

IMPORTÂNCIA DA PESQUISA DA BETA-GALACTOSIDASE NA CARACTERIZAÇÃO LABORATORIAL DA *NEISSERIA LACTAMICA**

Ilka Maria Landgraf LEE **
Gil Vital Álvares PESSÔA **
Maria Regina Novaes Ramires ESPER **
Carmo Elias Andrade MELLES **
Vera SIMONSEN **

RIALA6/451

LEE, I.M.L.; PESSÔA, G.V.A.; ESPER, M.R.N.R.; MELLES, C.E.A. & SIMONSEN, V. — Importância da pesquisa da Beta-galactosidase na caracterização laboratorial da *Neisseria lactamica*. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 38(1):23-27, 1978.

RESUMO: Na pesquisa de portadores de *Neisseria meningitidis*, a distinção da *Neisseria lactamica* é de maior importância, pois esta apresenta um perfil antigênico semelhante ao da *Neisseria meningitidis* o que ocasiona reações cruzadas freqüentes. Em pesquisa realizada em 1.983 voluntários, foram encontradas 431 amostras de *Neisseria* que se comportaram sorologicamente como *Neisseria meningitidis*. Estas cepas foram estudadas em relação ao ataque à lactose (1% em meio C.T.A., Difco) e quanto à hidrólise do O.N.P.G. (ortho-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside) pela ação da Beta-galactosidase. Das 431 amostras, 70 foram O.N.P.G. positivas e destas apenas 42 atacaram a lactose, após 48 horas (tempo máximo de observação foi de 15 dias). O ataque da lactose revelou o encontro da *Neisseria lactamica* em apenas 60% das oportunidades e, assim mesmo, após observação por 48 horas na grande maioria dos casos. Em vista destes achados, os autores recomendam a introdução do teste da Beta-galactosidase na rotina da pesquisa de *Neisseria meningitidis* pois, além de ser um método simples e rápido, evita erros diagnósticos decorrentes de reações antigênicas cruzadas. Este fato assume maior relevância, pois esta bactéria já foi responsabilizada por um caso de meningite purulenta.

DESCRITORES: *Neisseria lactamica*, identificação; galactosidase.

INTRODUÇÃO

A pesquisa da Beta-galactosidase na rotina laboratorial foi introduzida por LÆ MINOR & BEN AMIDA¹⁰, visando a classificação dos gêneros da família *Enterobacteriaceae*. Em 1962 esses autores recomendavam o teste do O.N.P.G. (ortho-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside) para a pesquisa da Beta-galactosidase, como teste suplementar nas provas bioquímicas que indicavam o desdobramento da lactose, e

naquelas em que o desdobramento era tardio, ou seja, não se dava após uma incubação de 18 horas.

Com base nas verificações desses autores, BÜLLOW¹ desenvolveu um trabalho comparativo entre o teste do O.N.P.G., e o convencional de fermentação da lactose, em relação aos bacilos Gram-negativos, com as seguintes conclusões: o teste do O.N.P.G. é muito mais sensível que o da fermentação da lactose para a demonstração da Beta-galactosidase, por-

* Realizado na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

tanto mais freqüentemente positivo. Nos casos em que a fermentação da lactose foi positiva e o O.N.P.G. negativo, este comportamento foi devido à oxidação da lactose até ácido lactobiónico, sem desfazer a ligação Beta-galactosídeo. Conclui o autor que ambos os testes deverão ser empregados; se apenas um tiver que ser usado, que seja o do O.N.P.G.

Como foi verificado por WAKSMAN¹³ e RICKENBERG *et alii*¹², a fermentação bacteriana da lactose depende da atividade de dois sistemas geneticamente distintos: o da enzima intracelular Beta-galactosidase, que metaboliza a lactose e outros galactosídeos, e o sistema semelhante ao da enzima que controla a penetração dos galactosídeos no sítio da Beta-galactosidase — a Beta-galactosidapermease.

Portanto, a Beta-galactosidase e a Beta-galactosidapermease são controladas por dois genes diferentes. Compreende-se, assim, que bactérias potencialmente capazes de fermentar a lactose, por possuírem no interior da célula bacteriana todas as enzimas necessárias, não o fazem se forem desprovidas de permease.

Os bacteriologistas que utilizam há longo tempo, para a pesquisa da fermentação da lactose, meios de cultura de uso rotineiro, estão familiarizados com bactérias que fermentam este açúcar tardiamente.

A pesquisa da Beta-galactosidase é um método muito preciso que utiliza um substrato cromogênico incolor que, por hidrólise, libera a substância colorida. É o redívado ortho-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (O.N.P.G.) que, por ação da Beta-galactosidase, resulta no composto amarelo, ortonitrofenol^{1, 10}.

Desta maneira, usando o O.N.P.G. para demonstrar a presença da Beta-galactosidase, podemos rapidamente e, de maneira precisa, saber se a bactéria é fermentadora da lactose.

CATLIN⁴, CORBETT & CATLIN⁵, HOLLIS *et alii*⁷ e HOLLIS⁸ empregaram o teste do O.N.P.G. na identificação da *Neisseria lactamica*⁸, uma *Neisseria* antigenicamente semelhante à *Neisseria meningitidis*, mas que desdobra a lactose.

Durante a epidemia de meningite meningocócica que grassou na Grande São Paulo, de 1972 a 1976, e que se irradiou para os quatro cantos do Brasil, foram feitos vários estudos em material coletado de nasofaringe, por ocasião da pesquisa em portadores de *Neisseria meningitidis*.

Os resultados discrepantes, que se caracterizaram por dupla aglutinação, poliaglutinação, e não aglutinação, verificados no momento da realização das provas sorológicas, empregando-se anti-soros meningocócicos em 431 cepas de *Neisseria* que tinham o perfil bioquímico de *Neisseria meningitidis*, levaram-nos a introduzir o teste do O.N.P.G. na rotina.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizadas 1.983 coletas em nasofaringe de voluntários, sendo que 358 coletas foram de crianças do grupo etário de 8 a 16 anos. O material foi obtido mediante o emprego de zaragatoas, cujo algodão estava impregnado com carvão ativado, e em seguida semeado em placas de Petri com ágar Mueller-Hinton (MH) com Vancomicina, Colistina e Nistatina (V.C.N.). As placas assim semeadas foram incubadas em ambiente de 5-10% de CO₂ (lata com tampa bem vedada, tendo uma vela acesa e algodão embebido com água, dentro de um béquer) e mantidas em estufa a 36°C durante 24/48 horas.

De acordo com o crescimento, de cada placa foram estudadas 10 colônias, com relação à presença de oxidase. Nesta pesquisa, impregnou-se um pedaço de papel de filtro depositado em uma placa de Petri com o reativo hidrocloreto de tetrametilparafenilenodiamina, em solução aquosa a 1%, conservada a -0°C. Parte de uma colônia foi retirada com uma alça de platina e esfregada sobre o papel embebido com o reativo. Cada colônia que apresentava cor roxa, indicativa da presença de oxidase, foi semeada em uma parte da placa de Petri com ágar MH, dividida em 10 partes, como fatias de um bolo. Após 24 horas de incubação nas condições acima citadas, foi realizado o exame bacterioscópico, empregando-se o método de coloração de Gram modificado por Hucker. Das colônias que, pelo método de Gram, revelaram morfologia de diplococos Gram-negativos, fizeram-se repiques para tubos com ágar-sangue MH e para série bioquímica diferencial. Para esta rotina, na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, utiliza-se a base C.T.A. (Cystine Trypticase Ágar) distribuída em 2 ml por tubo, à qual se acrescentam, asepticamente, soluções de glicose, maltose e lactose, esterilizadas por filtração em Millipore, na concentração final de 1%.

Os tubos de C.T.A., contendo lactose, nos quais a acidificação do meio não era visível após 24/48 horas, continuaram a ser observados diariamente até 15 dias.

* De procedência Difco.

Das amostras crescidas após 24 horas em ágar-sangue MH foi realizada a soroaglutinação com anti-soros meningocócicos dos sorogrupos A, B, C, D, X, Y, Z, empregando-se a caixa de Huddleson. Os soros A, B, C e Y foram preparados por um de nós (C.E.A.M.), na Seção, e os outros foram adquiridos de fontes comerciais.

Para o teste do O.N.P.G., foi preparada uma suspensão espessa da bactéria em 0,2 ml de solução salina fisiológica estéril, em tubo de 12X120 mm, ao qual foi adicionado um disco de papel de filtro embebido com o reativo de O.N.P.G. *.

RESULTADOS

Da nasofaringe de 1.983 voluntários, foram colhidas 431 amostras de *Neisseria* sp. Destas amostras estudadas, 361 eram realmente de *N. meningitidis*, sendo que 70, ou 16% do total, eram de *N. lactamica*. Destas, 42 amostras desdobraram a lactose em 48 horas, enquanto que 28 apenas hidrolisaram o O.N.P.G. (tabela 1).

O resultado das reações de aglutinação com anti-soros meningocócicos está exposto nas tabelas 2 e 3.

No estudo da prevalência das cepas O.N.P.G. positivo, foi subdividido o grupo de portadores com relação à faixa etária, ou seja, o grupo das crianças e o dos adultos, conforme observamos na tabela 4.

TABELA 1

Comportamento de cepas de Neisseria lactamica em relação ao ataque da lactose e à hidrólise do O.N.P.G.

Cepas				
Lactose positiva		Lactose negativa O.N.P.G. positiva		Total
n.º	%	n.º	%	
42	60	28	40	70

TABELA 2

Reações antigênicas cruzadas de cepas de Neisseria lactamica lactose negativa com anti-soros meningocócicos

<i>Neisseria lactamica</i>		Tipos de aglutinação
Cepas		
n.º	%	
13	46,4	A e C
9	32,1	PA
4	14,2	AA
1	3,5	B e C
1	3,5	B
28	—	—

PA = poliaglutinação
 AA = autoaglutinação

TABELA 3

Reações antigênicas de cepas de Neisseria lactamica com anti-soros meningocócicos

<i>Neisseria lactamica</i>		Anti-soros meningocócicos							Solução salina
Cepas		A	B	C	D	X	Y	Z	Controle
n.º	%								
27	38,6	+	—	+	—	—	—	—	—
12	17,1	+	+	+	—	—	+	—	—
12	17,1	+	+	+	+	+	+	+	+
10	14,2	+	—	—	—	—	—	—	—
4	5,7	—	—	—	—	—	—	—	—
2	2,8	—	+	—	—	—	—	—	—
2	2,8	+	+	—	—	—	—	—	—
1	1,4	—	+	+	—	—	—	—	—
70									

+ = positiva
 — = negativa

TABELA 4

Prevalência de cepas de *Neisseria lactamica*
O.N.P.G. positivo em crianças e adultos

Portadores		Cepas O.N.P.G. positivo
Crianças	358	18 (5,8%)
Adultos	1.625	52 (3,2%)
Total	1.983	70 (3,5%)

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Na tabela 1 verificamos que 28 cepas (40%) das *N. lactamica* isoladas não fermentaram a lactose e, destas, 24 apresentaram reações cruzadas com anti-soros de *N. meningitidis* e 4 foram auto-aglutinantes, como podemos observar na tabela 2.

EDBERG⁶ refere que esta espécie é a única do gênero a hidrolisar o O.N.P.G. e que a percentagem de portadores na população civil em geral é de 2%, enquanto que de *N. meningitidis* é de 1,5%; em crianças, a percentagem aumenta para 14,3% e 8,6%, respectivamente para a *N. lactamica* e *N. meningitidis*.

Com relação ao grupo das crianças, a incidência da *N. lactamica* referida por EDBERG⁶ é bem mais elevada do que a obtida por nós, como se pode observar na tabela 4.

Na pesquisa do O.N.P.G., autores como LE MINOR & BEN HAMIDA¹⁰ preconizam a adição do tolueno para favorecer a liberação da enzima Beta-galactosidase. Esta etapa foi no entanto eliminada por ter sido observado que esta enzima, em particular no caso da *N. lactamica*, era lábil a qualquer agente removedor da barreira à permeabilidade da parede celular da bactéria⁶. Também BÜLOW² em um estudo comparativo com outras bactérias, sobre emprego do tolueno na reação do O.N.P.G., verificou que sua adição não interferia significativamente no produto final da reação.

O fato de a *N. lactamica* apresentar sorologicamente semelhanças com a *N. meningitidis*, como havia sido observado por MITCHELL *et alii*¹¹, por EDBERG⁶ e também por nós neste trabalho (tabelas 2 e 3), reforça o valor da pesquisa do O.N.P.G. na identificação das espécies do gênero *Neisseria*, acrescido ainda de que a *N. lactamica* foi responsabilizada por um caso de meningite purulenta, segundo LAUER & FISCHER⁹.

RIALA6/451

LEE, I.M.L.; PESSÓA, G.V.A.; ESPER, M.R.N.R.; MELLES, C.E.A. & SIMONSEN, V. — On the importance of testing for Beta-galactosidase in the laboratory identification of *Neisseria lactamica*. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 38(1):23-27, 1978.

SUMMARY: During meningococcal-carrier surveys from the naso-pharynx, detection of *Neisseria lactamica* is most important because its serologic similarities to *Neisseria meningitidis* result in frequent cross-reactions with standard *N. meningitidis* antiserum. In a search for carriers among 1983 subjects, it was found that 431 of the *Neisseria* strains resembled serologically *N. meningitidis*. These 431 strains were tested regarding lactose fermentation (1% in Difco C.T.A. medium) and ortho-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside hydrolysis by the B-galactosidase. Of these strains, 70 were found to be O.N.P.G. positive and from these, only 42 showed to be lactose utilizing strains, after 48 hours of incubation (maximum time was 15 days). Lactose splitting revealed the finding of *N. lactamica* in 60% of the samples tested and this occurred after a 48 hour observation. It is recommended that the B-galactosidase test be introduced in the routine search for *N. meningitidis*, more so if it is a simple and rapid method which avoids diagnostic errors resulting from cross antigenic reactions.

DESCRIPTORS: *Neisseria lactamica*, identification; galactosidase.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BÜLOW, P. — The ONPG test in diagnostic bacteriology. 1. Methodological investigations. *Acta path. microbiol. scand.*, 60: 376-386, 1964.
- BÜLOW, P. — The ONPG test in diagnostic bacteriology. 2. Comparison of the ONPG test and the conventional lactose-fermentation test. *Acta path. microbiol. scand.*, 60: 387-402, 1964.

3. CATLIN, B.W. — Report (1966-1970) of the Subcommittee on the Taxonomy of the *Neisseriaceae* to the International Committee on Nomenclature of Bacteria. *Int. J. Syst. Bact.*, 21: 154-5, 1971.
4. CATLIN, B.W. — Nutritional profiles of *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica* in chemically defined media and the use of growth requirements for gonococcal typing. *J. infect. Dis.*, 128: 178-94, 1973.
5. CORBETT, W.P. & CATLIN, B.W. — Galactosidase — activity of lactose-positive *Neisseria*. *J. Bact.*, 95: 52-7, 1968.
6. EDBERG, S.C. — The growth of *Neisseria lactamica* on media selective for pathogenic *Neisseriaceae*. *Amer. J. clin. path.*, 62: 445, 1974.
7. HOLLIS, D.G.; WIGGINS, G.L. & WEAVER, R.F. — *Neisseria lactamica*, sp. n., a lactose fermenting species resembling *Neisseria meningitidis*. *Appl. Microbiol.*, 17: 71-7, 1969.
8. HOLLIS, D.G. — Sources of *Neisseria lactamica*. *Lancet* 1(7810): 1010, 1973.
9. LAUER, B.A. & FISCHER, C.E. — *Neisseria lactamica meningitidis*. *Amer. J. Dis. Child.*, 130: 198-9, 1976.
10. LE MINOR, L. & BEN HAMIDA, F. — Avantages de la recherche de la β -galactosidase sur celle de la fermentation du lactose en milieu complexe dans de diagnostic bactériologique, en particulier des *Enterobacteriaceae*. *Ann. Inst. Pasteur*, 102: 267-77, 1962.
11. MITCHELL, M.S.; RHODEN, D. & KING, E.O. — Lactose-fermenting organisms resembling *Neisseria meningitidis*. *J. Bact.*, 90: 560, 1965.
12. RICKENBERG, H.V.; COHEN, C.N.; BUTTIN, G. & MONOD, J. apud BÜLOW, P.¹ .
13. WAKSMAN, S.A. apud LE MINOR, L. & BEN HAMIDA, F.¹⁰ .

Recebido para publicação em 14 de setembro de 1977.

