

FERMENTAÇÃO DA SACAROSE E TOXIGENICIDADE DE CEPAS DE *CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE* ISOLADAS EM SÃO PAULO *

Mathilde RASKIN **
Gil Vital Álvares PESSÓA **
Chifume Takeuchi CALZADA **
Ilka Maria Landgraf LEE **
Carmo Elias Andrade MELLES **
Elena Emiko SAKATA **

RIALA6/452

RASKIN, M.; PESSÓA, G.V.A.; CALZADA, C.T.; LEE, I.M.L.; MELLES, C.E.A. & SAKATA, E.E. — Fermentação da sacarose e toxigenicidade de cepas de *Corynebacterium diphtheriae* isoladas em São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 38(1):29-32, 1978.

RESUMO: As propriedades fermentativas do *Corynebacterium diphtheriae*, com relação à sacarose, foram estudadas em 224 cepas e, destas, 134 foram capazes de fermentar este sacarídeo, correspondendo a uma percentagem de 59,8%. Empregando a técnica de Elek (1949), as cepas de *C. diphtheriae* foram testadas quanto à toxigenicidade. O estudo comparativo entre a propriedade de fermentar a sacarose e a capacidade de produção de toxina, comprovadas pelo teste de Elek, demonstrou que o número de cepas toxigênicas e desdobladoras da sacarose — 106, ou seja 58,89% — era maior do que o das cepas toxigênicas não fermentadoras — 74, ou seja, 41,11%. Em vista do comportamento do *C. diphtheriae* em relação à sacarose, parece-nos imprescindível a reavaliação dos critérios taxonômicos vigentes.

DESCRIPTORIOS: *Corynebacterium diphtheriae*, toxigenicidade; sacarose, fermentação.

INTRODUÇÃO

Até a 6.^a edição do Manual de Bergey constava a informação de que as cepas típicas de *Corynebacterium diphtheriae* produziam reação ácida na glicose e maltose, porém jamais na sacarose. No entanto, na 7.^a edição do referido Manual⁸ foi acrescentado o informe de que raras cepas do *C. diphtheriae* fermentam a sacarose. Em verdade, FROBISHER⁹ e MAUSS & KEOWN⁹ já haviam verificado a existência de amostras da *C. diphtheriae* fermentadoras da sacarose e, em consequência, recomendavam a execução da prova

de virulência independentemente da fermentação da sacarose.

CRISTOVÃO^{4, 5}, em um estudo extenso, verificou que em 196 cepas virulentas de *C. diphtheriae* 54 fermentaram este dissacarídeo, correspondendo a 28% das amostras. Neste trabalho o autor pondera sobre a possibilidade de bacteriologistas menos avisados confiarem na identificação bioquímica clássica de *Corynebacterium*, desprezando como difteroides todos os bacilos fermentadores da sacarose.

O impacto dessa verificação levou WILSON & MILES¹⁰, na 6.^a edição de Topley and

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

** Do Instituto Adolfo Lutz.

Wilson's Principles of Bacteriology, a incluir no texto uma citação referente a este artigo.

Em nosso trabalho efetuamos estudo comparativo entre os resultados obtidos através do estudo do perfil bioquímico e da produção de toxinas em cepas de *C. diphtheriae*, avaliado pela prova de Elek.

MATERIAL E MÉTODOS

Material colhido de nariz e garganta de pacientes com suspeita de difteria, já semeado em meio de Loeffler, era enviado do Hospital Emílio Ribas à Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz para pesquisa do bacilo da difteria.

Após incubação em estufa a 37°C, por 8-24 horas, era feita a bacterioscopia do crescimento no meio de Loeffler, empregando-se a coloração de Neisser-Gins. Quando a bacterioscopia era positiva, o crescimento era semeado em placas de ágar-sangue-cistina-telurito, segundo FROBISHER⁷, levadas à estufa por 24-48 horas.

As colônias suspeitas, com coloração preta ou preto acinzentada, eram repicadas novamente no meio de Loeffler; após 24 horas em estufa a 37°C, era feito novo exame bacterioscópico, sendo então realizadas as provas bioquímicas e de toxigenidade.

Para as provas de fermentação foi usado o meio de CTA, com os hidratos de carbono acrescentados asépticamente, na concentração final de 1%, após filtração em Millipore. A sacarose foi de procedência Merck, assim como os demais açúcares. Foram ainda verificadas a hidrólise do amido em placas, na concentração de 1%, a hemólise em ágar-sangue, e a redução de nitratos a nitritos.

Na interpretação dos resultados usamos, como critério, a primeira leitura após 24 horas e a última, no 5.º dia, permanecendo o material sempre em estufa a 37°C, com exceção da hemólise que era observada unicamente após 24 horas, e da catalase, também realizada com amostras de 24 horas.

Para a prova de toxigenidade *in vitro* foi empregado o teste de Elek.

RESULTADOS

O perfil bioquímico das 224 cepas de *C. diphtheriae* encontra-se exposto na tabela 1.

A tabela 2 expõe o comportamento das variedades *gravis*, *mitis* e *intermedius* de *C. diphtheriae* em relação ao teste de Elek.

O estudo comparativo entre o teste de Elek e a fermentação da sacarose, nas 224 estirpes de *C. diphtheriae* estudadas, encontra-se na tabela 3.

TABELA 1

Comportamento bioquímico de 224 cepas de *Corynebacterium diphtheriae*

Provas	<i>C. diphth. gravis</i>			<i>C. diphth. mitis</i>			<i>C. diphth. intermedius</i>		
	Positivas		Nega- tivas	Positivas		Nega- tivas	Positivas		Nega- tivas
	N.º	%	N.º	N.º	%	N.º	N.º	%	N.º
Arabinose	0	0	70	0	0	84	0	0	70
Dextrina	70	100	0	84	100	0	70	100	0
Galactose	70	100	0	84	100	0	70	100	0
Glicerol	69	98,6	1	81	96,4	3	68	97,1	2
Glicose	70	100	0	84	100	0	70	100	0
Gelatina	0	0	70	0	0	84	0	0	70
Indol	0	0	70	0	0	84	0	0	70
Frutose	70	100	0	84	100	0	70	100	0
Lactose	1	1,4	69	0	0	84	0	0	70
Maltose	70	100	0	84	100	0	70	100	0
Manita	0	0	70	0	0	84	0	0	70
Manose	70	100	0	84	100	0	70	100	0
Melibiose	0	0	70	0	0	84	0	0	70
Sacarose	40	57	30	51	60,7	33	43	61,4	27
Salicina	0	0	70	0	0	84	0	0	70
Nitrato	70	100	0	84	100	0	70	100	0
Trealose	1	1,4	69	1	1,2	83	1	1,4	69
Xilose	1	1,4	69	5	6,0	79	1	1,4	69
Uréia	0	0	70	0	0	84	0	0	70
Amido	70	100	0	0	0	84	0	0	70
Catalase	70	100	0	84	100	0	70	100	0

TABELA 2

Resultados obtidos com o teste de toxigenicidade nas variedades de *Corynebacterium diphtheriae* gravis, mitis e intermedius

Teste de Elek	<i>C. diphtheriae</i> gravis	<i>C. diphtheriae</i> mitis	<i>C. diphtheriae</i> intermedius	Total de cepas
Positivo	61 (87,1%)	66 (78,5%)	53 (75,7%)	180 (80,4%)
Negativo	9 (12,9%)	18 (21,5%)	17 (24,3%)	44 (19,6%)

TABELA 3

Estudo comparativo entre o teste de Elek e a fermentação da sacarose em 224 cepas de *Corynebacterium diphtheriae*

Teste de Elek	N.º de cepas fermentadoras da sacarose	N.º de cepas não fermentadoras da sacarose	Total de cepas
Positivo	106 (58,89%)	74 (41,11%)	180
Negativo	28 (63,64%)	16 (36,36%)	44

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Christovão usou cepas de *C. diphtheriae* cuja virulência foi comprovada *in vitro*, inoculando coelhos intradermicamente; salienta em seu trabalho que a possibilidade de os resultados da fermentação ácida da sacarose terem sido falseados foi anulada pelos resultados negativos obtidos nos tubos testemunhas.

Dentre as 224 amostras de *C. diphtheriae* estudadas, 134 fermentaram a sacarose, o que representa 59,8% do total, percentagem esta bem mais elevada do que a encontrada por Christovão ao estudar 196 cepas virulentas, quando obteve o percentual de 28% de amostras fermentadoras da sacarose.

A fim de confirmar os resultados de nosso trabalho, todas as cepas foram retestadas bioquimicamente empregando-se sacarose de outra fonte. Os resultados obtidos confirmaram os anteriores.

Observando-se os resultados obtidos no teste de Elek, expostos na tabela 2, verifica-se que o número de cepas Elek positivo (180) foi bem maior do que o das cepas

Elek negativo (44), ou seja, 80,4% e 19,6%, respectivamente. Contudo, na distribuição das cepas de acordo com as variedades de *C. diphtheriae*, houve uma equivalência nos resultados. Em vista disto, as cepas foram consideradas em seu total para uma comparação entre toxigenicidade avaliada pelo teste de Elek e a fermentação da sacarose (tabela 3).

Como pode ser observado na tabela 3, verificou-se que, dentre as cepas Elek positivo, 106, ou seja 58,89%, fermentaram a sacarose e 74, ou seja 41,11%, deixaram de fazê-lo. Com relação às cepas Elek negativo, as percentagens foram de 63,64% e 36,36%, respectivamente.

Foi possível assim constatar a existência, em São Paulo, de um apreciável número de cepas de *C. diphtheriae* fermentadoras da sacarose — 134 dentre 224 — com alta percentagem de positividade para o teste de Elek.

A vista do comportamento de *C. diphtheriae* em relação à sacarose, fato este já relatado entre nós por Christovão, e confirmado em maior amplitude pelo atual estudo, parece-nos imprescindível que seja feita total reavaliação dos critérios taxonômicos do *C. diphtheriae*.

RIALA6/452

RASKIN, M.; PESSÓA, G.V.A.; CALZADA, C.T.; LEE, I.M.L.; MELLES, C.E.A. & SAKATA, E.E. — Fermentation of sucrose and toxigenicity of strains of *Corynebacterium diphtheriae* isolated in São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 38(1):29-32, 1978.

SUMMARY: Sucrose was fermented by 134 (59.8%) of the 224 strains of *Corynebacterium diphtheriae*. Using Elek's method, toxigenic and sucrose fermenting strains composed 58.9% of the total. Because of these results, a revision of the taxonomic criteria is suggested.

DESCRIPTORS: *Corynebacterium diphtheriae*, toxigenicity; sucrose, fermentation.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADLAM, C. & SCOTT, M.T. — Lymphoreticular stimulatory properties of *Corynebacterium parvum* and related bacteria. *J. med. Microbiol.*, 6: 261-74, 1973.
2. BAILEY, W.R. & SCOTT, E.G. — *Diagnostic microbiology: a textbook for the isolation and identification of pathogenic microorganisms*. 3rded. Saint Louis, Mosby, 1970.
3. BERGEY, D.H. — *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 7thed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1957. 1094 p.
4. CHRISTÓVÃO, D.A. — Estudo sobre o *Corynebacterium diphtheriae*. I — Fermentação da sacarose por bacilos diftéricos virulentos isolados em São Paulo. *Arq. Fac. Hig. Saúde publ. Univ. S. Paulo*, 11: 97-114, 1957.
5. CHRISTÓVÃO, D.A. — Estudo sobre o *Corynebacterium diphtheriae*. II — Observações sobre bacilos diftéricos e difteróides isolados em São Paulo: aspecto morfológico, propriedades fermentativas, virulência e frequência dos tipos de *Corynebacterium diphtheriae* encontrados. *Arq. Fac. Hig. Saúde publ. Univ. S. Paulo*, 11: 115-34, 1957.
6. ELEK, S.D. — The plate virulence test for diphtheriae. *J. clin. Path.*, 2: 250-8, 1949.
7. FROBISHER, JR., M. — Cystine-tellurite agar for *C. diphtheriae*. *J. infec. Dis.*, 60: 99-105, 1937.
8. FROBISHER, JR., M.; ADAMS, M.L. & KULINS, W.S. — Characteristics of diphtheria bacilli found in Baltimore since november, 1942. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 58:330-4, 1945.
9. MAUSS, E.A. & KEOWN, M.J. — Saccharose-fermenting diphtheria bacilli. *Science*, 104: 252-3, 1946.
10. TOPLEY, W.W.C. — *Topley and Wilson's principles of bacteriology, virology and immunity*. 6thed. London, Edward Arnold, c1975. 2706 p.

Recebido para publicação em 14 de setembro de 1977.