

CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE ISOLADA DE SANGUE *

Cláudio Tavares SACCHI **
Maria Lúcia Ceccconi TONDELLA **
Maria Cristina de Cunto BRANDILEONE **
Carmo Elias Andrade MELLES **
Marinella Della Negra de PAULA **

RIALA6/599

SACCHI, C.T.; TONDELLA, M.L.C.; BRANDILEONE, M.C.C.; MELLES, C.E.A.;
PAULA, M.D.N. — *Corynebacterium diphtheriae* isolada de sangue. Rev. Inst.
Adolfo Lutz, 45(1/2):73-79, 1985.

RESUMO: Foi isolado *C. diphtheriae* de 3 amostras de sangue de um paciente internado no Hospital Emílio Ribas, que não apresentava suspeita clínica de difteria. Analisou-se o aspecto morfológico, comportamento bioquímico e toxigênico destas cepas e verificou-se a presença dos biotipos *intermedius*, *mitis* e *mitis* variedade *belfanti*. O comportamento bioquímico foi idêntico para as cepas isoladas, com exceção da presença de nitrato redutase do tipo A nos biotipos *intermedius* e *mitis*. Esses dois biotipos mostraram não ser toxigênicos quando testados pelo método de Elek, enquanto o biotipo *mitis* var. *belfanti* mostrou-se toxigênico quando empregado o mesmo método. Foi observado não haver variações na sensibilidade dos diferentes antibióticos frente aos agentes antimicrobianos testados.

DESCRITORES: *Corynebacterium diphtheriae*, isolamento de sangue humano; sangue, isolamento de *Corynebacterium diphtheriae*.

INTRODUÇÃO

Bacilos gram-positivos com morfologia similar à apresentada pelo bacilo diftérico são largamente encontrados na natureza. A detecção destes bacilos em culturas de sangue é geralmente considerada como sendo contaminação, pelo fato destes microrganismos estarem comumente presentes na pele e membranas mucosas normais^{18, 22}.

Septicemia pelo bacilo diftérico é ocasionalmente observada, entretanto, WILDFUHR²⁴ sugere que infecções generalizadas por este bacilo ocorram com maior frequência do que se tem relatado.

Nos últimos 30 anos, somente 6 casos de endocardite por *C. diphtheriae* foram relatados, todos em crianças, com exceção de um caso em adulto, descrito por SANDLER¹⁹. Segundo REID & GREENWOOD¹⁷, as endocardites causadas pelo bacilo diftérico representam 0,3% do total de endocardites.

O presente relato vem demonstrar a importância da identificação de bacilos gram-positivos aeróbios isolados de sangue, bem como

descrever as características morfológicas, bioquímicas e toxigênicas das cepas isoladas de três amostras de sangue de uma mesma paciente.

DESCRIÇÃO DO CASO

Uma paciente de 11 anos de idade, com histórico de uma semana de febre, tremores e fraqueza no braço e perna esquerda, foi internada no Hospital Emílio Ribas em 7 de agosto de 1983. No aparelho cardiovascular apresentou sopro sistólico de grau IV e VI, em foco mitral, hiperfonese de B2. A bacterioscopia e cultura de líquido cefalorraquidiano apresentaram-se negativas, enquanto que o exame quimicitológico revelou a presença de 380 células por mm³ (95 neutrófilos e 3 linfócitos), 2.133 hemácias por mm³, 58 mg% de proteínas, 59 mg% de glicose e presença de globulinas, levando a uma suspeita diagnóstica de meningite bacteriana mais sopro cardíaco a esclarecer. Foi iniciado o tratamento com ampicilina (2,5 g de 6 em 6 h). No decorrer da internação e na vigência do 5.º dia da antibioticoterapia, a doente

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

** Do Instituto Adolfo Lutz.

*** Do Hospital Emílio Ribas, São Paulo, SP.

permaneceu febril, com quadro neurológico agravado, hemiparesia à esquerda, desvio de Rima e dislalia. As hemoculturas detectaram a presença de bactérias tidas como contaminantes. Considerando-se a evolução clínica e os resultados dos exames laboratoriais, suspeitou-se de uma endocardite bacteriana, tendo sido administrada penicilina cristalina e staficilin, pelo período de 52 dias, e através da arteriografia cerebral, foi detectada obstrução carotídea interna e externa direita. O ecocardiograma não revelou anormalidades.

A paciente foi transferida para o Hospital Beneficência Portuguesa, em São Paulo, SP, para melhor exploração valvular, quando foi diagnosticada uma insuficiência mitral com achado cirúrgico de válvula mitral com cúspides retraídas e importante deficiência de coalescência atrial. Foi então realizada a cirurgia em 9 de novembro de 1983, com evolução benigna.

MATERIAL E METODOS

Foram estudadas quatro cepas de *C. diphtheriae* isoladas de três amostras de sangue.

As hemoculturas foram feitas em caldo triptona de soja, acrescido de 0,025% de sulfonato de polianetol sódico e processadas segundo BRANDILEONE⁴. Foram isolados bacilos gram-positivos, não-esporulados, pleomórficos, dispostos em paliçada, que apresentaram granulações metacromáticas evidenciadas pela coloração de Albert Laybourn. Estes bacilos foram semeados em placa de ágar-sangue-cistina-telurito²⁰ e incubados em estufa, à temperatura de 37°C pelo período de 48 horas, de onde se obteve colônias características do gênero *Corynebacterium*.

Para a identificação bioquímica, biotipagem, pesquisa de toxigenidade e sensibilidade a agentes antimicrobianos, utilizou-se como inóculo uma cultura em ágar-Muller-Hilton-sangue a 5%, incubada por 24 horas, em estufa a 37°C.

As seguintes provas foram utilizadas para a identificação bioquímica:

Comportamento em relação ao oxigênio — Para a determinação da relação das cepas frente ao oxigênio, foi analisada a presença ou não de crescimento em toda extensão de um tubo de ensaio de 8 x 180 mm, contendo 5 ml de ágar - extrato de carne - extrato de levedura a 1,5% (gelose VL)¹¹. O meio foi fundido, distribuído e estabilizado à temperatura de 55°C em banho-maria. O inóculo constou de uma suspensão bacteriana feita em água destilada estéril, com uma densidade de aproximadamente trezentos milhões de células por mililitro (n.º 1 da escala de McFarland). A semeadura foi feita com auxílio de uma pipeta Pasteur longa, de ponta fechada, que foi introduzida na suspensão bacteriana e, posteriormente, no tubo com gelose

VL, até o fundo, e retirada com movimentos circulares. Este processo foi repetido por duas vezes e os tubos incubados por 24 horas em estufa a 37°C.

Catalase — A presença da enzima catalase foi verificada em lâmina, de acordo com a técnica citada por MAC FADDIM¹³.

Oxidase — A ausência de citocromo oxidase foi verificada utilizando-se uma solução aquosa de p-aminodimetilamino oxalato a 1%⁶.

Redução de nitratos — A redução de nitratos a nitritos foi verificada em tubos de caldo comum (extrato de carne, 5,0 g; bactopeptona, 10,0 g; NaCl, 5,0 g; e água destilada 1.000 ml), ao qual foi adicionado 0,1% de KNO₃. Após ser semeado, o tubo foi incubado pelo período de 48 horas, em estufa a 37°C. A leitura foi realizada segundo método descrito por COWAM & STEEL⁸.

Pesquisa do tipo de nitrato redutase — O tipo de nitrato redutase (A ou B) foi determinado de acordo com a técnica de PICHINOTY & PIECHAUD¹⁸, utilizando-se a gelose VL mais 0,1% de clorato de potássio. O meio foi distribuído, semeado e incubado de maneira idêntica à utilizada para a determinação do comportamento das cepas frente ao oxigênio.

Cisteinase — A pesquisa de cisteinase foi feita em meio de Tinsdale modificado, segundo MOORE & PARSONS¹⁵, e em meio de Pisu & Guarnacci, como descrito por SARAGEA *et alii*²⁰. Foram distribuídos 2 ml de meio por tubo de 12 x 120 mm e a inoculação foi feita com picada central em profundidade⁵. A leitura foi realizada após incubação em estufa pelo período de 24 horas, a 37°C.

Fermentação de carboidratos — Foi utilizado o meio de Hiss, segundo SARAGEA²⁰, como meio base para a verificação da fermentação de carboidratos. Estes açúcares foram esterilizados por filtração (membranas Millipore de 0,45 e de 0,22 μ) e adicionados ao meio base, obtendo-se uma concentração final de 1%. O amido e a dextrina foram esterilizados em autoclave a 105°C, por 20 minutos, e adicionados ao meio base, obtendo-se uma concentração final 0,4 e 1%, respectivamente²⁰. O meio foi distribuído em tubos de 12 x 120 mm, que foram incubados em estufa a 37°C, com leituras diárias de até quinze dias.

Hidrólise do tween 80 — A hidrólise do tween 80 foi verificada pelo método de SIERRA²¹ e as placas incubadas em estufa à temperatura de 37°C, com leituras diárias de até sete dias.

DNase — A desoxirribonuclease foi demonstrada em placa de ágar DNase (*bacto DNase test ágar*) conforme a técnica Difco⁹.

* Difco Laboratories, Detroit, Mich., USA.

As provas de hidrólise da esculina (gelose esculina), hidrólise da uréia (meio uréia indol) e presença de motilidade (meio manita-motilidade-nitrato), foram feitas e interpretadas de acordo com "Milieux et réactifs de laboratoire Pasteur"¹³.

Os biotipos de *C. diphtheriae* foram caracterizados por SARAGEA *et alii*²⁰, onde foram analisadas as características morfológicas em ágar sangue cistina telurito de potássio (CTBA) e caldo nutritivo, e fisiológicas, pela fermentação do amido, dextrina, redução de nitratos e atividade hemolítica.

Hemólise — A atividade hemolítica foi observada em placas de ágar-sangue (10%) desfibrinado de carneiro, coelho e cobaia, com leituras feitas após o período de 24 e 48 horas de incubação em estufa à temperatura de 37°C, e em tubo com 0,5 ml de uma suspensão a 5% das hemácias lavadas de carneiro, coelho e cobaia, mais 1 ml de cultura de 24 horas em caldo comum e 0,5 ml de solução salina a 0,85%. Os tubos foram encubados em banho-maria à temperatura de 37°C e as leituras foram feitas com intervalos de 1, 4, 6 e 24 horas de incubação¹⁰.

Características em caldo — O tipo de crescimento em caldo nutritivo foi verificado após o período de 24 horas de incubação em estufa à temperatura de 37°C.

O estudo do comportamento toxigênico foi realizado através da pesquisa *in vitro* de toxina diftérica pelo teste de Elek, segundo KING & PARSONS¹², onde cada fita de papel de filtro estéril foi impregnada com 100 UI de antitoxina diftérica, procedente do Instituto Butantã, São Paulo, SP.

O teste de sensibilidade aos agentes antimicrobianos foi realizado de acordo com a técnica de BAUER *et alii*¹, onde foram utilizados discos impregnados com eritromicina (15 µg), ampicilina (10 µg), cefalotina (30 µg), tetraciclina (30 µg), cloranfenicol (30 µg), canamicina (30 µg), gentamicina (10 µg), carbenicilina (100 µg), estreptomina (10 µg), vancomicina (30 µg), ampicilina (30 µg), ácido nalidixico (30 µg), sulfonamidas (300 µg) e oxacilina (5 µg)*.

RESULTADOS

Das três amostras de sangue, foram isoladas quatro cepas (A, B, C e D) e identificadas como *C. diphtheriae*. Estas cepas apresentaram comportamentos bioquímicos semelhantes, conforme demonstrado na tabela 1 da página seguinte.

A cepa A, isolada da amostra 1, apresentou nitrato redutase do tipo A, enquanto que as cepas B e C, isoladas das amostras 2 e 3, não apresentaram esta enzima. Um número

de 24 colônias de cada amostra foi então analisado quanto à presença da enzima nitrato redutase e conseguiu-se isolar uma única colônia, apenas da amostra 3, que apresentou nitrato redutase, também pertencente ao tipo A (cepa D).

De acordo com o esquema de biotipagem, verificou-se que a cepa A pertencia ao biotipo *intermedius*, as cepas B e C ao biotipo *mitis* variedade *belfanti* e a cepa D ao biotipo *mitis*, conforme mostra a tabela 2, na pág. 77.

As cepas B, C e D não fermentaram o amido e foram morfológicamente idênticas ao biotipo *mitis*, quanto às características coloniais, microscópicas e tipo de crescimento em caldo, apesar de não apresentarem lise de sangue de carneiro, coelho e cobaia.

O comportamento toxigênico das 4 cepas estudadas mostrou ser variado. As cepas A e D não foram toxigênicas, enquanto que as cepas B e C, biotipo *mitis* var. *belfanti*, apresentaram prova de Elek positiva, respectivamente no 5.º e 6.º dias de incubação (tabela 2).

As 4 cepas de *C. diphtheriae* mostraram o mesmo perfil de sensibilidade aos agentes antimicrobianos testados, apresentando resistência apenas à tetraciclina, sulfonamidas e ácido nalidixico.

DISCUSSÃO

Pela análise da tabela 2, observamos que as cepas de *C. diphtheriae* biotipo *mitis* foram assim classificadas, mesmo não tendo apresentado atividade hemolítica. HEWITT¹⁰, no entanto, mostrou que nenhuma das cepas do biotipo *intermedius* por ele estudadas apresentou atividade hemolítica, mas que dentre ambos os biotipos, *gravis* e *mitis*, algumas foram hemolíticas e outras não. Em relação ao biotipo *mitis*, 27,5% das 120 cepas estudadas pelo mesmo autor não apresentaram esta atividade.

Com respeito às similaridades do comportamento bioquímico e morfológico, e diferenças na habilidade das duas variantes do biotipo *mitis* em reduzir o nitrato, podemos supor que a variante nitrato redutase positiva seja mutante da variante nitrato redutase negativa, uma vez que apenas 2,08% das colônias do biotipo *mitis* analisadas mostraram possuir esta enzima.

Através de nossos resultados, podemos observar que apenas as duas variantes *belfanti* do biotipo *mitis* foram toxigênicas. Geralmente as cepas de *C. diphtheriae mitis* var. *belfanti* não são toxigênicas². Misturas de *C. diphtheriae* toxigênicas e não-toxigênicas têm sido encontradas em lesões de pele³. CHANG⁷ reportou a presença de *C. diphtheriae mitis* var. *belfanti*, isolado de garganta

* Provenientes da Fármaco Diagnóstica Ltda, São Paulo, SP, Brasil.

TABELA 1

Comportamento bioquímico das 4 cepas de C. diphtheriae

Propriedades e substratos	CEPAS			
	A (Amostra 1)	B (Amostra 2)	C (Amostra 3)	D (Amostra 3)
Comportamento em relação ao oxigênio	AAF *	AAF	AAF	AAF
Catalase	+	+	+	+
Oxidase	—	—	—	—
Motilidade a 22 °C	—	—	—	—
Redução de nitratos	+	—	—	+
Cisteinase	+	+	+	+
Tipo de nitrato redutase	A **	—	—	A
Hidrólise da uréia	—	—	—	—
Hidrólise do tween 80	—	—	—	—
Hidrólise da esculina	—	—	—	—
DNase	+	+	+	+
Fermentação de				
Amido	—	—	—	—
Dextrina	+	+	+	+
Galactose ***	+	+	+	+
Glicose	+	+	+	+
Glicerol	+	+	+	+
Levulose	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+
Manose	+	+	+	+
Manitol	—	—	—	—
Sacarose	—	—	—	—
Salicina	—	—	—	—
Trealose	—	—	—	—
Hemólise	—	—	—	—

* Aeróbica anaeróbica facultativa.

** Tipo A de nitrato redutase.

*** Prova positiva com 48 horas de incubação.

(+) Prova positiva.

(—) Prova negativa.

(—) Prova não realizada.

TABELA 2

*Características morfológicas, bioquímicas e toxigênicas dos biotipos de C. diphtheriae isolados **

Cepas	Características coloniais	Características microscópicas	Tipo de crescimento em caldo	Nitrato redutase	Elek **	Biotipos
A	0,5 a 1,0 mm de \varnothing pretas planas, com centro um pouco elevado, lisas	Bacilos longos, com poucas granulações metacromáticas	Levemente turvo, granular, sem película	+	-	<i>intermedius</i>
B	2,0 a 3,0 mm de \varnothing centro preto com bordos claros, convexa, lisas	Bacilos médios, com muitas granulações metacromáticas	Levemente turvo, granular, com película	-	+	<i>mitis</i> var. <i>belfanti</i>
C	2,0 a 3,0 mm de \varnothing centro preto com bordos claros, convexa, lisa	Bacilos médios, com muitas granulações metacromáticas	Levemente turvo, granular, com película	-	+	<i>mitis</i> var. <i>belfanti</i>
D	2,0 a 3,0 mm de \varnothing centro preto com bordos claros, convexa, lisa	Bacilos médios, com muitas granulações metacromáticas	Levemente turvo, granular, com película	+	-	<i>mitis</i>

* As provas de fermentação do amido e hemólise foram negativas para todos os biotipos.

** Prova de toxigenicidade *in vitro*.

(+) Prova positiva.

(-) Prova negativa.

de um único paciente, que apresentou variantes toxigênicas e não-toxigênicas.

É importante ressaltar que a paciente sofreu uma bacteremia por dois biotipos diferentes de *C. diphtheriae*, os biotipos *intermedius* e *mitis*.

Agradecimentos

Agradecemos à Srta. Kinue Irino, pela valiosa orientação recebida na elaboração deste trabalho e à Sra. Sonia Shigue Okita Buschinelli, pela colaboração no teste de sensibilidade aos antibióticos estudados.

RIALA6/599

SACCHI, C.T.; TONDELLA, M.L.C.; BRANDILEONE, M.C.C.; MELLES, C.E.A. & PAULA, M.D.N. — Isolation of *Corynebacterium diphtheriae* from human blood. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45(1/2):73-79, 1985.

ABSTRACT: *C. diphtheriae* was isolated and identified from 3 blood specimens from a patient without clinical manifestation of diphtheriae. Morphology and biochemical and toxigenic properties of the three isolates corresponded to biotypes *intermedius*, *mitis*, and *mitis* variety *belfanti*. The biochemical properties were identical for the three isolates, except for type A nitrate-reductase in biotypes *intermedius* and *mitis*. These biotypes were not toxigenic when tested by Elek method. Biotype *mitis* variety *belfanti* was toxigenic. There was no difference in the behavior of isolates against the tested anti-microbial agents.

DESCRIPTORS: *Corynebacterium diphtheriae*, isolation from human blood; blood, isolation of *C. diphtheriae*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BAUER, A.W.; KIRPY, W.M.M.; SHERRIS, J.C. & TURCK, M. — Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Amer. J. clin. Pathol.*, 45:493-6, 1966.
2. BEZJAK, V. — Differentiation of *C. diphtheriae* of the *mitis* type found in diphtheria and Ozaena. *Antonie van Leeuwenhder*, Amsterdam, 20:269-271, 1954.
3. BEZJAK, V. & FARSEY, S.J. — *C. diphtheriae* in skin lesions in Ugandan children. *Bull. WHO*, 43:643-50, 1970.
4. BRANDILEONE, M.C.C.; MELLES, C.E.A.; VAZ, T.M.I.; NEME, S.M. & PESSOA, G.V.A. — Considerações sobre os resultados de 5.860 casos de hemoculturas realizadas em pacientes do município de São Paulo, entre 1979 e 1982. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44: - , 1984.
5. BROOKS, R. — *Guidelines for the laboratory diagnosis of diphtheriae*. Geneva, WHO [1981]. 27 p. (LAB/81.7).
6. CARPENTER, C.M.; SUHLAND, L.G. & MORRISON, M. — The oxalate salt of p-aminodimethylaniline, an improved reagent for the oxidase test. *Science*, Wash., DC, 105:649, 1947.
7. CHANG, N.D.; LAUGHREN, G.S. & CHALVARDJIAN, N.E. — Three variants of *C. diphtheriae* subsp. *mitis* (*belfanti*) isolated from a throat specimen. *J. clin. Microbiol.*, 8:(6)767-8, 1978.
8. COWAN, S.T. & STEEL, K.J. — *Manual for the identification of medical bacteria*. 2nd ed. Cambridge, Cambridge University press, 1975. p. 167.
9. DIFCO LABORATORIES — *Difco manual: medios de cultivo desidratados y reacciones para microbiologia*. 10.ª ed. Detroit, Mich., Difco, 1984. p. 263.
10. HEWITT, L.F. — Haemolytic activity of *C. diphtheriae*. *J. Pathol. Bacteriol.*, 59: 145-57, 1947.
11. INSTITUT PASTEUR — *Milieux et réactifs de Laboratoire Pasteur*. Paris, Inst. Pasteur, 1978. p. 83, 116, 186.
12. KING, E.O.; FROBISHER, M. & PARSONS, E.I. — The *in vitro* test for virulence of *C. diphtheriae*. *Amer. J. Public Health*, 39:1314-20, 1949.
13. MAC FADDIN, J.F. — *Biochemical tests for identification of medical bacteria*. 2nd ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1980, p. 51-58.
14. McLEOD, J.W. — The types *mitis intermedius* and *gravis* of *C. diphtheriae*. *Bacteriol. Rev.*, 7:1-41, 1943.
15. MOORE, M.S. & PARSONS, E.I. — A study of a modified Tinsdale's medium for the primary isolation of *C. diphtheriae*. *J. infect. Dis.*, 102:88-93, 1958.
16. PICHINOTY, F. & PIECHAUD, M. — Recherche des nitrate-reductase A et B: méthodes. *Ann. Inst. Pasteur*, Paris, 114: 77-98, 1968.

SACCHI, C.T.; TONDELLA, M.L.C.; BANDILEONE, M.C.C.; MELLES, C.E.A. & PAULA, M.D.N. — *Corynebacterium diphtheriae* isolada de sangue. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45(1/2):73-79, 1985.

17. REID, J. & GREENWOOD, L. — Corynebacterial endocarditis. *Arch. intern. Med.*, 119:106-10, 1967.
18. RILEY, P.S.; HOLLIS, D.G.; UTTER, G.B.; WEAVER, R.E. & BAKER, C.N. — Characterization and identification of 95 diphtheroid (Group JK) cultures isolated from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.*, 9:418-424, 1979.
19. SANDLER, M. — *C. diphtheriae* endocarditis in an adult with congenital cyanotic heart disease. *S. afr. med. J.*, 61:594, 1982.
20. SARAGEA, A.; MAXIMESCU, P. & MEITERT, E. — *Corynebacterium diphtheriae*: microbiological methods used in clinical and epidemiological investigations. In: BERGAN, T. & NORRIS, J.R. — *Methods in microbiology*. London, Academic press, 1979. v. 13, p. 61-176.
21. SIERRA, G. apud COWAN, S.T. & STEEL, R.J.². p. 167.
22. SONNENWIRTH, A.C. — Bacteriemia: alcance de problema. In: Sonnenwirth, A.C. — *Bacteremia: aspectos clínicos y de laboratorio*. Trad. do inglês por Editorial Médica Panamericana. Mexico, Panamericana, 1975. p. 15-28.
23. SOTTNEK, F.O. & MILLER, J.M. — *Isolation and identification of C. diphtheriae*. Atlanta, Center for Disease Control, 1980 (revised 1982). 14 p.
24. WILDFUHR, G. — Zur Frage der Bakteriemia in Beginn der Diphtherie. *Zentralbl. Bakteriol. I Abt Orig. A*, 54:14-7, 1949.

Recebido para publicação em 16 de maio de 1985.

