

## DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA DIFTERIA REALIZADO COM UM NOVO MEIO DE CULTU- RA NA COMPLEMENTAÇÃO DO EUGONAGAR \*

CLEOMENES REIS \*\* MARIO DINIZ \*\*\* MOHAMAD NADER M.  
KOLEILAT \*\*\*\*

### RESUMO

Um novo meio de cultura elaborado pelos autores permitiu crescimento seletivo rápido e "luxuriante" de *Corynebacterium diphtheriae*.

Para a sua constituição foi utilizado o Eugonagar Vera (BBL) acrescido de amido, maltose, plasma hemolizado de carneiro, vermelho neutro e solução aquosa de telurito de potássio a 3%.

Este meio, segundo as observações dos autores, mostrou-se mais eficiente do que outros, para detecção de *Corynebacterium*.

### INTRODUÇÃO

Embora a presença do *b. difterico* no material examinado pelo bacteriologista não permita a con-

firmação da doença sendo o diagnóstico da difteria da responsabilidade quase que exclusiva do clínico, muitas tentativas têm sido feitas em laboratório no sentido de proporcionar fácil crescimento deste organismo patogênico, de reconhecer os seus tipos e diferenciá-lo dos difteroides.

Com esta intenção muitos foram os meios de cultura introduzidos na prática bacteriológica, conforme descrição dos trabalhos de J.S. Anderson e cols. (1931), Hoyle (1941), Young (1942), MacLeod (1943), P.M. Anderson (1944) e em 1965 Pappenheimer Jr. (1, 2, 3, 4, 7, 8, 9, 10).

Alguns destes, contudo, são meios de difícil preparo. Outros mostram o crescimento de colônias bacterianas apenas após 48 horas de incubação.

\* Trabalho realizado no Laboratório de Bacteriologia do Instituto de Patologia Tropical da Universidade Federal de Goiás (Diretor Dr. William Barbosa).

\*\* Prof. Titular do Dept. de Microbiologia do IPT-UFGO.

\*\*\* Prof. Assistente do Dept. de Microbiologia do IPT-UFGO

\*\*\*\* Bioquímico, Residente do Dept. de Microbiologia — IPT-UFGO.

Pesquisando sobre o assunto os autores elaboraram um meio de fácil preparo que satisfaz às exigências nutritivas do *Corynebacterium diphtheriae* permitindo seu crescimento mais rápido e luxuriante, bem como, pelas características das colônias, diferenciar os vários tipos da espécie, motivo da presente comunicação.

### MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se nas experiências amostras conhecidas de *Corynebacterium diphtheriae* — tipos Gravis, Intermedius — Amostra Park-Williams (PW8), gentilmente cedida pelos Laboratórios do Instituto Vital Brasil; e Mitis, de *C. pseudo-diphthericum* (Hofmannii) e *C. xerosis*, outras amostras bacterianas previamente identificadas, além de amostras problemas provenientes de indivíduos doentes (diagnóstico clínico de difteria).

Todas as amostras foram, individual e concomitantemente semeadas em placas com os meios com telurito de Hoyle, Anderson, Downie e no meio por nós preconizado e denominado RDK, que tem composição abaixo:

Eugonagar (BBL) .....	45,4 g
Maltose .....	08,0 g
Amido solúvel .....	02,0 g
Plasma hemolizado de carneiro .....	40,0 ml
Sol. aquosa de vermelho neuro (1%) .....	00,2 ml
Água destilada q.s.p. ....	1000,0 ml
Sol. aquosa telurito potássio (3%) .....	04,0 ml

pH — 7.8

Aquecido, filtrado e esterelizado a 115.º durante 20'

Para o preparo deste meio a seguinte técnica deve ser observada:

#### 1 — Sol. tel. potássio —

Dissolver, esterelizar a 115º e conservar na obscuridade, em frascos bem vedados.

2 — A solução aquosa de telurito de potássio a 3% é preparada e guardada em frascos âmbar, bem vedado e esterelizado separadamente, podendo assim, ser guardada durante algum tempo.

3 — O pH deve ser ajustado após realizada a mistura dos ingredientes, antes do aquecimento, filtração e autoclavagem.

4 — Após resfriado a 45-55ºC, adiciona-se ao meio os 4 ml., da solução aquosa de telurito de potássio, e o plasma hemolizado de carneiro (estéril).

5 — Distribuir em placas de Petri.

As semeaduras foram realizadas com cultura de espécies conhecidas pelas técnicas de esgotamento de alça, enquanto que as amostras problemas foram semeadas diretamente com swab de

faringe embebido em água peptonada, em estrias.

### RESULTADOS

Após 16 a 24 horas de incubação a 37ºC, as colônias bacterianas tornam-se visíveis, e as pertencentes ao gênero *Corynebacterium* apresentam as seguintes características:

a) — Gravis — Colônias escuras, de tamanho médio, tradicionalmente apresentando a morfologia de "corola de margarida", contorno irregular, mostrando ao seu redor uma área correspondente à acidificação do meio, (fermentação da maltose e dextrose) e ataque ao amido).

b) — Mitis — Colônias negras, lúzidas, pequenas, circulares, contorno liso, apresentando também em seu redor uma área correspondente à acidificação do meio (dextrose e maltose) embora alguns autores não consideram as amostras Mitis e Intermedius como fermentadoras da maltose (6).

c) — Intermedius — Colônias circulares, bordos claros, ligeiramente entre amarelo rosado, centro enegrecido, com a mesma apresentação com relação à área em seu redor (fermentação da dextrose e maltose). (Fig. 1)

d) — Pseudodiphthericum (Hofmannii) — Colônias claras, lisas,

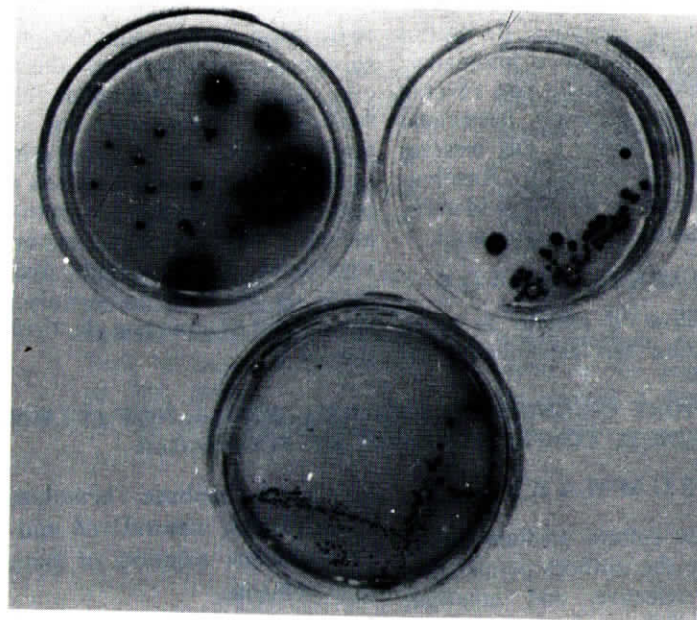


Fig. 1 — Aspecto das colônias de *Corynebacterium diphtheriae* em RDK. (a) Gravis e Mitis (b) Intermedius (c) Mitis

transparentes, sem alteração do meio em torno delas.

e) — C. xerosis — Colônias claras, lisas, translúcidas, com alteração do meio em torno delas (acidificação p/ fermentação de dextrose e maltose).

f) — Outras bactérias — Foram também semeadas em placas individuais amostras de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus beta hemolíticos do grupo A*, *Streptococcus viridis*, *Streptococcus faecalis* (enterococos), *Pneumococcus*, *Neisserias catharralis*, *Candida albicans* e *Klebsiella pneumoniae*, agentes encontrados nas infecções orais. Nas 24 horas não houve crescimento de nenhum destes organismos, a não ser da *Candida albicans* que apresentou-se em colônias irregulares, escuras, elevadas, de bordos irregulares, opacas e agrupadas.

O meio de Hoyle não revelou nenhum crescimento bacteriano no mesmo tempo e nas mesmas condições de incubação. Revelou-se apenas após 48 horas identificação destes microorganismos.

### COMENTÁRIOS

A glicose, o acetato de sódio e a cistina são estimulantes do

crescimento destes germes, sendo as duas primeiras substâncias utilizadas em grande parte dos meios tradicionais, como por exemplo o meio de Clauberg, e o de Gundel Tietz.

O Eugonagar Vera foi primeiramente utilizado em bacteriologia sanitária para o cultivo de lactobacilos. Posteriormente foi empregado também no diagnóstico bacteriológico e é um meio que permite o crescimento eugônico de culturas de bactérias, incluindo muitos organismos de difícil cultivo, como por exemplo *Haemophilus*, *Neisseria*, *Pasteurella*, e com a adição de sangue proporciona crescimento de vários fungos e até do *M. Tuberculosis*. (3)

Julgamos ser vantajoso o uso deste meio devido ao crescimento rápido e "luxuriante" do bacilo diftérico, permitindo, com facilidade, diferenciá-lo dos difteroides bem como caracterizar as três variedades clássicas da espécie. A confirmação da patogenicidade deve ser feita mediante verificação da capacidade tóxica (teste de Elek) e da inoculação em animal (Esquemas de Frosher) (7).

### LABORATORY DIAGNOSIS OF DIPHTERIA WITH A NEW CULTURE MEDIUM, COMPLEMENTATION OF EUGONAGAR

#### SUMMARY

A new culture medium elaborated by the authors permitted a quick selective and luxuriant growth of *Corynebacterium diphtheriae*.

For its constitution they used Eugonagar Vera (BBL), and ad-

ded starch, maltose, hemolyzed sheep plasma, neutral red and a 1% aqueous solution of potassium tellurite.

This medium, according to the authors, showed more effective than any other in the detection of *Corynebacterium*.

C. Reis & cols. — Diagnóstico laboratorial da difteria realizado... 413

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDERSON, J.S.; HAPPOLD, F.C.; McLEOD, J.V. & TOMSON, J.C. — On the existence of two forms diphtheria bacillus. *B. diphtheriae gravis* and *B. diphtheriae mitis* — and a new medium for their differentiation and for bacteriological diagnosis of diphtheriae. *J. Path. Bact.* 34, 667, 1931.
2. ANDERSON, P.M. — A simple medium for the detection of *Corynebacterium diphtheriae*. *Med. J. Aust.* 1:213, 1944.
3. BBL — Manual of products and Laboratory procedures — 5.ª ed. Bio Quest, Division of Becton, Dickinson and Company, 108, 1968.
4. BIER, O. — Bacteriologia e Imunologia. 11.ª ed. Editora Melhoramentos. São Paulo, 1963.
5. CRUICKSHANK, R — Microbiologia Médica. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa. Trad. M. Serpa dos Santos, 2.ª ed. 785, 1968.
6. DAVIS, B.O.; DUBECCO, R.; EISEN, H.N.; GINSBERG, H. S. & WOOD, W.B. — Tratado de Microbiologia. Salvat, Editores. Barcelona, 686-690, 1970.
7. FRANKEL, A.; REITMAN, S. & SONNEWIRTH, A.C. — Gradwol's Clinical Laboratory Methods and Diagnosis. the C. V. Mosby Co. St. Louis, 1197, 1970.
8. GIBBS, B.M. & SHAPTON, D. A. — Identification method for bacteriologists. Academic Press. London, New York, 1968.
9. HOYLE, L. — A Tellurite blood agar medium for the rapid diagnosis of diphtheriae. *Lancet.* 1:175, 1941.
10. PAPPENHEIMER Jr. A.M. — The Diphtheriae Bacilli and the Diphtheroides. "In Bacterial and Mycotic Infections of Man (R. J. Dubos & J.G. Hirsh), J. B. Lippincott Co. Philadelphia, 1965.
11. YOUNG, M.I. — Diphtheria diagnosis with Hoyle's medium. Saponin and sodium-diethylsulpho-succinate as hemolyzing agents in the preparation for the medium. *J. Path. Bact.* 54, 253, 1942.