

ESTUDO BACTERIOLÓGICO DE CEPAS DE *CORYNEBACTERIUM  
DIPHThERIAE* ISOLADAS NO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL,  
NO PERÍODO DE 1980 A 1986\*

Cláudio Tavares SACCHI\*\*  
Solange Rodrigues RAMOS\*\*  
Carmo Elias Andrade MELLES\*\*  
Maria Cristina de Cunto BRANDILEONE\*\*  
Maria Lúcia Cecconi TONDELLA\*\*  
Augusto de Escragnole TAUNAY\*\*

RIALA 6/624

SACCHI, C.T.; RAMOS, S.R.; MELLES, C.E.A.; BRANDILEONE, M.C.C.;  
TONDELLA, M.L.C. & TAUNAY, A.E. — Estudo bacteriológico de cepas de  
*Corynebacterium diphtheriae* isoladas no Estado de São Paulo, Brasil, no período de  
1980 a 1986. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 47(1/2):31-37, 1987.

RESUMO: Foram analisadas as características bioquímicas de 386 cepas de  
*Corynebacterium jiphtheriae* isoladas na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz,  
São Paulo, no período de 1980 a 1986. Verificou-se que 58,3% destas cepas foram capazes de  
fermentar a sacarose. O biotipo mais freqüente foi o *mitis* (52,2%), seguido pelos biotipos  
*intermedius* (26,4%), *gravis* (9,9%) e de cepas de comportamento atípico (11,7%). Das cepas  
pertencentes ao biotipo *intermedius*, 75,5% foram capazes de fermentar a sacarose. Com  
relação à produção de toxina, detectada pelo método de Elek, verificou-se que 92,8% das  
cepas foram toxigênicas e que 97,3% das cepas fermentadoras de sacarose produziram  
toxina.

DESCRIPTORIOS: *Corynebacterium diphtheriae*, biotipos.

## INTRODUÇÃO

As características bioquímicas do *Corynebacterium diphtheriae* são bastante conhecidas. Com relação à fermentação de carboidratos, alguns deles são usados para diferenciar o *C. diphtheriae* de outras espécies normalmente não patogênicas. Dentre os carboidratos utilizados, encontramos a sacarose que sempre foi considerada, nos testes de fermentação, o açúcar-chave para a identificação do *C. diphtheriae*.

Na última edição do manual Bergey<sup>10</sup>, de 1986, o *C. diphtheriae* ainda é considerado como não fermentador da sacarose, sendo raras as cepas capazes de utilizá-la. No entanto, em 1943, PESTA-

NA<sup>12</sup> já mostrava que de 1452 cepas isoladas e identificadas no Instituto Adolfo Lutz, em São Paulo, 12,6% fermentaram a sacarose. Em 1957, CHRISTOVÃO<sup>5,6</sup> e TOPLEY<sup>19</sup> relataram uma positividade de 20% em cepas de *C. diphtheriae*, também isoladas em São Paulo. Os mesmos autores, analisando extensa literatura, mostraram que os dados não eram concordantes, e que a variabilidade dos resultados de fermentação da sacarose muitas vezes estava relacionada com o meio base utilizado, a pureza do açúcar ou a pouca sensibilidade do indicador de pH utilizado.

RASKIN<sup>13</sup>, em 1978, analisando 254 cepas de *C. diphtheriae* isoladas e identificadas no Instituto Adolfo Lutz em São Paulo, verificou que 59,8% das mesmas fermentaram a sacarose.

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

\*\* Do Instituto Adolfo Lutz.

Fica assim bem demonstrada a importância do trabalho inicial de PESTANA & FERREIRA<sup>12</sup>, que teve sua observação confirmada por CHRISTOVÃO<sup>5,6</sup> e RASKIN et alii<sup>13</sup>. Atualmente, já se admite que há cepas de *C. diphtheriae* fermentadoras de sacarose e que esta característica está associada apenas aos biotipos *mitis* e *gravis*<sup>1,2,3,8,15,17</sup>.

No período de 1980 a 1986, tivemos a oportunidade de examinar 386 cepas de *C. diphtheriae* que foram submetidas a várias provas bioquímicas, e pesquisa de toxigenicidade na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, em São Paulo. Este estudo teve como objetivo traçar o perfil bioquímico, com atenção especial para a capacidade de fermentar a sacarose, e toxigênico, bem como conhecer a incidência dos diferentes biotipos de *C. diphtheriae* em nosso meio.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Origem das cepas** — As 386 cepas de *C. diphtheriae* analisadas foram obtidas a partir de swabs nasais e faringeanos, submetidos ao diagnóstico bacteriológico pela Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz no período de 1980 a 1986, de pacientes com suspeita clínica de difteria, comunicantes e portadores encaminhados ao Hospital Emílio Ribas, São Paulo.

**Isolamento** — O material, uma vez colhido, foi semeado em meio de Loeffler e incubado por um período de 8 a 12 horas, em estufa a 37°C. Após este período, foi feito esfregaço do crescimento bacteriano em lâmina, o qual foi corado pelo método de Albert Laybour<sup>7</sup>, com a finalidade de demonstrar a presença de bacilos com características morfológicas e tintoriais de *Corynebacterium* sp. Independentemente da positividade ou não deste exame bacterioscópico presuntivo, procedeu-se à cultura, a partir do meio de Loeffler, que foi feita em placas de ágar-sangue-cistina-telurito (CTBA)<sup>16</sup>, as quais foram incubadas, por 48 horas, em estufa a 37°C. Destas placas, várias colônias suspeitas foram subcultivadas em meio de Loeffler e incubadas em estufa a 37°C, por 18 horas. Após incubação, esfregaços corados pelo método de Albert Laybour foram usados para confirmar as características morfológicas e tintoriais destes microrganismos isolados.

**Identificação** — Para a identificação bioquímica, biotipagem e pesquisa de toxigenicidade, usou-se como inóculo uma cultura em ágar Mueller-Hinton incubada por 18 horas em estufa a 37°C. Parte dos testes bioquímicos utilizados foram descritos em publicação anterior<sup>14</sup>, aos quais foram acrescidas a capacidade de hidrolizar a pirazinamida e pesquisa da atividade hemolítica. A pesquisa de pirazinamida carboxilamidase (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo) foi feita pelo método rápido descrito por SULEA et alii<sup>18</sup>. Como controle positivo da reação usou-se uma cepa de *C. xerosis*, KC-1368\*. A atividade hemolítica foi observada em placas de ágar sangue (10% de sangue desfibrinado de coelho), com leituras feitas após 24 e 48 horas de incubação, em estufa a 37°C.

**Biotipagem** — Os biotipos de *C. diphtheriae* foram caracterizados segundo o esquema preconizado por SARAGEA et alii<sup>16</sup> onde foram analisadas as características morfológicas em CTBA, tipo de crescimento em caldo nutritivo, fermentação do amido e glicogênio, redução de nitrato e atividade hemolítica.

## RESULTADOS

Das 386 amostras de *C. diphtheriae*, 58,29% foram capazes de fermentar a sacarose (tabela 1). Com relação à frequência dos biotipos, 52,21% das cepas pertenceram ao biotipo *mitis*, 26,42% ao biotipo *intermedius*, 9,87% ao biotipo *gravis* e 11,69% corresponderam a cepas que apresentaram um padrão de comportamento atípico (tabela 2).

Quanto à utilização da sacarose, a maior frequência foi encontrada no biotipo *intermedius*, 75,49%, seguido pelos biotipos *gravis*, 71,05%, cepas de comportamento atípico, 57,78% e *mitis*, 47,26% (tabela 1).

Com relação à produção de toxina, verificou-se que 92,77% das cepas foram toxigênicas, sendo que 99,02% das cepas pertencentes ao biotipo *intermedius* foram toxigênicas (tabela 3).

Com relação ao tipo de nitrato redutase, 100% das cepas eram do tipo A, e apenas 0,52% das cepas não apresentavam esta enzima.

\* Cepa cedida pela Dra. Frances O. Sottnek, Centers for Disease Control, Atlanta, Georgia, EUA.

TABELA 1

Distribuição anual de biotipos de *C. diphtheriae* fermentadores da sacarose

Biotipos	1980		1981		1982		1983		1984		1985		1986		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<i>mitis</i>	29	63,04	21	50,0	6	54,54	7	43,75	14	45,16	9	28,12	9	39,13	95	47,26
<i>gravis</i>	5	83,33	7	87,5	0	—	4	66,23	9	69,23	0	—	2	50,0	27	71,05
<i>intermedius</i>	4	100,00	32	86,49	3	50,0	5	31,25	9	90,0	20	90,91	4	57,14	77	75,49
Atípicos	9	69,23	8	50,0	1	100,0	0	—	3	60,0	0	—	5	71,43	26	57,78
Total	47	68,11	68	66,02	10	55,55	16	41,02	35	59,32	29	50,88	20	48,78	225	58,29

TABELA 2

*Biotipos de C. diphtheriae* estudados durante o período de 1980 a 1986.

Ano	Biotipos								Total de biotipos
	<i>mitis</i>		<i>gravis</i>		<i>intermedius</i>		atípicos		
	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%	
1980	46	66,67	6	8,7	4	5,8	13	18,83	69
1981	42	41,18	8	7,8	37	35,92	16	15,73	103
1982	11	61,11	0	—	6	33,33	1	5,55	18
1983	16	41,03	6	15,38	16	41,03	1	2,56	39
1984	31	52,54	13	22,03	10	16,95	5	8,48	59
1985	32	56,14	1	1,75	22	38,6	2	3,51	57
1986	23	56,1	4	9,76	7	17,07	7	17,07	41
Total	201	52,21	38	9,87	102	26,42	45	11,69	386

TABELA 3

*Distribuição anual de biotipos de C. diphtheriae* toxigênicos\*

Anos	<i>mitis</i> tox <sup>+</sup>		<i>gravis</i> tox <sup>+</sup>		<i>intermedius</i> tox <sup>+</sup>		atípicos tox <sup>+</sup>		Total de biotipos tox <sup>+</sup>	
	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%
1980	43	93,48	6	100,00	4	100,00	13	100,00	66	95,65
1981	41	97,62	8	100,00	37	100,00	16	100,00	102	99,03
1982	10	90,91	0	—	6	100,00	1	100,00	17	94,44
1983	14	87,5	6	100,00	15	92,75	1	100,00	36	92,30
1984	27	87,1	10	76,92	10	100,00	5	100,00	52	88,14
1985	29	90,62	0	—	22	100,00	1	50,0	52	91,23
1986	19	82,61	1	25,0	7	100,00	6	85,71	33	80,49
Total	183	91,04	31	81,57	101	99,02	43	95,56	358	92,77

\* A pesquisa de toxigenicidade foi feita pelo método de Elek.

## DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A percentagem de cepas fermentadoras da sacarose dentre as 386 analisadas foi alta, 58,29%, mostrando ser uma característica importante dos bacilos diftéricos em nosso meio.

Um estudo da incidência de tal positividade, durante os 7 anos analisados, mostra que esta positividade sofreu variações não significativas.

Como pode ser observado na tabela 4, dentre as cepas fermentadoras da sacarose, 219, ou seja, 97,33%, apresentaram prova de toxigenicidade positiva e apenas 6 (2,67%) não foram toxigêni-

cas. Foi assim constatado que a percentagem de cepas fermentadoras da sacarose e toxigênicas permanece elevada<sup>13</sup>.

A alta incidência de cepas capazes de utilizar a sacarose pode estar ligada a uma característica regional, uma vez que não há relatos na literatura referentes a este tipo de frequência em outros países.

Ainda, com relação à fermentação da sacarose, a maior frequência foi para o biotipo *intermedius*, 75,49%, seguido pelos biotipos *gravis*, 71,05%, cepas de comportamento atípico, 57,78%, e *mitis*, 47,26%. Estes dados diferem

TABELA 4

Correlação entre a fermentação da sacarose e a toxigenidade de *C. diphtheriae*

Toxigenicidade	Fermentação da sacarose				Total de cepas	
	Positiva		Negativa		Nº	%
	Nº	%	Nº	%		
Positiva	219	97,33	139	86,34	358	92,75
Negativa	6	2,67	22	13,66	28	2,25
Total de cepas	225	58,29	161	41,71	386	--

dos relatos da literatura internacional que se refere ao fato, como raro, e assinalam nunca ter sido isolada uma cepa fermentadora da sacarose pertencente ao biotipo *intermedius*.

Com relação às cepas produtoras de nitrato-redutase, verificamos que 100% delas apresentaram enzima pertencente ao tipo A. A variedade nitrato-redutase negativa, o *C. diphtheriae mitis* var. *belfanti*, foi extremamente rara, tendo sido isoladas apenas 2 cepas (0,52%), durante o período de 7 anos.

Apesar de ter havido uma variação dos biotipos no decorrer dos 7 anos (1980 a 1986), o biotipo *mitis* sempre foi o de maior incidência e o *gravis* de incidência mais baixa, com exceção das cepas atípicas.

Dentre as 201 cepas pertencentes ao biotipo *mitis*, 91,04% foram toxigênicas. Este comportamento difere muito do apresentado por cepas do biotipo *mitis* isoladas em outros países. No Canadá, apenas 5% das cepas do biotipo *mitis* isoladas entre 1967 e 1971 foram toxigênicas<sup>9</sup>. Porém, a percentagem das cepas toxigênicas pertencentes ao biotipo *mitis*, nos Estados Unidos da América, variou muito, apresentando uma queda significativa no decorrer de 14 anos analisados, sendo de 14% no período de 1971 a 1975<sup>9</sup>.

A suposição de haver uma correlação entre o biotipo e a gravidade da doença, hoje, já não apresenta consistência, pois todos os biotipos po-

dem ser toxigênicos ou não, causando mal clínico de intensidade variável<sup>16</sup>. No entanto, a incidência dos diferentes biotipos pode apresentar valor epidemiológico, pois a frequência deles, em épocas epidêmicas, é maior para o *gravis*, seguido do *intermedius*<sup>16</sup>.

Em alguns países da Europa<sup>15,16,20</sup>, durante os últimos 20 anos, o biotipo *gravis* foi o único isolado em epidemias, enquanto, no período pós-epidêmico, a maior frequência foi para o *intermedius*. O biotipo *mitis* tornou-se prevalente somente quando a difteria passou a ser endêmica. Para estes países a ocorrência de cepas do biotipo *gravis*, e toxigênicas, representa um indicador epidemiológico implicando em medidas profiláticas imediatas<sup>3,9,11</sup>. Já nos Estados Unidos da América, em recentes surtos investigados, o biotipo *intermedius* toxigênico prevaleceu, porém, em períodos pós-epidêmicos o biotipo *mitis* continuou sendo o de maior incidência<sup>15,16,20</sup>.

À semelhança do que tem ocorrido em diferentes países, a prevalência no nosso meio do biotipo *mitis* nos leva a crer que a difteria se encontra sob a forma endêmica. Uma possível alteração na incidência dos biotipos *gravis* e *intermedius* poderia ter algum significado epidemiológico. A determinação de lisotipos, bacteriocinotipos ou de marcadores moleculares seria necessária para uma melhor caracterização das cepas epidêmicas de *C. diphtheriae*.

SACCHI, C.T.; RAMOS, S.R.; MELLES, C.E.A.; BRANDILEONE, M.C.C.; TONDELLA, M.L.C. & TAUNAY, A.E. — Bacteriological study of strains of *Corynebacterium diphtheriae* isolated in São Paulo State, during the period 1980-1986. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 47(1/2):31-37, 1987.

ABSTRACT: A biochemical study was made of 386 strains of *Corynebacterium diphtheriae* isolated at the Central Public Health Laboratory for the State of São Paulo in the period 1980-1986. Saccharose was fermented by 58.3% of the strains. The most frequent biotype was *mitis* (52.2%) while *intermedius* and *gravis* showed frequencies of 26.4% and 9.9%, respectively, while 11.7% were atypical. Of the *intermedius* type strains, 75.5% fermented saccharose. Elek's method showed that 92.8% of the strains of all types were toxigenic and that 97.3% of the saccharose-fermenting strains were toxigenic.

DESCRIPTORS: *Corynebacterium diphtheriae*, biotypes.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARKSDALE, L. — The genus *Corynebacterium*. In: STARR, M.P.; STOLP, H.; TRÜPER, H.G.; BALOWS, A. & SCHLEGEL, H.G., ed. — *The prokaryotes: a handbook on habitats, isolation and identification of bacteria*. Berlin, Springer-Verlag, 1981. p. 1827-37.
2. BEBEAR, C. — Corynébactéries: In: LE MINOR, L. & VÉRON, M. — *Bactériologie Médicale*. 2<sup>e</sup> tirage. Paris, Flammarion, 1984. p. 642-56.
3. BROOKS, G.F.; BENNETT, V. & FELDMAN, R.A. — Diphtheria in the United States, 1959-1970. *J. infect. Dis.*, 129(2): 172-8, 1974.
4. BROOKS, R. — *Guidelines for the laboratory diagnosis of diphtheria*. [Geneva] WHO [1981]. 27 p. (LAB/81.7).
5. CHRISTOVÃO, D.A. — Estudo sobre o *Corynebacterium diphtheriae*. I — Fermentação da sacarose por bacilos diftéricos virulentos isolados em São Paulo. *Arq. Hig. Saúde Pública*, São Paulo, 11: 97-114, 1957.
6. CHRISTOVÃO, D.A. — Estudo sobre *Corynebacterium diphtheriae*. II — Observações sobre bacilos diftéricos e difteróides isolados em São Paulo aspectos morfológicos, propriedades fermentativas, virulência e frequência dos tipos de *Corynebacterium diphtheriae* encontrados. *Arq. Hig. Saúde Pública*, São Paulo, 11: 115-34, 1957.
7. COWAN, S.T. & STEEL, K.J. — *Manual for the identification of medical bacteria*. 2<sup>nd</sup> ed. Cambridge, Cambridge University Press, 1975. p. 161-4.
8. COYLE, M.B. & TOMPKINS, — *Corynebacteria*. In: LENNETTE, E.H.; BALOWS, A.; HAUSLER, W.J., Jr., & TRUANT, J.P. — *Manual of clinical microbiology*. 3<sup>rd</sup> ed. Washington, D.C., American Society for Microbiology, 1980. p. 131-8.
9. DIXON, J.M.S. — Diphtheria in North America. *J. Hyg., Camb.*, 93: 419-32, 1984.
10. JONES, D. & COLLINS, M.D. — Irregular, nonsporing Gram-positive rods. In: SNEATH, P.H.A.; MAIR, N.S.; SHARPE, M.E. & HOLT, J.G. — *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore, Williams and Wilkins, 1986. v. 2, p. 1261-76.
11. McCLOSKEY, R.V.; SARAGEA, A. & MAXIMESCU, P. — Phage typing in diphtheria outbreaks in the southwestern United States, 1968-1971. *J. infect. Dis.*, 126(2): 196-9, 1972.
12. PESTANA, B.R. & FERREIRA, M.P.G. — Considerações sobre algumas propriedades bioquímicas do bacilo da difteria. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 3:(1): 32-43, 1943.
13. RASKIN, M.; PESSÔA, 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.
14. SACCHI, C.T.; TONDELLA, M.L.C.; BRANDILEONE, M.C.C.; MELLES, C.E.A. & PAULA, M.D.N. — *Corynebacterium diphtheriae* isolado de sangue. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 45(1): 73-9, 1985.
15. SARAGEA, A.; CARRAZ, M. & GUILLERMET, F. — Analyse des propriétés biologiques d'une collection de souches de *Corynebacterium diphtheriae* isolées au sud de la France entre 1955-1968. *Rev. Inst. Pasteur Lyon*, 5(2): 203-11, 1972.
16. 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.

SACCHI, C.T.; RAMOS, S.R.; MELLES, C.E.A.; BRANDILEONE, M.C.C.; TONDELLA, M.L.C. & TAUNAY, A.E. — Estudo bacteriológico de cepas de *Corynebacterium diphtheriae* isoladas no Estado de São Paulo, Brasil, no período de 1980 a 1986. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 47(1/2):31-37, 1987.

---

17. SOTTNEK, F.O. & MILLER, J.M. — *Isolation and identification of Corynebacterium diphtheriae*. Revised ed. Atlanta, Georgia, Centers for Disease Control, 1982. 14 p.
18. SULEA, I.T.; POLLICE, M.C. & BARKSDALE, L. — Pyrazine carboxylamidase activity in *Corinebacterium*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 30(2): 466-72, 1980.
19. TOPLEY, W.W.C. — *Toplay and Wilson's principles of bacteriology and immunity*, 6<sup>th</sup> ed. London, Edward Arnold, 1975. p.618.
20. ZAMIRI, I.; McENTERGART, M.G. & SARA-GEA, A. — Diphtheria in Iran. *J. Hyg., Camb.*, 70: 619-25, 1972.

*Recebido para publicação em 6 de abril de 1987.*

