

EFEITO DO GLICEROL E DO TELURITO DE POTÁSSIO SOBRE OS GRÂNULOS METACROMÁTICOS E A MORFOLOGIA DO BACILO DIFTÉRICO (*)

João F. Valeiro ** Italo Suassuna *** Carlos E. V. Serpa ***

Após ter-se salientado a importância da preservação da morfologia convencional do bacilo diftérico, para os propósitos do diagnóstico presuntivo de difteria, faz-se um estudo comparativo dos aspectos morfológicos de 10 amostras de Corynebacterium em quatro meios de uso mais comum para o isolamento desses germes, modificando esses mesmos meios, em cada caso, pela inclusão de glicerol, de telurito de potássio e de glicerol e telurito, em comparação com a fórmula original. Descreve-se uma técnica simples para a incorporação do telurito de potássio nos meios preparados por coagulação de proteínas animais (Loeffler e Pai). A apreciação da morfologia e da evidênciação de grânulos de volutina destacam o meio de Pai, com cerca de 7 por cento de glicerol, entre 16 variações de meios de cultura estudadas, como o mais favorável para a demonstração da morfologia considerada típica no diagnóstico do bacilo diftérico.

A demonstração da capacidade do bacilo diftérico para crescer em meios de cultura contendo telurito de potássio, com a conseqüente redução do sal, provocando o enegrecimento da colônia e o seu fácil reconhecimento, parece remontar ao início do século (10). Ao mesmo tempo havendo a inibição do crescimento de numerosos representantes da microbiota associada ao bacilo diftérico nos locais de onde são isolados, o processo ganhou vasta aceitação, sendo hoje de indicação geral para esse propósito (1, 2, 4, 5, 7).

É reconhecido, todavia, que a maioria desses meios, à base de agar nutritivo, adi-

cionado de sangue ou soro, embora facilitando e dando segurança ao reconhecimento do bacilo diftérico, retardam o seu diagnóstico (15) e não lhe preservam a morfologia habitual, imprescindível ao diagnóstico de possibilidade (1) que autoriza o início do tratamento, diante de tão grave infecção. Tem-se mostrado, de fato, que a morfologia e as características de crescimento podem ser profundamente influenciadas pelos componentes do meio (1, 8, 17).

Por outro lado, meios como o de Loeffler e mais recentemente o de Pai (13) — aquele, o meio clássico para o isolamento

(*) Trabalho do Serviço de Microbiologia e Imunologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado da Guanabara. Com ajuda financeira do Conselho Nacional de Pesquisas.

(**) Bolsista do Conselho Nacional de Pesquisas.

(***) Da Faculdade de Ciências Médicas, U.E.G. e Instituto de Microbiologia da U.F.R.J. Guanabara.

do bacilo de Klebs-Loeffler (1, 3, 4, 7), constituído de sôro animal coagulado; e o outro, composto de ôvo coagulado (3, 5, 7) — têm sido os meios por excelência para o diagnóstico presuntivo, por preservarem a morfologia convencionalmente considerada típica para essa finalidade e semelhante à que se encontra nas lesões diftéricas. Como se sabe, considerada essa morfologia, um dos aspectos de maior destaque tem sido a evidenciação de granulações metacromáticas de volutina (grânulos de Babes-Ernst) (1, 3, 6).

Em 1951 Bretz & Frobisher (3) descreveram a experiência do primeiro, realizada em Petrópolis, Estado do Rio de Janeiro, onde, obrigado pela urgência de uma certa ocasião, utilizou o meio de Petragnani (excluído o corante) com resultados aparentemente superiores ao meio de Loeffler, devido aos grânulos de volutina aparecerem "extremamente numerosos, grandes e nítidos". As experiências posteriores relatadas pelos autores demonstraram que êsse efeito era devido à presença de glicerol no meio de Petragnani, passando os mesmos a adotar o meio de Pai, adicionado de 8% de glicerol como processo de rotina. Alguns anos antes, Laybourn (11) modificara o meio de Loeffler, adicionando, entre outros ingredientes, 4 por cento de glicerol, em substituição à glicose, por ter verificado um efeito benéfico da alcalinização sobre a morfologia e viabilidade dos bacilos diftéricos, sendo muito discreta a acidificação proveniente da utilização do glicerol.

O presente trabalho descreve a adição de telurito de potássio aos meios de Loeffler e de Pai e, ainda, a dois outros meios de uso geral, solidificados com agar, e descreve o efeito desta adição, bem como da incorporação de 8 por cento de glicerol sobre a morfologia e a evidenciação dos grânulos metacromáticos do *Corynebacterium diphtheriae*.

MATERIAL E MÉTODOS

Meios de cultura — Quatro meios básicos, habituais para o isolamento do *C. diphtheriae*, foram utilizados de acôrdo com as seguintes fórmulas:

I. Meio de Pai (7)

Ovos de galinha	5
Solução salina a 0,85%	100 ml

Abrir os ovos em condições de assepsia, homogeneizar a clara e a gema em balão estéril com pérolas de vidro. Juntar a solução salina. Distribuir assépticamente volumes de 6 ml em tubos 18 x 160 mm, com rôlha de rosca e coagular em vapor d'água a 80-85° C, durante 1 hora.

II. Meio de Loeffler (4)

Caldo glicosado	75 ml
Sôro estéril normal de cavalo....	225 ml

A técnica da distribuição e coagulação obedeceram as mesmas normas que para o meio de Pai. O caldo glicosado correspondeu à seguinte composição:

Extrato de carne (Difco)	3 g
Proteose-peptona (Difco)	10 g
NaCl	5 g
Glicose	10 g
Água destilada	1000 ml

III. Agar-sôro

Agar-simples	390 ml
Mistura de sôro humano estéril..	15 ml

Juntar o sôro estéril ao agar simples fundido e resfriado a 45-50°C, e distribuir em placas de Petri.

O agar simples utilizado possuía a composição:

Peptona bacteriológica "Geyer"*	20 g
Extrato de carne (Difco)	3 g
NaCl	5 g
Água destilada	1000 ml
pH 7.4	

IV. Agar-"chocolate"

Agar-proteose n.º 3-glicosado ..	300 ml
Agar-sangue humano (de banco de sangue)	21 ml

(*) Laboratório «Geyer» S. S., Rua Pelotas 320,

Pôrto Alegre, R. G. do Sul.

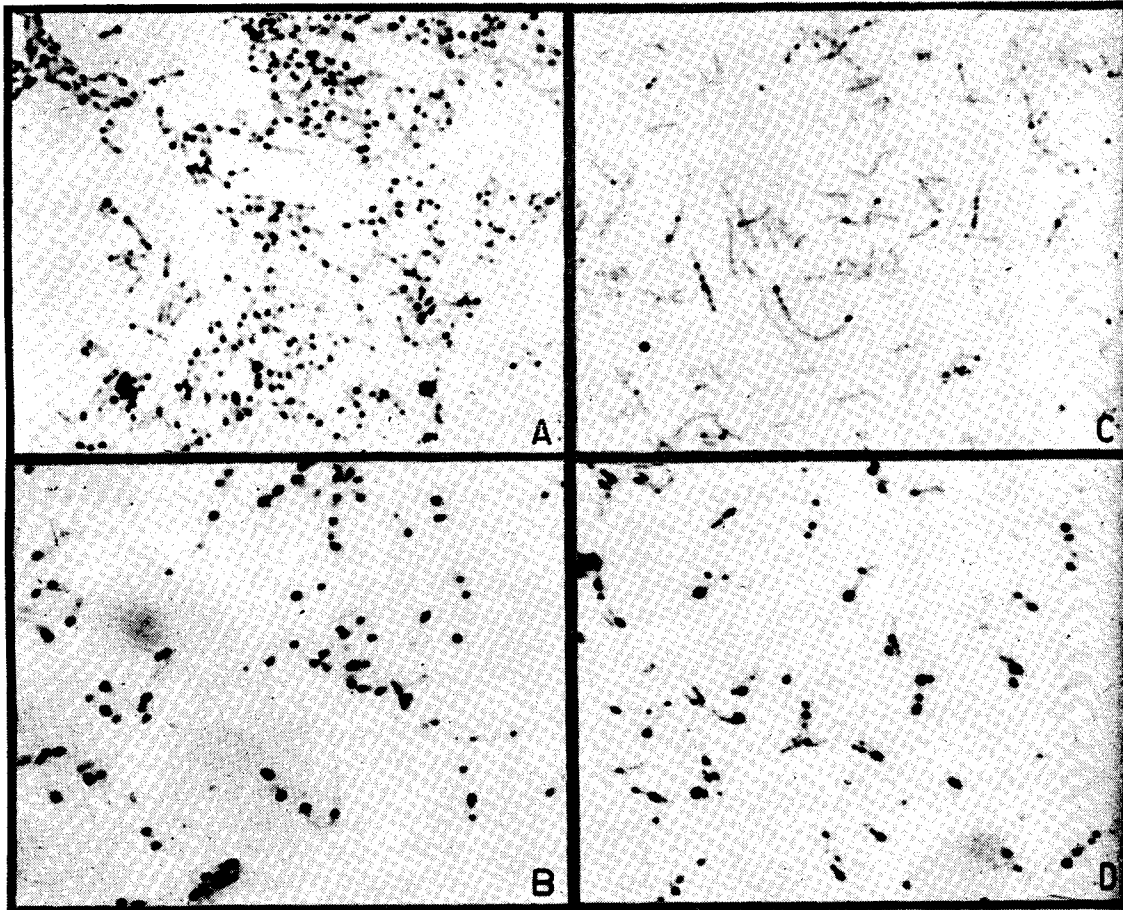


Fig. 1 — Variações da morfologia e riqueza relativa em granulações metaeromáticas do *C. diphtheriae*. A — meio de Pai; B — meio de Pai glicerol; C — Agar-sôro; D — Agar-sôro e glicerol. Coloração de Albert-Laybourn em culturas de 48 horas.

- 1 + — menos de 10% de bacilos com granulações
- 2 + — de 10-50% de bacilos com granulações
- 3 + — entre 50-90% de bacilos com granulações
- 4 + — todos os bacilos com granulações e estas eram mais abundantes.
- 5 + — todos os bacilos com numerosas granulações, estas destacando-se mais nitidamente (maiores e mais intensamente coradas).

Considerou-se assim, nas leituras efetuadas, a percentagem aproximada de corpos bacilares apresentando granulações nos campos microscópicos mais propícios à enumeração, sendo que nas notações de 4 a 5 cruzes, foram tomadas em maior conta outras características, como a presença de um maior número de grânulos nas células individualizadas e a sua mais fácil visualização.

No Quadro II estão apresentados os resultados desse modo observados. Todas as amostras revelaram granulações nos meios de Pai, Loeffler e Agar-sôro, e em suas modificações, tendo sido obtidos resultados inferiores no agar-“chocolate”, principalmente quando adicionado de telurito. No entanto, em todos os casos, os melho-

res resultados foram alcançados no meio de Pai-glicerol, excetuando-se a amostra Cb 29 de *C. pseudodiphtheriticum*, que justamente neste meio apresentou ausência de granulações. Esta amostra bem como uma das variantes do bacilo diftérico também designada como *Corynebacterium ulcerans* (9) demonstraram resultados (Cb 79) irregulares igualmente em relação aos demais meios, quando confrontadas com as outras amostras examinadas.

Em relação à morfologia celular foram observados os seguintes resultados: no meio de Pai os bacilos apresentaram-se típicos, considerando-se como tal, formas bacilares irregulares, pleomórficas, com extremidades dilatadas, além de outras características distintivas dos bacilos diftéricos (Fig. 1). Resultados semelhantes, embora com os bacilos apresentando-se menores, foram encontrados nos meios derivados do Loeffler. No agar sôro e no agar “chocolate” foram observadas características típicas, no sentido de que no primeiro os bacilos mostravam-se longos e com aspecto filamentosos, ao passo que no agar “chocolate” os bacilos mostravam-se pouco pleomórficos e muito pequenos.

DISCUSSÃO

Os resultados presentes não só confirmam os achados de Bretz & Frobisher (3) como ampliam suas observações sobre a

Q U A D R O I

PROVENIÊNCIA DAS AMOSTRAS DE *CORYNEBACTERIUM* ESTUDADAS

REFERÊNCIA	ESPÉCIE	ORIGEM
Cb 101	<i>C. diphtheriae</i> (mitis)	A.T.C.C. 11051 *
Cb 107	<i>C. diphtheriae</i> (<i>C. ulcerans</i>)	A.T.C.C. 9015
Cb 75	<i>C. diphtheriae</i> (mitis)	C.D.C. (J. H. Schubert) **
Cb 76	<i>C. diphtheriae</i> (intermedium)	C.D.C. (J. H. Schubert)
Cb 78	<i>C. diphtheriae</i> (gravis)	C.D.C. (J. H. Schubert)
Cb 79	<i>C. diphtheriae</i> (<i>C. ulcerans</i>)	C.D.C. (J. H. Schubert)
Cb 11	<i>C. diphtheriae</i>	Identificada no Serviço
Cb 24	<i>C. diphtheriae</i>	Identificada no Serviço
Cb 14	<i>C. diphtheriae</i>	Identificada no Serviço
Cb 29	<i>C. pseudodiphtheriticum</i>	Identificada no Serviço

* American Type Culture Collection.

** Communicable Disease Center, U.S. Public Health Service.

Q U A D R O I I

EVIDENCIAÇÃO DE GRANULAÇÕES METACROMÁTICAS DE *CORYNEBACTERIUM* EM 16 VARIAÇÕES DE MEIOS DE CULTURA.

AMOSTRAS	PAI				LOEFFLER				AGAR-SÓRO				AGAR-CHOCOLATE			
	SEM ADIÇÃO.	GLI.	TEL.	GLI-TEL.	SEM ADIÇÃO.	GLI.	TEL.	GLI-TEL.	SEM ADIÇÃO.	GLI.	TEL.	GLI-TEL.	SEM ADIÇÃO.	GLI.	TEL.	GLI-TEL.
<i>C. DIPHTHERIAE</i>																
Cb 75																
Cb 11	4+	5+	3+	4+	4+	5+	4+	5+	3+	5+	3+	4+	3+	4+	1+	2+
Cb 24	4+	5+	4+	4+	4+	5+	4+	5+	3+	4+	3+	4+	2+	3+	0	1+
Cb 101	4+	5+	4+	4+	4+	5+	4+	5+	3+	5+	3+	4+	3+	3+	0	0
Cb 14	2+	5+	1+	5+	3+	5+	3+	5+	2+	5+	2+	5+	2+	4+	1+	0
Cb 76	2+	5+	3+	4+	2+	5+	3+	4+	2+	5+	2+	3+	2+	3+	0	0
Cb 78	3+	5+	3+	5+	3+	5+	3+	5+	2+	5+	1+	3+	0	1+	0	0
Cb 107	3+	5+	3+	4+	3+	5+	3+	5+	3+	4+	0	3+	1+	3+	0	1+
Cb 79	2+	4+	1+	1+	3+	4+	2+	4+	2+	3+	1+	3+	1+	3+	0	0
	0	1+	0	0	0	1+	0	2+	1+	3+	0	2+	1+	4+	2+	0
<i>C. PSEUDODIPHTE- RITICUM</i>																
Cb 29	1+	0	2+	3+	1+	1+	1+	1+	2+	4+	0	1+	2+	3+	0	1+

GLI = glicerol (6,6 a 7,4%); TEL = telurito (0,033 a 0,036%); TEL-GLI = telurito + glicerol
0 = ausência de granulações; 1+ a 5+, riqueza relativa em granulações.

utilidade do glicerol incorporado aos meios de cultura para evidenciar as granulações metacromáticas de volutina. Como demonstrado pelas leituras efetuadas (Quadro II) o meio que proporcionou os melhores resultados foi o meio de Pai enriquecido com glicerol. Ressalte-se todavia que nos demais meios empregados, se bem que resultados menos expressivos tenham sido obtidos, observou-se o mesmo efeito do glicerol na facilitação do aparecimento dos grânulos metacromáticos (Fig. 1). A adição do glicerol ao meio de Loeffler proporcionou resultados análogos aos obtidos no relativo ao meio de Pai, mas as formas bacilares revelaram maior alteração do aspecto convencional. O papel relevante do glicerol pode ser bem evidenciado quando analisados os resultados obtidos com a amostra Cb 79 (*C. ulcerans*) nas quatro modificações do meio de Pai, visto que somente puderam ser observados grânulos de volutina no meio Pai-glicerol. Tal estímulo ao aparecimento de granulações metacromáticas sugere a possibilidade de maior número de resultados falso-positivos nos diagnósticos de probabilidades (1) de difteria, quando considerado o exame microscópico dos plantios primários em Pai-glicerol, se bem que a única excessão ao comportamento corresponda à amostra Cb 29 (*C. pseudodiphtheriticum*), um difteróide, a qual não apresentou granulações justamente nesse meio. Todas as outras amostras utilizadas foram amostras do tipo *C. diphtheriae* ou amostras virulentas isoladas de pacientes, em cada caso tendo sido comprovada a sua toxigenicidade *in vitro* (12).

Do ponto de vista da fisiologia da produção de grânulos metacromáticos de polimetáfosfatos, um papel relevante da limitação da fonte de nitrogênio nos culti-

vos bacterianos foi demonstrado por Smith, Wilkinson & Duguid (16) podendo verificar-se também um estímulo acentuado da produção dessas inclusões pelo desenvolvimento de um pH ácido nos meios de cultura com suprimento adequado de carboidratos como fonte de energia (6). Em igualdade de condições, outras fontes de energia que desenvolvem menor acidificação, como lactato, piruvato e glicerofosfato embora metabòlicamente adequadas como fonte de energia, não foram tão eficientes no estímulo ao depósito de polimetáfosfatos (6). Diante dos resultados que obtivemos parece que o desequilíbrio relativo entre a abundância do glicerol como fonte de energia, e o suprimento habitual de produtos nitrogenados seja o item que justifica de modo imediato o efeito observado. Há alguns anos, Laybourn (11) justamente advogou a incorporação do glicerol no meio de Loeffler pela menor acidez que resulta de sua utilização pelo bacilo diftérico. Nesse caso cabe a especulação sobre se resultados iguais, ou mesmo superiores, não seriam obtidos com a adição de concentrações elevadas de glicose ou outro carboidrato utilizável.

Um outro aspecto importante que se deriva dos presentes resultados foi a verificação de que nos meios mais propícios à demonstração de grânulos metacromáticos, como por exemplo o meio de Pai (Fig. 1) e o de Loeffler, a inclusão do telurito não alterou substancialmente a evidenciação dessas mesmas granulações, pouco modificando a morfologia convencional dos bacilos diftéricos. Comprovando a excelência do meio de Pai como o de mais fácil elaboração e o mais beneficiado pela incorporação do glicerol acrescenta-se a possibilidade de fazê-lo seletivo pela inclusão do telurito de potássio.

S U M M A R Y

Due to the importance of an undisturbed conventional morphology of diphtheria bacilli for the rapid tentative diagnostic of the infection, a comparative morphologic study of 10 strains of Corynebacterium was done by cultivating them in 16 modifications of four routine media for isolation of diphtheria bacilli. The four basic media corresponded to Loeffler's and Pai's media, human serum-agar and chocolate-agar (from human blood), to which

approximately 7.0 per cent glycerol, 0.04 per cent potassium tellurite, or both glycerol and tellurite, were added. A simple method for adding potassium tellurite to the coagulated serum (Loeffler) and egg (Pai) media was developed. From the results obtained Pai's medium seemed most adequate to maintain the typical conventional morphology of diphtheria bacilli. Notwithstanding some strain variations, a large enhancement of production of metachromatic granules was shown addition of approximately 7 percent glycerol in all media, with no substantial interference of potassium tellurite in the best suited media in this regard.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — ASSIS, A. de — Notas sobre a bacteriologia da diphtheria. Fôlha Med. (Rio de Janeiro), 18: 304-312, 1937.
- 2 — BIER, O. — Bacteriologia e Imunologia. 13.º Ed. São Paulo, Edições Melhoramentos. 991 p.
- 3 — BRETZ, G. B. & M. FROBISHER JR. — Enrichment of Loeffler's medium with glycerol. Commun. Dis. Cent. Bul., 10: 11-13, 1951.
- 4 — BURNETT, G. W., M. PELCZAR JR. & H. J. CONN — Preparation of media, p. 37-63. In Manual of Microbiological Methods. Society of merican Bacteriologists New York, McGraw-Hill Book Co. 1957.
- 5 — COMMUNICABLE DISEASE CENTER, LABORATORY BRANCH — Laboratory Methods in the Diagnosis Atlanta, Dep. H.E.W., Public Health Service (mimeografiado) 1959.
- 6 — DUGUID, J.P., I.W. SMITH & J.F. WILKINSON — Volutin production in *Bacterium aerogenes* due to development of an acid reaction. J. Pathol Bacteriol. 67: 289-300, 1954.
- 7 — FROBISHER, JR., M. — Fundamentals of Microbiology. 5th. Ed. Philadelphia & London, W.B. Saunders Co. 633 p., 1953.
- 8 — FROBISHER, JR., M., E. O. KING & E. I. PARSONS — A test *in vitro* for virulence of *Corynebacterium diphtheriae*: Amer. J. Clin. Pathol. 21: 282-285, 1951.
- 9 — HERMANN, G. J. & E.I. PARSONS — Recognition of *C. diphtheriae*-like corynebacteria (*Corynebacterium ulcerans*) in the laboratory. Publ. Hlth. Lab. 15: 34-38, 1957.
- 10 — KLETT, A. — Zur Kenntniss der reducirenden Eigenschaften der Bakterien. Zeits. Hyg. 33: 137-160, 1900.
- 11 — LAYBOURN, R.L. — Culture media used for routine diphtheria cultures with a suggested modification of Loeffler's blood serum medium Amer. J. Publ. Hlth. 25: 796-803, 1935.
- 12 — OUCHTERLONY, O. — An *in vitro* test of the toxin-producing capacity of *Corynebacteriu diphtheriae*. Lancet, i: 346-353, 1949.
- 13 — PAI, S-en. — A simple egg medium for the cultivation of *Bacillus diphtheriae*. Chinese Med. J. 46: 1203 (citado por Bretz & Frobisher, 1951).
- 14 — PARSONS, E.I., M. FROBISHER, M. MOORE & M.A. AIKEN — Rapid virulence test in diagnosis of diphtheria. Proc. Soc. Explt. Biol. Med. 88: 368-370, 1955.
- 15 — PESTANA, B.R. & M.F.Q. FERREIRA — Diagnóstico bacteriológico da difteria por métodos rápidos. Ann. Paulista. Med. Cir. 38: 393-399, 1939.
- 16 — SMITH, I.W., J.F. WILKINSON & J.P. DUGUID — Volutin production in *Aerobacter aerogenes* due to nutrient imbalance. J. Bacteriol. 68: 450-463, 1954.
- 17 — WELSCH, M. & J. THIBAUT — De l'influence de divers facteurs sur la valeur du milieu G.C.T. pour l'identification du bacille de Loeffler. C.R. Soc. Biol. 142: 556-558, 1948.