Contribución al diagnóstico bacteriológico rápido de la difteria

La coloración de corpúsculos metacromáticos

por José Pahn y Juan Jorge Villa

Con motivo de un plan de trabajo propuesto por el Dr. Alfredo Manzullo, jefe del Centro de Diagnóstico Bacteriológico de la Difteria del Instituto Bacteriológico "Dr. Carlos G. Malbrán", realizamos desde principios del año 1946, la investigación sistemática de los corpúsculos metacromáticos del *Corynebacterium diphtheriae*, desarrollado en los diferentes medios de cultivo utilizados para el diagnóstico y estudio de estos microorganismos.

I. ANTECEDENTES

Como es sabido, estos corpúsculos fueron señalados por primera vez por Babes (1) en el año 1886 y dos años más tarde por Ernst (2), en número de uno o dos, generalmente mono o bipolares, y considerados como constituyentes característicos del bacilo de la difteria, aun cuando estos mismos autores, en investigaciones posteriores los encontraron formando parte de otras bacterias, especialmente cocos y neumococos.

Desde entonces hasta el momento actual, el uso de estos corpúsculos como elementos de diagnóstico, ha sufrido diversas alternativas de acuerdo con los distintos autores y las diversas técnicas de coloración propuestas para su identificación.

Así, si tomamos los datos consignados por F. W. Andrewes (3) y colaboradores en la obra que sobre el estudio de la difteria publicara el Medical Research Council de Londres, el el año 1923, vemos que, según M. Neisser, en el año 1913, el 29 % de los casos que habían desarrollado como difteria en los medios de cultivo, pudieron ser revelados como tales en el examen directo por la coloración

Presentado en la reunión de comunicaciones del 19 de agosto de 1947.

de Neisser, y en un 59 % con la coloración de Gins (4), que es una modificación de la anterior. De 230 casos culturalmente negativos, sólo uno dió resultado positivo en el examen directo con la coloración de Gins. Luego Gildemeister y Günther en el año 1914, sobre 85 casos culturalmente positivos encontraron 23,5 % de positivos por la coloración de Neisser, y, siempre en el examen directo, 47 % con la modificación de Gins. Schürmann y Pringsheim en 1915, sobre 99 casos positivos en los medios de cultivo encuentran 27 % y 43 % de positivos con la coloración de Neisser y Gins respectivamente. Reiter en el año 1915, sobre 103 casos culturalmente positivos encuentra el 52,4 % y 55,3 % de casos positivos en el exudado directo para las coloraciones de Neisser y Gins respectivamente.

Mucho más recientemente, y aquí en la Argentina, R. Schwartz y R. Consoli (5) en una reseña sobre los métodos bacteriológicos en el diagnóstico de la difteria, afirman que sobre 98 casos que fueron positivos en el medio de Horgan y Marshall, 94,8 % fueron también positivos en el examen directo con la coloración de Neisser o Albert (6), indistintamente, y sobre 28 casos negativos en el mismo medio de cultivo, el 89,20 % también lo fué negativo con esas coloraciones en el examen directo.

Con tales antecedentes, y teniendo conocimiento de que esta coloración de corpúsculos metacromáticos es empleada actualmente por algunos, en el diagnóstico precoz de la difteria, lo que constituye una de las principales tareas de este Centro, hemos emprendido la labor de tratar de descubrir la existencia del *Corynebacterium diphtheriae* en los frotis directos del material que se nos envía, a fin de contribuir de esta manera al diagnóstico bacteriológico rápido de esta enfermedad.

II. MATERIAL Y MÉTODO

Para ello, practicamos, con cada uno de los exudados estudiados, dos "frotis", uno destinado a la investigación del bacilo diftérico por la coloración de Gram-Koppeloff-Bermann, y el otro destinado a revelar la existencia de los corpúsculos metacromáticos del bacilo mediante la coloración de Albert modificada por Laybourn (7), según la siguiente fórmula propuesta por el "Standard Methods of the Division of Laboratories and Research of the New York Stats Department of Health", de Augustus Wadsworth, 2ª edición, 1929, página 34.

Solución Nº 1:

Azul de toluidina	0,15	grs.
Verde de malaquita	0,20	,,
Acido acético glacial	1	c.c.
Alcohol de 95°	2	,,
Agua destilada	100	,,

(Dejar en reposo 24 horas y filtrar)

Solución Nº 2:

Iodo metaloídico	2 grs.
Ioduro de potasio	3 „
Agua destilada	300 c.c.

Centro.

Después de fijar el preparado por el calor, lo cubrimos con la solución Nº 1, a la que dejamos actuar durante cinco minutos (la técnica original establece un término de 3 a 5 minutos). Lavamos con agua corriente y lo cubrimos con la solución Nº 2 durante otros cinco minutos (la técnica original prescribe 1 minuto). Lavamos una vez más, secamos el preparado y hacemos la observación microscópica.

Los "hisopos" con los exudados se sometieron luego al procedimiento que rutinariamente usamos en el Centro de Diagnóstico Bacteriológico de la Difteria, es decir, se les añadió el medio líquido de Manzullo y se los incubó en la estufa a 37°C. durante tres y seis horas, al cabo de cada una de las cuales hicimos un "frotis", que coloreamos con el método de Gram-Koppeloff-Bermann para comprobar la presencia del *Corynebacterium diphtheriae*. Luego, se sembraron estos "hisopos" en el medio de Horgan y Marshall, para su "control" y el ulterior aislamiento de las cepas.

CASOS ESTUDIADOS Y RESULTADOS NUMÉRICOS

De esta manera, hemos estudiado 400 casos —es decir, 400 "frotis" directos de otros tantos "hisopos"— cuyos resultados, comparados con los que acusó el medio líquido de Manzullo —en 3 y 6 horas— y el de Horgan y Marshall, se pueden constatar en los cuadros Nº 1 y Nº 2. La comparación con estos dos medios de cultivo, cuya bondad será objeto de un próximo trabajo, tiene por objeto establecer si los bacilos que poseen corpúsculos metacromáticos son o no diftéricos, ya que los exudados que sembrados en el medio de Horgan y Marshall dan desarrollo positivo, son sin lugar a duda exudados diftéricos en casi el 100 % de los casos, como lo atestiguan las estadísticas realizadas en nuestro Centro (*), y que utilizaron como "control" la prueba de la virulencia de Eagleton y Baxter. A fin de dar un cuadro más completo, hemos comparado también los datos obtenidos en la observación de los "frotis" directos con los resultados del cultivo en el medio de Loeffler, que también usamos en nuestro

(*) Datos que constan en el trabajo presentado por Conrado Villegas (h.) y C. A. N. Daglio (8) en la comunicación del 31 de octubre de 1944.

Queremos expresar aquí nuestro agradecimiento al compañero y amigo de siempre, Conrado Villegas, que ha intervenido directamente en la confección de los cuadros y esquemas que ilustran este trabajo, y no ha escatimado nunca su consejo oportuno y desinteresado.

De los datos anteriores se desprenden las siguientes conclusiones: de los 400 casos estudiados, 156 tenían bacilos con las características morfológicas del *Corynebacterium diphtheriade,* es decir, tenían difteromorfos en el examen directo, y 244 no los mostraban. Ahora bien, de los 156 casos primeros, 84 tenían corpúsculos metacromáticos y 72 no los tenían. De los 84 casos con corpúsculos, 68 fueron positivos a la 3ª y a la 6ª hora de incubación en el medio líquido de Manzullo y 16 dieron resultado negativo en el mismo medio, lo que expresado en otra forma significa que de los 84 casos con corpúsculos metacromáticos en el examen directo, y que a su vez tenían difteromorfos, el 80,95 % dió resultado positivo y el 19,04 % restante lo dió negativo en el medio líquido de Manzullo, medio éste que usamos sistemáticamente en nuestro Centro para el diagnóstico precoz de la difteria, en 3 horas como mínimo y 6 como máximo; de los 72 casos que no tenían corpúsculos metacromáticos, 5 dieron resultado positivo en el medio líquido y 67 fueron negativos, lo que importa un 6,94 % para los casos positivos y un 93,05 % para los negativos.

Tomemos ahora, los 244 casos que no mostraban difteromorfos en el examen directo. De ellos, 34 tenían corpúsculos y 210 no los tenían; de estos 34 casos primeros, 19 fueron positivos en el medio líquido y 15 fueron negativos, lo que equivale al 55,88 % para los positivos y al 44,11 % para los negativos. Los 210 casos restantes dieron 4 casos positivos y 206 negativos, en el mismo medio, es decir, 1,90 % de casos positivos y 9810 % de casos negativos.

Sumando y a modo de resumen podemos decir: que de los 400 casos estudiados, 118 tenían corpúsculos metacromáticos en el examen directo y 282 no los tenían; de esos 118 casos, 87 fueron positivos en el medio líquido y 31 fueron negativos, lo que da un 73,72 % de casos positivos y un 26,27 % de casos negativos; de los 282 casos restantes y que no tenían corpúsculos, 9 fueron positivos y 273 negativos en el mismo medio, es decir 3,19 % de casos positivos y 96,80 % de casos negativos.

Debemos hacer notar ahora, que entre los casos que tenían corpúsculos metacromáticos en el examen directo, hemos incluído también a los corpúsculos que en ocasiones presentan los *Leptotrichias buccalis,* y que en nuestro estudio encontramos 10 veces. Esto, que aparentemente podría ser causa de error, no lo es tanto, por la distinta morfología y coloración que presentan. En efecto, con la coloración de Albert, modificada por Laybourn, que empleamos, los bacilos diftéricos se colorean de un verde pálido y los corpúsculos en pardo o negro obscuro, mono o bipolares y, menos frecuentemente, dispersos por el cuerpo bacilar, siendo éste siempre corto y delgado Los leptotrichias buccalis que tienen corpúsculos metacromáticos, que son los menos, son largos, gruesos, con sus corpúsculos grandes que sobresalen de los bordes del microorganismo, menos intensamente coloreados con el colorante de Albert, presentándose sus corpúsculos

en mayor número que para el bacilo diftérico; el cuerpo del leptotrichia se colorea de pardo o añil muy débil. Estos caracteres pueden objetivarse en las adjuntas fotomicrografías Nº 1, 2 y 3.

Deduciendo, pues, estos 10 casos con corpúsculos metacromáticos, pero que pertenecían a gérmenes no diftéricos, llegamos a las siguientes cifras definitivas:

Casos estudiados	Corpúsculos metacromáticos	Resultado en el medio de Manzullo	Porcentajes
400	Hay: 108 casos	Positivos: 87	80,55 %
		Negativos: 21	19.44 %
	No hay: 292 casos	Positivos: 9	3,08 %
		Negativos: 283	96,91 %

	Corpúsculos metacromáticos		Medio líquido de Manzullo	
Concordancia		92,50 %		87 casos positivos 283 casos negativos
Discordancia	positivos	5,25 %	negativos	21 casos
	negativos	2,25 %	positivos	9 casos
		100,00 %		400 casos

CONCLUSIONES

De las cifras que anteceden, surgen las siguientes conclusiones: a) la investigación de los corpúsculos metacromáticos en el examen directo de los exudados sospechosos de ser diftéricos, tiene una importancia no despreciable en el diagnóstico rápido de esta enfermedad, ya que esta coloración, que no tarda más de 15 minutos, puede combinarse con el cultivo en el medio líquido de Manzullo en 3 y 6 horas, lográndose así un diagnóstico aun más precoz, con las ventajas que lógicamente se desprenden y que, en definitiva, son las causales que guiaron este trabajo; b) el estudio de los corpúscuos metacromáticos en el examen directo da un alto porcentaje de concordancia (92,50%) con los resultados suministrados por el cultivo en el medio líquido de Manzullo; c) los casos de discordancia con este medio de cultivo, pecan más por exceso (5,25 %), que por defecto (2,25 %).

CUADRO N.° 1

EXAMEN DIRECTO

Difteromorfos	*Corpúsculos metacromáticos*		*Medio de Manzullo*	*Medio de Horgan y Marshall*		*Medio de Loeffler*	*Total de casos*
HAY	HAY	+	3ª. hora	+	24 hs.	+	62
						—	
					48 hs.	+	1
						—	
				—	24 y 48 hs.	+	
						—	
			6ª. hora	+	24 hs.	+	5
						—	
					48 hs.	+	
						—	
				—	24 y 48 hs.	+	
						—	
		—	3ª. y 6ª. hora	+	24 hs.	+	
						—	
					48 hs.	+	
						—	
				—	24 y 48 hs.	+	1
						—	15
	NO HAY	+	3.ª hora	+	24 hs.	+	1
						—	
					48 hs.	+	
						—	
				—	24 y 48 hs.	+	
						—	
			6ª. hora	+	24 hs.	+	1
						—	
					48 hs.	+	
						—	
				—	24 y 48 hs.	+	1
						—	2
		—	3ª. y 6ª. hora	+	24 hs.	+	
						—	
					48 hs.	+	5
						—	
				—	24 y 48 hs.	+	3
						—	59
							156

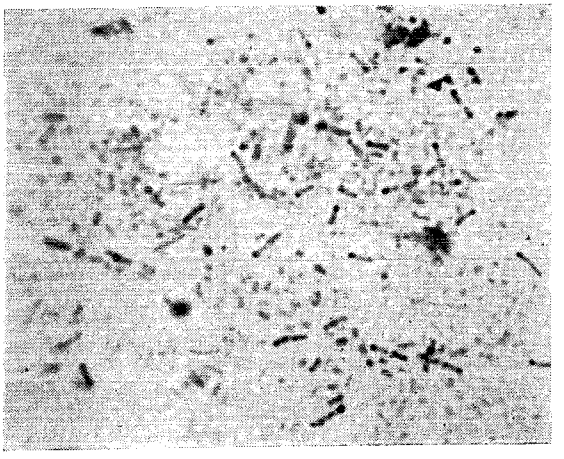

Fig. 1. — Examen directo de exudado faringeo. Coloración de Albert, modificada por Laybourn. Se observan *Corynebacterium diphtheriae* con corpúsculos metacromáticos típicos.

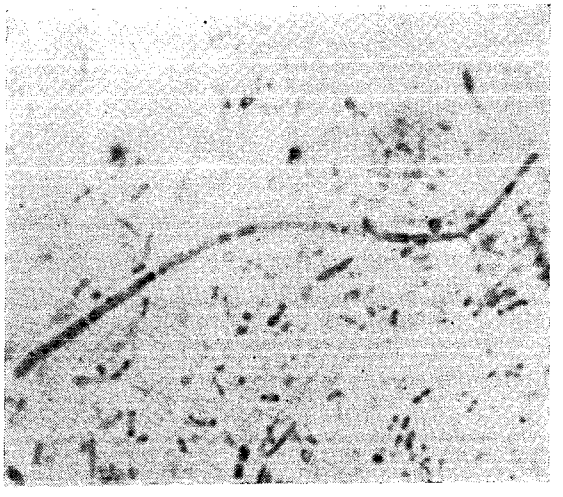

Fig. 2. — Examen directo de exudado faringeo. Coloración de Albert, modificada por Laybourn. Se observan leptotrichias buccalis con corpúsculos metacromáticos Se puede notar la diferencia con los corpúsculos metacromáticos de los *Corynebacterium diphtheriae* que también se observan en el campo.

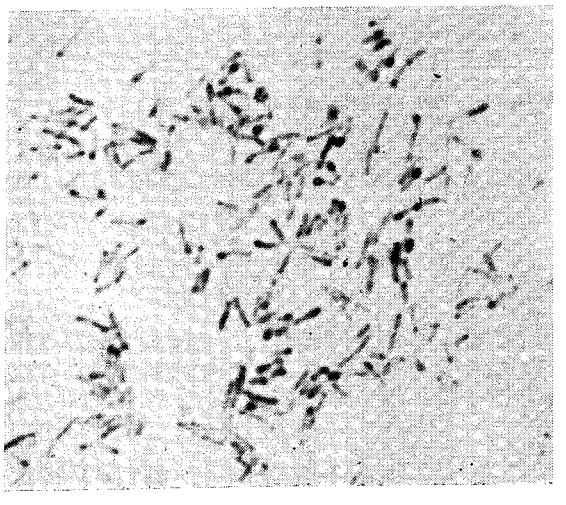

Fig. 3. — *Corynebacterium diphtherica* con corpúsculos metacromáticos provenientes de un cultivo en el medio de Loeffler de 24 horas.

(Compárense los corpúsculos metacromáticos del *Corynebacterium diphtheriae* en el examen directo y en el cultivo de 24 hs. en el medio de Loeffler.)

CUADRO N.º 2

EXAMEN DIRECTO

Differomorfos	*Corpúsculos metacromáticos*		*Medio de Manzullo*	*Medio de Horgan y Marshall*		*Medio de Loeffler*	*Total de casos*
NO HAY	HAY	+	3ª. hora	+	24 hs.	+	14
						—	
					48 hs.	+	
						—	
				—	24 y 48 hs.	+	1
						—	
			6ª. hora	+	24 hs.	+	2
						—	1
					48 hs.	+	
						—	
				—	24 y 48 hs.	+	
						—	1
		—	3ª. y 6ª. horas	+	24 hs.	+	
						—	
					48 hs.	+	
						—	
				—	24 y 48 hs.	+	
						—	14
	NO HAY	+	3ª. hora	+	24 hs.	+	?
						—	
					48 hs.	+	
						—	
				—	24 y 48 hs.	+	
						—	
			6ª. hora	+	24 hs.	+	2
						—	
					48 hs.	+	
						—	
				—	24 y 48 hs.	+	
						—	
		—	3ª. y 6ª. horas	+	24 hs.	+	2
						—	2
					48 hs.	+	1
						—	7
				—	24 y 48 hs.	+	6
						—	188
							244

BIBLIOGRAFÍA

1. BABES V. — Les spores des bacilles de la diphthérie humaine. Bull. Soc. anat. de Par, 1886, 61, 72. — Ueber isoliert färbare Antheile von Bacterien. Ztschr. f. Hyg., 1889, 5, 173, 1 pl. — Beobachtungen über die metachromatischen Körperchen, Sporenbildung, Verzweigung, Kolben und Kapselbildung pathogener Bacterien. Ztschr. f. Hyg., 1895, 20, 412.

2. ERNST PAUL. — Ueber den bacillus xerosis und seine Sporenbildung. Ztschr. f. Hyg., 1888, t. 4, págs. 25-46. — Ueber Kern- und Sporenbildung in Bacterien. Zeschr. f. Hyg., 1889, **5**, 428-483.

3. ANDREWES F. W., BULLOCH W., DOUGLAS S. R., DREYER G., GARDNER A. D., FILDES P., LEDINGHAM J. C. G., y WOLF C. G. L. — Diphtheriae, its bacteriology, pathology and inmunology, Medical Research Council, 1923

4. GINS H. A. — Zur Färbung der Diphtheriebazillen. Deutsche. Med. Wchnschr., 1913, **39**, 502.

5. SCHWARTZ R. y CONSOLI R. — Métodos bacteriológicos en el diagnóstico de la difteria. La Semana Médica. Nov. 18, 1943, pág. 1167, y Rev. Soc. Arg. de Biología, Agosto 1943, 240.

6. ALBERT H. — A new stain for diphtheriae bacillus. Journ. Am. Med. Assoc. 1920, pág. 391. — Diphtheriae bacillus stains with a description of a new one. Am. J. Pub. Health, 1920, 10, 334 (citado por F. W. Andrewes, en "Diphtheriae" publicación del Medical Research Council, 1923). — Modification of stain for diphtheriae bacilli. Journ. Am. Med. Assoc., 1921, 250.

7. LAYBOURN R. L. — A modification of Albert's stain for the diphtheriæ bacillus. Journ. Amer. Med. Assoc. 1924, **83**, 121.

8. VILLEGAS C. (h.) y DAGLIO C. A. N. — Estudio de 2257 cepas de Corynebacterium diphtheriae. Comunicación leída en la reunión del personal técnico del Instituto Bacteriológico "Dr. Carlos G. Malbrán" de la Secretaría de Salud Pública de la República Argentina, correspondiente al 31 de octubre de 1944. (Inédita).

Kolmer J. A. y Boerner F. — Approved Laboratory Technic, 1938, 2a. edición.

Topley W.W. C. y Wilson G. S. The principles of bacteriology and inmunity, 2a. edición, 1941.