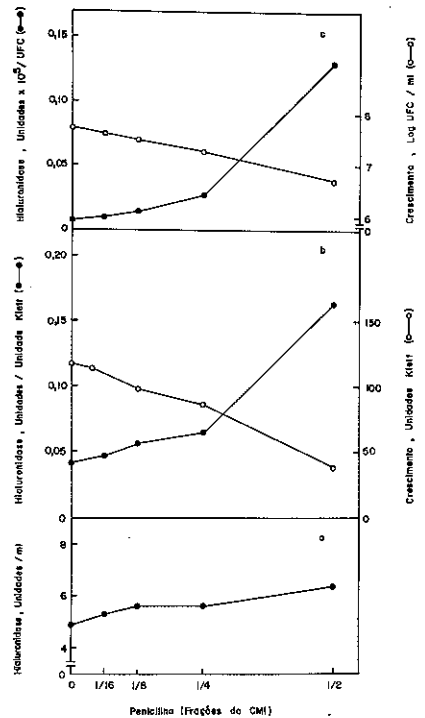


Fig. 1 — Efeito de concentrações subinibitórias de penicilina sobre a atividade de hialuronidase (●—●) e o crescimento bacteriano (○—○) de *Streptococcus* do grupo G. A atividade enzimática, por ml de sobrenadante (a) bem como a atividade enzimática específica em relação ao crescimento bacteriano determinado por medida da turbidez em fotocolorímetro (b) e por contagem do número de UFC (c) foi determinada como descrito em Materiais e Métodos CMI = 0,02 µg/ml

atividade foi de 0,065 unidade de enzima por unidade Klett (U/UK) e em 1/16 da CMI foi bem próxima da apresentada pelo controle, correspondendo a 0,047 U/UK, sendo a atividade enzimática específica da cultura controle equivalente a 0,042 U/UK.

DISCUSSÃO

O nosso teste para a verificação da presença do carboidrato C é um teste de precipitação e por isso utiliza um antígeno solúvel que é extraído da parede das bactérias. Sendo assim, não devemos atribuir o seu aumento a um desarranjo na parede celular que, porventura, possibilitasse a maior exposição dos determinantes antigênicos como as alterações causadas nos títulos aglutinantes conseguidos com o antígeno O de salmonelas crescidas na presença de antibiótico¹¹. Com estas salmonelas foi verificado que filamentos longos que possuem a mesma morfologia das células tratadas com antibióticos apresentam um aumento significativo nos títulos aglutinantes e produzem aglutinação mais floculenta do que as bactérias de morfologia normal. Estas observações nos levam a supor que o aumento da expressão antigênica em estreptococos do grupo G seja devido a uma maior produção do carboidrato C em culturas tratadas com penicilina. Ou ainda, que o tratamento com antibiótico possibilita uma maior extração do antígeno.

A hialuronidase, enzima que despolimeriza o ácido hialurônico está incluída entre os possíveis fatores de virulência produzidos por microrganismos do gênero *Streptococcus*⁵. O efeito de antibióticos sobre a hialuronidase de estreptococos foi primeiramente investigado por FABER & ROSENDAL⁶ e ROSENDAL & FABER¹³ em microrganismos pertencentes aos tipos sorológicos M4 e 24, respectivamente. A amostra do tipo M4 apresentou um aumento na atividade de hialuronidase quando crescida em subCMIs de penicilina enquanto a amostra tipo M24 apresentou um decréscimo, o qual foi atribuído a não liberação da enzima. Aumento da atividade enzimática, para amostras pertencentes aos mesmos dois tipos sorológicos foi observado em subCMIs de penicilina em um estudo posterior¹. Contrariamente aos resultados descritos anteriormente e também aos resultados do nosso estudo nenhum efeito na produção de hialuronidase foi observado em estreptococos do grupo A tratados com penicilina⁷.

No entanto o cloranfenicol foi capaz de produzir um aumento na atividade enzimática, o que reforça a observação de LORIAN¹⁰ de que efeitos de antibióticos em subCMIs são diferentes do efeito produzido pelo CMI.

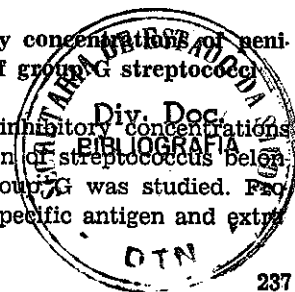
Em nosso estudo a ocorrência de lise em culturas expostas ao antibiótico não foi determinada. Várias são as hipóteses que podem ser levantadas para a explicação do aumento da atividade específica de hialuronidase. As culturas podem ter crescido e lisado, liberando assim mais enzima no sobrenadante durante o período de incubação. As células mortas nos estágios iniciais do crescimento exponencial liberariam enzima em níveis baixos, porém detectáveis, os quais somados à hialuronidase normalmente liberada pelas células viáveis aumentariam a atividade enzimática¹. No entanto, em *S. aureus* foi detectado que subCMIs de penicilina não causam a morte da célula⁹. Se levarmos em consideração que este fato ocorre também com o estreptococo estudado, outras hipóteses podem ser levantadas. Assim, as células que alcançaram o final da fase logarítmica de crescimento poderiam ter produzido e secretado enzima em níveis mais elevados¹. Também podem ter ocorrido modificações na parede celular possivelmente alterando sua permeabilidade e possibilitando uma maior liberação enzimática.

Uma observação que consideramos muito importante foi o fato que a atividade de hialuronidase medida por ml de sobrenadante não se mostrou diminuída nas concentrações subinibitórias de antibiótico. Isto significa que subCMIs de penicilina, apesar de terem causado um decréscimo na população microbiana, em nada favoreceram a diminuição de um produto elaborado pelo microrganismo, o qual possivelmente esteja envolvido com a sua patogenicidade.

SUMMARY

Effect of subinhibitory concentrations of penicillin on antigens of group G streptococci

The effect of subinhibitory concentrations of penicillin on a strain of streptococcus belonging to Lancefield group G was studied. Production of the group-specific antigen and extra



cellular hyaluronidase by drug-exposed cells were examined. At all concentrations levels a higher amount of group-specific antigen was extracted from cells and increases of up to 1400% in the specific activity of hyaluronidase were determined in culture supernates. The higher increase in the expression of both antigens was observed at 1/2 MIC.

AGRADECIMENTOS

Este estudo recebeu o auxílio da CAPES, CNPq, FINEP, CEPG da UFRJ e Fundação Universitária José Bonifácio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BENCHETRIT, L. C.; AVELINO, C. C. & OLIVEIRA, C. M. — Effect of subminimal inhibitory concentrations of penicillin on hyaluronidase production by group A streptococci. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A.*, 251: 152-156, 1981.
2. BENCHETRIT, L. C.; FAHUJA, S. L.; GRAY, E. D. & EDSTROM, R. D. — A sensitive method for the assay of hyaluronidase activity. *Analyt. Biochem.*, 79: 431-437, 1977.
3. EDSTROM, R. D. — A colorimetric method for the determination of mucopolysaccharides and other acidic polymers. *Analyt. Biochem.*, 29: 421-432, 1969.
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. FABER, V. — Streptococcal hyaluronidase. Review and the turbidimetric method for its determination. *Acta path. microbiol. scand.*, 31: 345-354, 1952.
6. FABER, V. & ROSENDAL, K. — Streptococcal hyaluronidase IV. The effect of penicillin on the production of hyaluronic acid and hyaluronidase by hemolytic streptococci (type 4, group A). *Acta. path. microbiol. scand.*, 37: 286-292, 1955.
7. FERNE, M.; RABINOWITZ, S. B.; DUCHAN, Z. & MICHEL, J. — Morphologic and enzymatic changes of beta-hemolytic group A streptococci due to subminimal

inhibitory concentrations of chloramphenicol, erythromycin and penicillin. In: HOLM, S. E. & CHRISTENSEN, P., eds. — *Basic concepts of streptococcal and streptococcal diseases*. Chertsey, England, Reedbooks, 1982. p. 148-150.

8. LANCEFIELD, R. C. — A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *J. exp. Med.*, 57: 571-595, 1933.
9. LORIAN, V. — Some effects of subinhibitory concentrations of penicillin on the structure and division of staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 7: 864-870, 1975.
10. LORIAN, V. — Effects of subminimum inhibitory concentrations of antibiotics on bacteria. In: LORIAN, V., ed. — *Antibiotics in laboratory medicine*. Baltimore, Williams & Wilkins, 1980. p. 342-408.
11. LORIAN, V. & ATKINSON, B. — Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on cross walls of cocci. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 6: 1043-1055, 1976.
12. MILATOVIC, D. — Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on the phagocytosis of *Staphylococcus aureus*. *Europ. J. clin. Microbiol.*, 1: 97-101, 1982.
13. ROSENDAL, K. & FABER, V. — Streptococcal hyaluronidase. III. The effect of penicillin on the production of hyaluronic acid and hyaluronidase by hemolytic streptococci (type 24, group A). *Acta pathol. microbiol. scand.*, 36: 263-273, 1955a.
14. ROSENDAL, K. & FABER, V. — Streptococcal hyaluronidase. V. The effect of penicillin on the production of hyaluronic acid and hyaluronidase by hemolytic streptococci (type 28, group A). *Acta pathol. microbiol. scand.*, 37: 293-299, 1955b.
15. VOSBECK, K.; METT, H.; HUBER, U.; BORN, J. & PETIGNAT, M. — Effects of low concentrations of antibiotics on *Escherichia coli* adhesion. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 21: 864-869, 1982.
16. WASHINGTON II, J. A. & BARRY, A. L. — Dilution test procedures. In: LENNETTE, E. H.; SPAULDING, E. H. & TRUANT, J. P., eds. — *Manual of clinical microbiology*. Washington, D.C., American Society for Microbiology, 1974. p. 410-417.

Recebido para publicação em 20/8/1985.