

DETERMINAÇÃO DA TOXIGENICIDADE DO *C. DIPHTHERIAE* "IN VITRO"

HELVECIO BRANDAO

(2.º Assistente)

Nos laboratórios de saúde pública, o problema do diagnóstico rápido é de prima importância.

A maioria dos germes patogênicos é diagnosticada pelo conjunto de caracteres morfológico, cultural, atividade bioquímica e estudo sorológico. Entretanto, para as bactérias que produzem exotoxina, a última parte, isto é, a tipificação sorológica, é de pouca valia, e a identificação final é conseguida pela demonstração da produção de toxina nos animais suscetíveis, pelo achado das lesões características e pela neutralização específica da toxina nos animais testemunhas.

A verificação da capacidade toxigênica das bactérias tem sido realizada como rotina nos laboratórios, exclusivamente em animais. São processos geralmente demorados, pois exigem o isolamento em cultura pura da bactéria em questão e, conseqüentemente, não se prestam para fins de diagnóstico rápido. A necessidade de um teste rápido equivalente à tipificação sorológica, se fazia sentir e muito especialmente para a identificação do *C. diphtheriae* virulento.

Baseando-se no princípio de floculação de misturas de toxina e antitoxina diftéricas, demonstrada por Nicolle e colaboradores¹ em 1920 e usada para titulação da antitoxina por Ramon² em 1922, Elek³ idealizou um teste em placa, para testar a virulência do bacilo diftérico.

Essencialmente, o teste de Elek³ consiste no seguinte: o uso de um agar transparente, contendo maltose e ácido láctico. A este agar fundido, adiciona-se 20% de sôro normal de cavalo e a mistura é colocada numa placa de Petri. Em seguida, com o agar ainda fluido, coloca-se no centro da placa e bem recoberta pelo meio, uma tira de papel de filtro estéril, previamente embebido em sôro antidiftérico, diluído de modo a conter 1.000 unidades por ml. As placas depois de secas na estufa são semeadas no mesmo dia, cada uma servindo para um número variável de amostras, conforme o seu tamanho, sendo uma de virulência comprovada anteriormente.

As semeaduras são feitas para cada amostra numa linha larga formando ângulos retos com a tira de papel de filtro.

A toxina produzida pelo organismo, difundindo-se em concentrações decrescentes, assim como a antitoxina do papel de filtro, entram em contacto em pontos de proporção ótima para a reação toxina-antitoxina, que forma uma linha contínua, e devido à floculação que ocorre, uma representação gráfica é obtida. Em cada lado da cultura desenvolve-se uma linha branca, dando a cada amostra

toxigênica a aparência de uma ponta de lança. Este aspecto pode ser observado na figura, cuja fotografia foi feita de acôrdo com a técnica recomendada por McCartney ⁴.

IMPORTANCIA PRATICA DO TESTE

Todos aquêles que trabalham em laboratórios de saúde pública avaliam bem a importância prática de um teste rápido para a identificação segura do *C. diphtheriae*. Secundariamente, o uso de placa cujo preparo é o mais simples possível, em vez de animais, representa obviamente uma grande economia de tempo e de despesas, para as determinações de toxigenicidade.

ORIENTAÇÃO DO NOSSO TRABALHO

Inicialmente, nosso trabalho consistiu no estudo do comportamento de 156 amostras, que haviam sido identificadas pelas provas clássicas de morfologia, atividade bioquímica e prova de toxigenicidade em coelho.

No momento, estamos empenhados no estudo do diagnóstico rápido da difteria, isto é, na obtenção de um método capaz de fornecer um resultado final, com prova de toxigenicidade no máximo em 48 horas. Esta segunda parte será assunto de trabalho ulterior.

MATERIAIS E MÉTODOS

Meio de cultura básico — De acôrdo com Elek ³, o meio deve ser preparado da seguinte maneira: dissolver 4 gr de proteose-peptona (Difco), 0,6 gr de maltose e 0,14 ml de ácido láctico em água destilada. O volume é completado para 100 e o pH ajustado a 7,8. Uma solução a 3% de agar em sôro fisiológico a 1% é feita e clarificada por filtração através de papel, a reação ajustada a pH 7,8. Deve ser novamente clarificada pelo tratamento com carvão e filtrada em papel. Partes iguais das soluções de peptona e agar são misturadas e distribuídas em tubos na quantidade de 10 ml para cada, em seguida esterilizados em vapor por 30 minutos em 3 dias sucessivos. A antitoxina, usada por Elek, é uma suspensão purificada de globulinas, diluída com sôro fisiológico de modo a conter 1.000 unidades por ml. As tiras de papel de filtro devem medir 6x1,5 cm e são esterilizadas previamente no forno.

Como rotina de nosso trabalho, adotamos as seguintes modificações da técnica original de Elek:

Meio básico — (Modificado por Frobisher ⁵).

| | |
|------------------------------|----------|
| Proteose-peptona Difco | 20 gr |
| Maltose Difco | 3 gr |
| Ácido láctico P.A. | 0,7 ml |
| Agar granulado Difco | 15 gr |
| Cloreto de sódio P.A. | 5 gr |
| Água destilada | 1.000 ml |

Os ingredientes são dissolvidos em banho-maria fervente e o pH ajustado a 7,8. As quantidades devem ser medidas acuradamente. Distribuir em tubos, 10 ml para cada. Esterilizar no autoclave durante 15 minutos, a 120° C. Guardar na geladeira.

ANTITOXINA

Usamos a antitoxina diftérica do Instituto Butantã, numa diluição contendo 500 unidades por ml, cuja concentração se mostrou perfeitamente satisfatória.

PLACAS DE PETRI

Foram usadas placas medindo 100x10 mm e tiras de papel de filtro de 6x1,5 cm, esterilizadas no autoclave e mantidas na estufa para secagem.

SORO

Foi usado o soro de cavalo, que se mostrou, segundo Frobisher⁵, tão satisfatório quanto o de coelho, sendo os soros humano e de carneiro considerados inferiores.

EXECUÇÃO DO TESTE

O agar básico (10 ml) era fundido e esfriado a 50° C; 2 ml de soro de cavalo estéril era adicionado, misturado e distribuído numa placa de Petri (de 100x10). Com o agar ainda fluido, era colocada a tira de papel, que havia sido previamente saturada em antitoxina diftérica contendo 500 unidades por ml. Depois de endurecido o agar, as placas eram colocadas na estufa até se tornarem completamente secas, e semeadas no mesmo dia.

As inoculações eram feitas de culturas de 24-72 horas, em caldo, formando uma linha contínua um ângulo reto com a tira de papel. Cuidados foram sempre tomados para evitar que a superfície do agar fôsse quebrada. As placas eram observadas 24, 48 e 72 horas.

AMOSTRAS USADAS

Tôdas as amostras utilizadas neste trabalho fazem parte da coleção de bactérias do nosso Departamento. Foram isoladas e identificadas pelo Dr. Dácio de Almeida Cristóvão⁶, que usou como teste de toxigenicidade, a prova intracutânea em coelho, de Frazer⁷. Esta prova, que inclui a verificação da especificidade da reação pela sua neutralização no teste controle pela antitoxina específica, não deixa margem a dúvidas sobre a identidade da bactéria.

RESULTADOS

O quadro abaixo mostra o resultado de 156 testes.

| Amostra | Número | Toxigenidade em animal | | Teste "in vitro" | |
|----------------------------------|--------|------------------------|----------|----------------------|----------|
| | | Positivo | Negativo | Positivo em 48 horas | Negativo |
| C. diphtheriae ... | 119 | 119 | — | 119 | — |
| C. diphtheriae (avirulentos) ... | 15 | — | 15 | — | 15 |
| C. xerose | 5 | — | 5 | — | 5 |
| C. pseudodiphtheriticum | 17 | — | 17 | — | 17 |
| | 156 | 119 | 57 | 119 | 57 |

Um número muito escasso de testes "in vitro" foi discretamente positivo em 24 horas e os resultados obtidos em 48 horas não mudaram no decorrer de mais 24 horas, a não ser numa acentuação de linhas. Por êste motivo computamos apenas os obtidos em 48 horas. Além de 72 horas, observamos o aparecimento de linhas subsidiárias em algumas placas. Depois de 72 horas, o teste já sai do domínio prático de nosso interesse, para exigir a explicação de interações devidas à difusão de substâncias bacterianas da cultura, com anticorpos correspondentes a elas, presentes no sôro. Se os resultados são lidos após 48 horas, nenhuma confusão advirá desta natureza, pois diversos dias à temperatura ambiente são necessários para o aparecimento destas linhas secundárias. Além de tudo, elas não se apresentam tão nítidas como as outras e exigem quase sempre o auxílio de uma lente para serem visualizadas (Elek³).

DISCUSSÃO

De acôrdo com nossos resultados, o teste "in vitro" mostrou-se 100% concordante com a prova em animal.

Há uma série de fatores que no princípio criam certas dificuldades técnicas, como a eventual contaminação das placas, principalmente o crescimento de colônias da própria amostra em questão, às vêzes exatamente onde se deveriam formar as linhas, por gotículas que se desprendem da alça durante a sementeira. O preparo das placas exige obviamente cuidados especiais. Por uma questão de uniformidade, partíamos sempre de culturas em caldo; entretanto, em experiências feitas à parte, verificamos que, partindo de culturas em meio sólido, consegue-se melhor sementeira, devido à menor probabilidade de desprendimento das referidas gotículas. Quanto aos resultados propriamente ditos, nenhuma diferença observamos. Foram sempre semelhantes.

A tira de papel deve ser completamente recoberta pelo meio, pois, ao contrário, pode haver crescimento paralelo a ela, dificultando a leitura, principalmente se culturas em caldo são usadas.

Paralelamente com a técnica usada, várias outras foram experimentadas, entre as quais, a recomendada por Ouchterlony⁸: as placas são preparadas com agar-sôro. Depois de secas, um retângulo de agar é removido e preenchido com agar-sôro ao qual antitoxina fôra acrescentada na concentração de 500 unidades por ml; as inoculações feitas em ângulos retos com o retângulo. Esta é uma técnica muito elegante do teste "in vitro", cujos resultados foram semelhantes aos da técnica original.

Também tivemos oportunidade de experimentar um meio básico ainda mais simplificado por Frobisher⁹ e por êle denominado M4, que consiste no seguinte:

| | | |
|--------------------------------|------|----|
| Proteose peptone "Difco" | 2 | gr |
| Agar granulado "Difco" | 1,5 | gr |
| NaCl P.A. | 0,25 | gr |
| Água destilada | 100 | ml |

pH 7,8. Esterilizar a 120°C por 15 minutos.

Esta modificação é usada atualmente por Frobisher para a rotina em seu laboratório, considerada por êle como vantajosa sôbre a primeira modificação, pois daria resultados mais nítidos e em alguns casos mais rapidamente, isto é, em 24 horas.

Infelizmente, a única partida que usamos, não funcionou satisfatoriamente. Portanto, não podemos consignar resultados concludentes.

De acôrdo com Elek¹⁰, amostras recentemente isoladas ou mesmo culturas antigas com apenas 24 horas de crescimento, exibem a reação mais rapidamente, isto é, em um dia. Baseados neste fato, estamos estudando comparativamente vários métodos de diagnóstico rápido da difteria, com prova de toxigenicidade.

Outros aspectos do teste também estão sendo investigados, principalmente em relação à concentração e pureza da antitoxina.

RESUMO E CONCLUSÕES

156 amostras da coleção do nosso Departamento foram submetidas ao teste de Elek, usando o meio de cultura básico modificado por Frobisher.

Os resultados obtidos foram perfeitamente concordantes com a prova clássica de virulência em animal.

Resultados semelhantes têm sido assinalados por vários autores.

Trata-se de um novo processo que recomendamos para a rotina dos laboratórios, pois, oferecendo a mesma segurança da prova clássica de inoculação, apresenta as vantagens de simplicidade e economia.

Cuidadasas verificações de todos os ingredientes devem ser feitas, antes que uma nova partida seja posta em uso, com testemunhas positivas e negativas.

Vários aspectos do teste continuam em investigação, como o seu uso para o diagnóstico rápido da difteria e sua execução com diferentes concentrações de antitoxina.

SUMMARY

The in vitro test of Elek for determining the toxigenicity of *C. diphtheriae* has been tried in 156 strains of our bacterial collection. The technique used was not the original one but a modification advised by Frobisher.

The results were identical to the virulence intradermal rabbit test of Frazer.

We recommend the test as a routine laboratory procedure for its reliability, simplicity and economical characteristics.

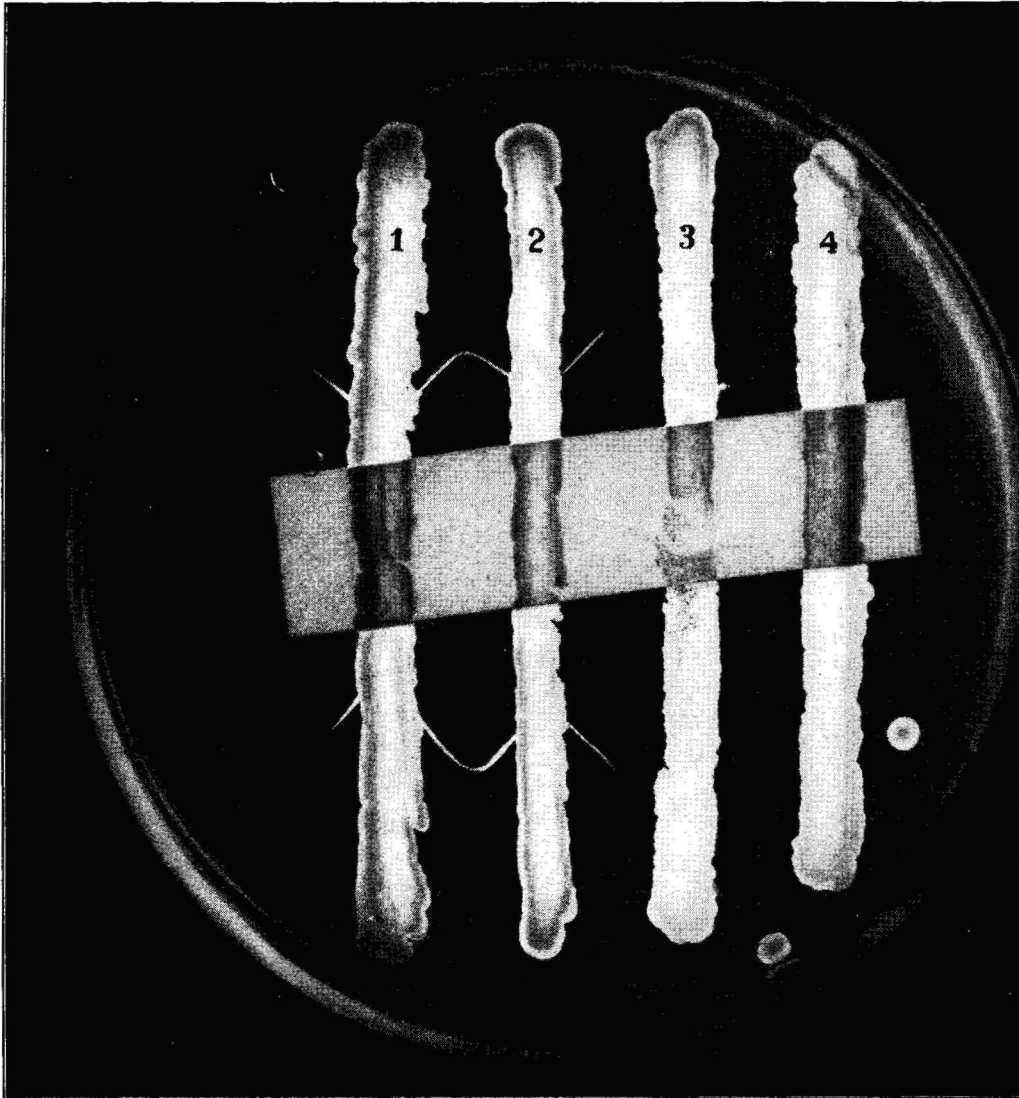
Many aspects of the subject are still under investigation such as its use for the rapid diagnosis of diphtheria and its performance with various concentrations of antitoxin.

AGRADECIMENTOS

Nossos agradecimentos são extensivos aos Prof. Dr. Lucas de Assumpção, Drs. Dácio de Almeida Cristóvão, J. Noronha Peres, J. E. McCartney e Srta. Nilce Schmidt Nunes.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — Nicolle, M., Cesari, E., and Klebain, E. Ann. Inst. Pasteur, **34**:596 (1920).
- 2 — Ramon, G. C. R. Soc. Biol., **86**:661, Paris (1922).
- 3 — Elek, Stephen. The recognition of toxicogenic bacterial strains "in vitro". Brit. M. J., **1**:493 (1948).
- 4 — McCartney, J. E. Comunicação pessoal.
- 5 — King, E. O., Frobisher, M., Jr., and Parsons, E. I. The "in vitro" test for virulence of *C. diphtheriae*. Am. J. Pub. Health, **39**:1314-1320 (1949).
- 6 — Cristóvão, Dácio de Almeida. Fermentação da Sacarose por bacilos diftéricos virulentos. Anais do V Congresso Internacional de Microbiologia, no prelo.
- 7 — Diagnostic procedures and Reagents, 2nd. Ed., 1945, Am. Public Health Association, pg. 304.
- 8 — Ouchterlony, O. An "in vitro" test of the toxin-producing capacity of *C. diphtheriae*, Lancet, **1**:346-353 (1949).
- 9 — Frobisher, M., Jr., King, Elizabeth O., Parsons, Elizabeth. Further studies on the "in vitro" test for virulence of *C. diphtheriae*. Reprinted from Am. J. Pub. Health, vol. **40**, n. 26, June, 1950.
- 10 — Elek, Stephen. The plate virulence test for diphtheria. J. Clin. Path., **2**:250-258 (1949).



As amostras 1 e 2 são toxigênicas e apresentam o aspecto de ponta de lança característico do positivo. As amostras 3 e 4 são avirulentas, teste negativo.