

Diferenciação entre *Listeria monocytogenes* e *Erysipelothrix rhusiopathiae* com o Clorêto de Trifeniltetrazólio (*)

Vinicius Moreira Dias e Niber da Paz M. da Silva

Pela semelhança em suas propriedades culturais e bioquímicas, foram as listérias aproximadas do germe causador da erisipela porcina, pretendendo WILSON & MILES (6) incluí-los no gênero *Erysipelothrix* com as espécies *monocytogenes* e *rhusiopathiae*. Entretanto, BARBER (1) e JULIANELLE (4) em estudo comparativo dos referidos gêneros, não admitem essa possibilidade.

Observando, paralelamente, as características morfológicas e citológicas de *L. monocytogenes* e *E. rhusiopathiae*, tivemos a oportunidade de verificar o seu comportamento quando em contato com clorêto de 2, 3, 5 — trifeniltetrazólio (TTC).

Os sais de tetrazólio têm sido experimentados por muitos pesquisadores em diferentes germes, visando a demonstrar zonas de atividade desidrogenásica dentro do corpo bacteriano pelo aparecimento de granulações coradas de formazana, resultantes da transformação do tetrazólio, revelando a presença de mitocôndrias nas bactérias.

Este trabalho, além de confirmar pesquisas anteriores em relação a mitocôndrias na célula bacteriana, tem como objetivo descrever um método diferencial, simples e rápido, para os gêneros *Listeria* e *Erysipelothrix*.

As experiências foram orientadas em dois sentidos: 1.º) — verificar macroscopicamente, em meios líquido e sólido, a atividade redutora para o TTC usando amostras pertencentes aos dois gêneros; 2.º) — fazer o estudo morfológico e citológico, em microscopia ótica e eletrônica, das bactérias tratadas com TTC.

MATERIAL E MÉTODOS

Usamos amostras típicas, lisas, de *L. monocytogenes*, (n.ºs 7 973, 5 348, 5 105, 5 214 da coleção de Seeliger, respectivamente tipos sorológicos I, II, III e IV de Paterson) e culturas de *E. rhusiopathiae* (n.ºs 1, 7, 11, 27, 37 da coleção de Wix).

(*) Seção de Bacteriologia do Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro — Brasil.

Recebido para publicação em 11/6/1958.

I — Redução em meio líquido

Os germes foram semeados em 2 ml de caldo simples mais 5% de sêro normal de cavalo, em tubos de hemólise, e incubados durante 24 hs., a 37°C. Então, foi adicionado 0,1 ml de uma solução aquosa, esterilizada, a 1%, de clorêto de 2, 3, 5 — trifeniltetrazólio (“Synthetical Laboratories”, Chicago, U.S.A.) para cada ml de meio de cultura com crescimento bacteriano. Os tubos postos à temperatura ambiente (25°C), ou na estufa (37°C), foram observados, regularmente, em prazos curtos.

Desde os 5 minutos iniciais, quando foi feito o primeiro exame, notou-se nos tubos com listérias o aparecimento de coloração vermelha (fig. 1), característica da formazana, que se acentuava, com o decorrer do tempo, de baixo para cima (figs. 2, 3, 4 e 5), devido à sedimentação natural dos germes ou, talvez, a condições de anaerobiose, que favoreciam a reação. Ao fim de 24 hs. a côr, que aumentara gradativamente, era intensa em tôda a cultura.

Nos tubos contendo *E. rhusiopathiae* (figs. 1, 2, 3 e 4), submetidos a igual tratamento com TTC e em condições experimentais idênticas, só foi percebida discreta coloração rósea aproximadamente após 2 hs. de contato. Ao fim de 24 hs., a intensidade de côr não se igualava à dos tubos com *L. monocytogenes*.

II — Redução em meio sólido

Placas de Petri com 15 ml de agar simples com 5% de sêro normal de cavalo, contendo 0,1 ml de solução aquosa, esterilizada, de TTC a 1%, foram semeadas com *L. monocytogenes* e incubadas a 37°C. Depois de 24 hs., notou-se a presença de colônias coradas em vermelho, o que já havia sido constatado por GRAY & COLS. (3).

Placas idênticas, semeadas com *E. rhusiopathiae*, não apresentaram mudança de côr, mesmo com 24 hs. de incubação a 37°C.

Colocando discos de papel de filtro, prèviamente umedecidos com TTC e dessecados, diretamente sôbre *L. monocytogenes* crescidas em placa de agar sêro (cultura de 24 hs.) não se observou redução. O resultado foi também negativo, para os discos umedecidos na solução, ou quando utilizamos a técnica de tubos porosos, empregada na dosagem de penicilina.

III — Estudo morfológico e citoquímico

a) Ao microscópio ótico (ocular 10X e objetiva 90X), com luz artificial, em exame a fresco, foram observadas, primeiramente, as culturas em meio líquido, depois de tratadas durante 1 hora com TTC.

Depois, preparações foram feitas utilizando meio semi-sólido ou uma gôta da cultura (prèviamente fixada com formaldeído a 3%) e posta para secar naturalmente ou na estufa a 37°C.

Notamos que as listérias se apresentavam hialinas, de forma e dimensões normais, contendo uma, duas ou três granulações vermelho-púrpura, intracelulares, polares, bipolares e centrais.

No caso do *E. rhusiopathiae* os bacilos eram transparentes, morfológicamente normais mas não se encontravam granulações coradas intracitoplasmáticas.

b) Para a microscopia eletrônica preparamos o material do seguinte modo: tubos com 2 ml do meio líquido, foram semeados com *L. monocygenes* e *E. rhusiopathiae*, a partir de culturas de 24 hs., em meio líquidos e crescidas à temperatura ambiente. Com 4 hs. de estufa, a 37°C, quando o crescimento bacteriano já era visível macroscopicamente, adicionamos aos tubos de prova, 0,2 ml de solução aquosa, esterilizada, de TTC a 1% e incubamos mais 1 ou 2 horas nessa temperatura. Outros tubos foram preparados como testemunhas, sem TTC. Findo esse tempo, fixamos as culturas com formol (4 gotas de formaldeído a 40% para cada tubo), estabilizando, assim, a redução em formazana corada, então bem evidente nos tubos com listérias. Centrifugamos durante 30 minutos e, após desprezar os sobrenadantes, foram suspensos os diferentes sedimentos em água destilada esterilizada e feita nova centrifugação desprezando-se o sobrenadante. O material foi conservado em refrigerador, dum dia para o outro. As preparações para microscopia eletrônica foram feitas por HANS MUTH, da Secção de Microscopia Eletrônica do I.O.C., de acôrdo com a técnica usual de montagem em membrana de parlódio e dessecação por meio de calor.

Foi utilizado o microscópio eletrônico RCA, tipo EMU-2C, para observação direta e para obtenção de fotografias da preparação simples e sombreada por meio de crômio em ângulo de 10°.

No exame do material não sombreado as listérias testemunhas apresentavam contôrno nítido e regular, freqüentemente agrupadas ou dispostas lado a lado. No corpo bacteriano, de citoplasma bastante denso, estruturas internas não foram facilmente vistas. Em alguns campos, notaram-se zonas mais escuras, intracitoplasmáticas, dispostas nas extremidades das células. Envolvendo estas, havia um halo diferenciado, que julgamos ser artifício proveniente de técnica (fig. 6).

Comparando as listérias submetidas ao TTC com as testemunhas, achamos seu aspecto diferente, apesar da dificuldade que encontramos em obter campos onde os germes não estivessem fortemente agrupados.

Nas preparações com TTC, os corpos bacilares não apresentavam a mesma regularidade no contôrno. O citoplasma parecia menos opaco, possuía granulações polares, algumas medianas e periféricas, entremeadas de zonas claras, possivelmente vacúolos (fig. 7). Em uma das preparações (com TTC 2 hs.), vimos um campo apresentando formas alongadas, tendo zonas de condensação citoplasmática e com 1 ou 2 protuberâncias terminais e subterminais deformando o corpo da bactéria (fig. 8), o que fazia lembrar estruturas semelhantes observadas em *Proteus vulgaris* (5).

Estudando o material sombreado pareceu-nos menor a diferença entre as listérias tratadas ou não com TTC. Na testemunha (fig. 9), as células eram mais uniformes, de contôrno regular e condensação polar,

enquanto que, no material com TTC, havia retração citoplasmática na parte mediana da célula, sobressaindo, nos polos, granulações que supomos de formazana (fig. 10).

Incidentalmente observamos células em divisão, apresentando, ainda, septo transversal (fig. 10), confirmando a multicelularidade vista por BISSET (2) no período logarítmico de multiplicação bacteriana.

As bactérias do gênero *Erysipelothrix*, ao microscópio eletrônico, pareceram-nos menos alteradas do que as listérias pelo tratamento com TTC. Efetivamente, a comparação entre o material testemunha (figs. 11 e 12) e o de prova (figs. 13 e 14) não deixa perceber modificações estruturais.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Os sais de tetrazólio têm sido empregados como indicadores de atividade enzimática redutora em tecidos e bactérias, por vários pesquisadores. Também alguns acreditam que zonas citoplasmáticas de atividade redutora dêsses sais, evidenciadas dentro do corpo bacteriano pelo aparecimento de granulações de formazana, corresponderiam às mitocôndrias das células dos organismos superiores (para uma revisão vêr 5).

Em nossas experiências com *L. monocytogenes*, pudemos constatar, facilmente, em exame a fresco, a presença de estruturas coradas dentro das células, poucos minutos depois de adicionar-se TTC à cultura. Entretanto, com *E. rhusiopathiae*, num prazo de observação até de 2 hs., não conseguimos individualizar granulações vermelhas no interior do corpo bacteriano.

Esta diferença de comportamento levou-nos às seguintes conclusões:

a) a atividade enzimática redutora das bactérias pertencentes aos gêneros *Listeria* e *Erysipelothrix* para o clôreto de 2, 3, 5 — trifeniltetrazólio é diferente, principalmente dentro das 2 hs. iniciais de contato.

b) as listérias, quando cultivadas em meio líquido, reduzem imediatamente o TTC em formazana, que transmite à cultura intensa coloração vermelha. Em meio sólido, a redução é bastante demorada, sendo bem visível com 24 hs.

c) as bactérias do gênero *Erysipelothrix*, em condições experimentais idênticas, só reduzem o TTC após duas horas, sem atingir, mesmo ao fim de 24 hs., a intensidade de coloração observada para as listérias. Em meio sólido, com 24 hs., aparentemente não reduz.

d) o TTC é reduzido no interior das células de *Listeria*, formando granulações coradas de localização polar, bipolar e central.

e) o aparecimento rápido dessas granulações nas listérias faz-nos acreditar, confirmando estudos de outros autores, na existência de zonas no interior do corpo bacteriano, que podem estar relacionadas às mitocôndrias.

f) finalmente, a utilização do TTC, para as bactérias crescidas em meio líquido, poderá servir como uma prova a mais para a diferenciação dos germes pertencentes ao gêneros *Listeria* e *Erysipelothrix*.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos Profs. HEINZ SEELIGER (Hygiene-Institut der Universität Bonn) e PAUL WIX (Microbiology Dept.-University of Nottingham) pelas culturas gentilmente enviadas e ao Dr. HANS MUTH (I.O.C.) pela valiosa colaboração na parte referente à microscopia eletrônica.

SUMÁRIO

Experiências foram realizadas com bactérias dos gêneros *Listeria* e *Erysipelothrix*, em meios líquido e sólido, utilizando o clorêto de 2, 3, 5 — trifeniltetrazólio.

A atividade enzimática redutora das listérias para o TTC foi diferente da do *E. rhusiopathiae*, principalmente em meio líquido e nas horas iniciais de observação.

Preparações feitas para microscopia ótica e eletrônica dos germes tratados com TTC revelaram a presença de granulações polares, bipolares e centrais dentro do corpo das listérias.

A evidenciação de granulações coradas de formazana, intracelulares nas listérias, confirma estudos anteriores quanto à possibilidade da existência de mitocôndrias nas bactérias.

SUMMARY

Based on a similarity of cultural and biochemical properties, WILSON and MILES (6) compared the microorganisms of listeriosis with those of swine erysipelas including them in the genus *Erysipelothrix* with the species *E. monocytogenes* and *E. rhusiopathiae*. However, BARBER (1) and JULIANELLE (4), in a comparative study of both microorganisms, do not admit that possibility.

Observing the morphological and citochemical characteristics of *L. monocytogenes* (N.^{os} 7 973, 5 348, 5 105, 5 214, of the Seeliger collection) and *E. rhusiopathiae* cultures (N.^{os} 1, 7, 11, 27, 37, of the Wix collection), both in phase "S", we were able to verify their comparative behavior when in contact with 2-3-5-triphenyltetrazolium chloride (TTC), "Synthetical Laboratories, Chigaco, , U.S.A."

1. To 1,0 ml of cultures of both microorganisms grown in plain broth plus 5% horse serum for 24 hours at 37°C, 0.1 ml of sterilized 1% aqueous solution of TTC was added. The tubes were left at room temperature ($\pm 25^\circ\text{C}$) or in the incubator (37°C).

In the tubes with *L. monocytogenes* immediately appeared a red coloration (fig. 1) characteristic of formazan production, that became gradually more pronounced, from bottom to top (figs. 2, 3, 4, 5); at the end of 24 hours the color was intense throughout the tube.

In the tubes with *E. rhusiopathiae* (figs. 1, 2, 3, 4), only a faint pink coloration was seen after 2 hours; at the end of 24 hours, the intensity of color was not equal to that observed in tubes with *L. monocytogenes*.

2. Petri dishes with 15 ml of plain agar with 5% horse serum, containing 0.1 ml of 1% sterilized aqueous solution of TTC, were inoculated with *L. monocytogenes* and *E. rhusiopathiae*, and incubated for 24 hours at 37°C. Colonies of *L. monocytogenes* that developed presented a red color, indicative of formazan, as previously described by GRAY et al. (3), while the *E. rhusiopathiae* colonies did not show any coloration.

3. Disks of filter paper, previously soaked with TTC and dried were placed over the growth of *L. monocytogenes* in Petri dishes with plain agar plus 5% horse serum for 24 hours. No change in the color of the colonies was observed. The same negative result was obtained when the porous clay cylinder technique for measuring antibiotic activity was employed. With *E. rhusiopathiae* also negative results were obtained with the disk technique.

4. Wet preparations of the cultures after 1 hour of contact with TTC in the same conditions of item 1, were observed at 900X magnification. *L. monocytogenes* presented normal shape and dimensions, but one to three intracellular polar, bipolar and or central, red-purple granules were noted. *E. rhusiopathiae* bacilli were morphologically normal without colored cytoplasmic granules.

5. For the electron micrographs (RCA electron microscope Model EMU-2C) the microorganisms were grown in 2.0 ml of plain broth with 5% horse serum for 4 hours at 37°C; 0.2 ml of 1% aqueous sterile solution of TTC were added and the tubes reincubated for 1 or 2 hours more at 37°C. At the end of this time the microorganisms were fixed with formaldehyde (2 drops for each ml) centrifuged and washed with distilled sterile water. Cultures without TTC submitted to identical treatment were used as controls.

Preparations of the sediments kept in the refrigerator were made on parlodium membranes, dried by heat and shadowed with chromium at an angle of 10°.

Comparing unshadowed *L. monocytogenes* treated with TTC with the controls, some differences were noted. In preparations with TTC (fig. 7) the contour of the bacillar bodies did not present the same regularity noted in the controls (fig. 6). The cytoplasm appeared less dense, with polar, central and or peripheral granules. In one of the preparations (fig. 8), elongated forms presented 1 or 2 protruding terminal or subterminal granules deforming the body of the bacteria.

In the shadowed material less differences between the microorganisms treated or not treated with TTC were found. In the controls (fig. 9) the cells were more uniform, with regular contour and polar condensation; while in the material with TTC there was cytoplasmic retraction in the median part of the cell, and polar granules probably of formazan (fig. 10).

Cells apparently in division presenting a transverse septum were frequently noted (fig. 10), seeming the multicellularity described by BISSET (2), in other microorganisms.

In bacteria of the genus *Erysipelothrix* morphological changes were not observed when treated with TTC. Comparison between the control material (figs. 11 and 12) and the test material (figs. 13 and 14) did not show structural modifications.

CONCLUSIONS: The differences in behaviour of the two microorganisms may justify the following conclusions:

a) The enzymatic reduction of TTC by the bacteria of the genera *Listeria* and *Erysipelothrix* is different, at least within the 2 first hours of contact.

b) When cultivated in liquid medium *L. monocytogenes* immediately reduces TTC to formazan, which transmits to the culture an intense red coloration. In solid medium, the reduction is well defined after 24 hours of incubation.

c) *E. rhusiopathiae* in identical experimental conditions, reduces TTC only after 2 hours, without reaching, even at the end of 24 hours, the intensity of colorations observed in *L. monocytogenes*. In solid medium, during a period of 24 hours, there is not reduction.

d) TTC is reduced inside the cells of *L. monocytogenes* forming polar, bipolar, and or central colored granules.

e) The rapid formation of these granules in *L. monocytogenes* confirming other studies, led us to believe in the existence of zones in the bacterial body, which may be related to the mitochondria (for a review of the subject see 5).

f) The use of TTC as one test for the differentiation between *L. monocytogenes* and *E. rhusiopathiae* is suggested, for microorganisms grown in liquid medium.

B I B L I O G R A F I A

- 1 — BARBER, M., 1939, A comparative study of *Listerella* and *Erysipelothrix*. *J. Path. and Bact.* 48: 11-23.
- 2 — BISSET, K. A., 1957, Multicellularity in Bacteria. *Erg. Mikrob. Immun. Exp. Therapie.* 30: 1-36.
- 3 — GRAY, M. L., STAFSETH, H. J. & THORP, F. J., 1953, Colonial Variation of *Listeria monocytogenes*. *Bact. Proceedings, U.S.A.*
- 4 — JULIANELLE, L. A., 1941, The identification of *Erysipelothrix* and its relation to *Listerella*. *J. Bact.* 42 (3): 385-394.
- 5 — MELLO, M. T., SILVA, N. P. M. & MUTH, H., 1957, Electron Microscopy of Granules in *Proteus vulgaris* treated with Triphenyltetrazolium chloride. *J. Bact.* 73 (5): 682-683.
- 6 — WILSON, G. S. & MILES, A. A., 1955, Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity, 4th Edition: 479-488.

ESTAMPA 1

Fig. 1 — *Listeria monocytogenes* (La2 e La3) e *Erysipelothrix rhusiopathiae* (E1 e E7) — Testemunhas: tubos a esquerda. Germes tratados com TTC, durante 5 minutos, a direita. Observar o início de coloração vermelha nas culturas de listérias.

Fig. 2 — Idem. Tubos testemunhas e germes em contato com TTC durante 30 minutos. Aumento da cor na parte inferior dos tubos contendo listérias.

Fig. 3 — Idem. Tubos testemunhas e com TTC 1 hora. Coloração bem visível nas listérias, ausente nos tubos com *Erysipelothrix*.

Fig. 4 — Idem. Testemunhas e germes com TTC 2 horas. Redução do TTC em formazana corada nos tubos com listéria. Ausência de redução nos tubos com *Erysipelothrix*.

Fig. 5 — *Listeria monocytogenes* (La2 e La3). Tratada com TTC durante 5 e 30 minutos, 1 hora e 2 horas. Os primeiros tubos a esquerda são testemunhas. Observar o aumento progressivo da coloração vermelha indicadora da presença de formazana.

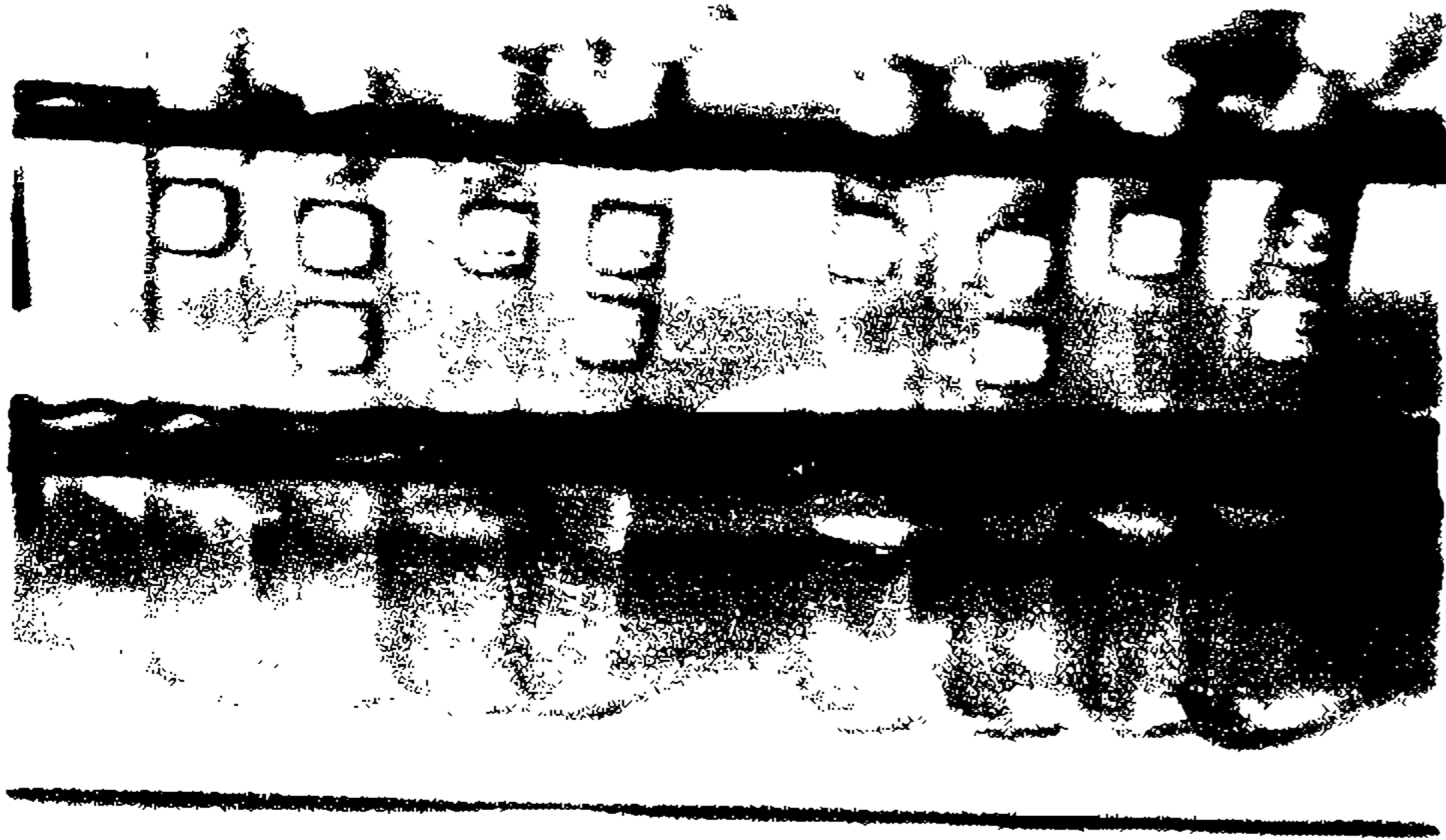


Fig. 1

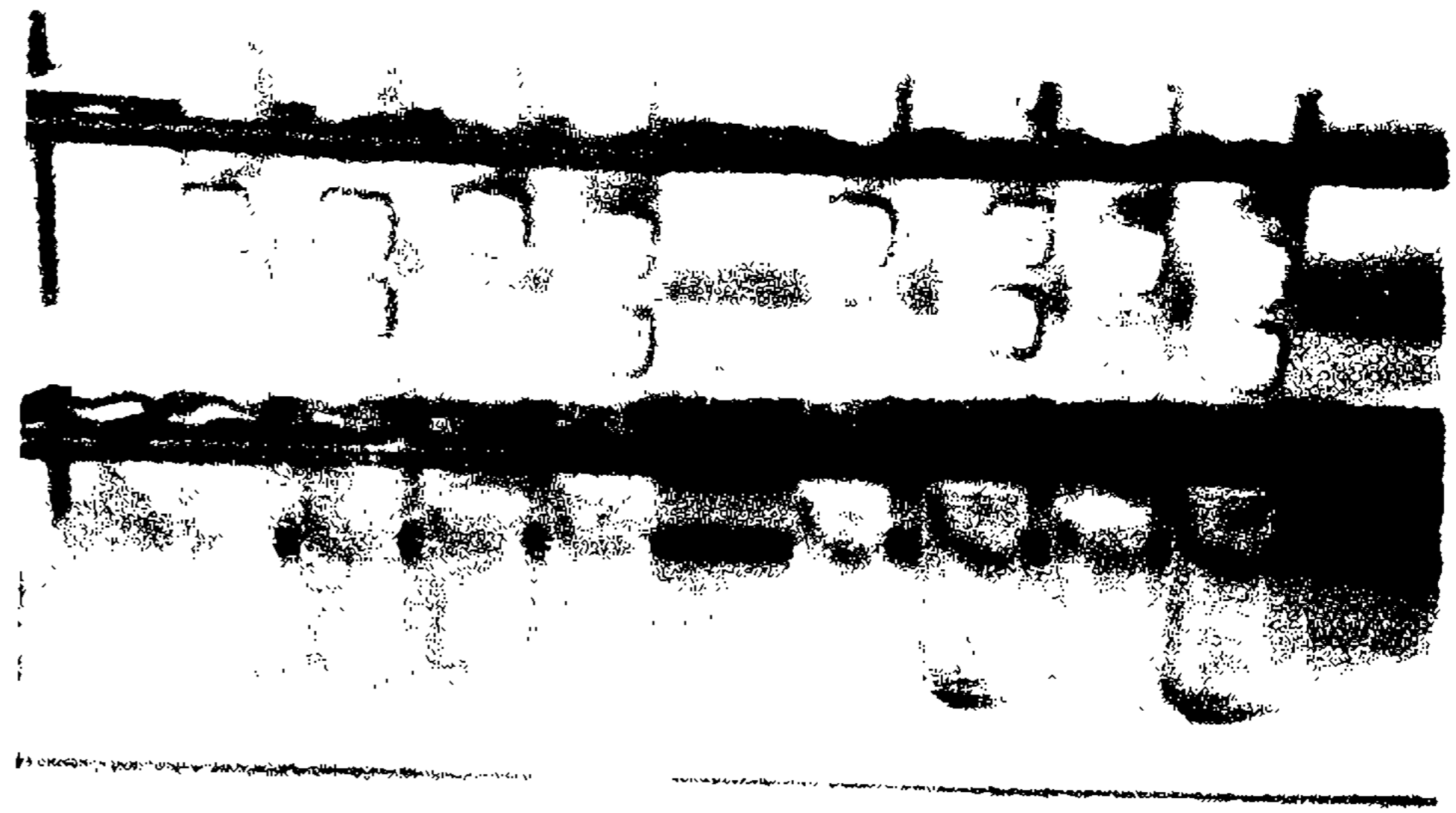


Fig. 2

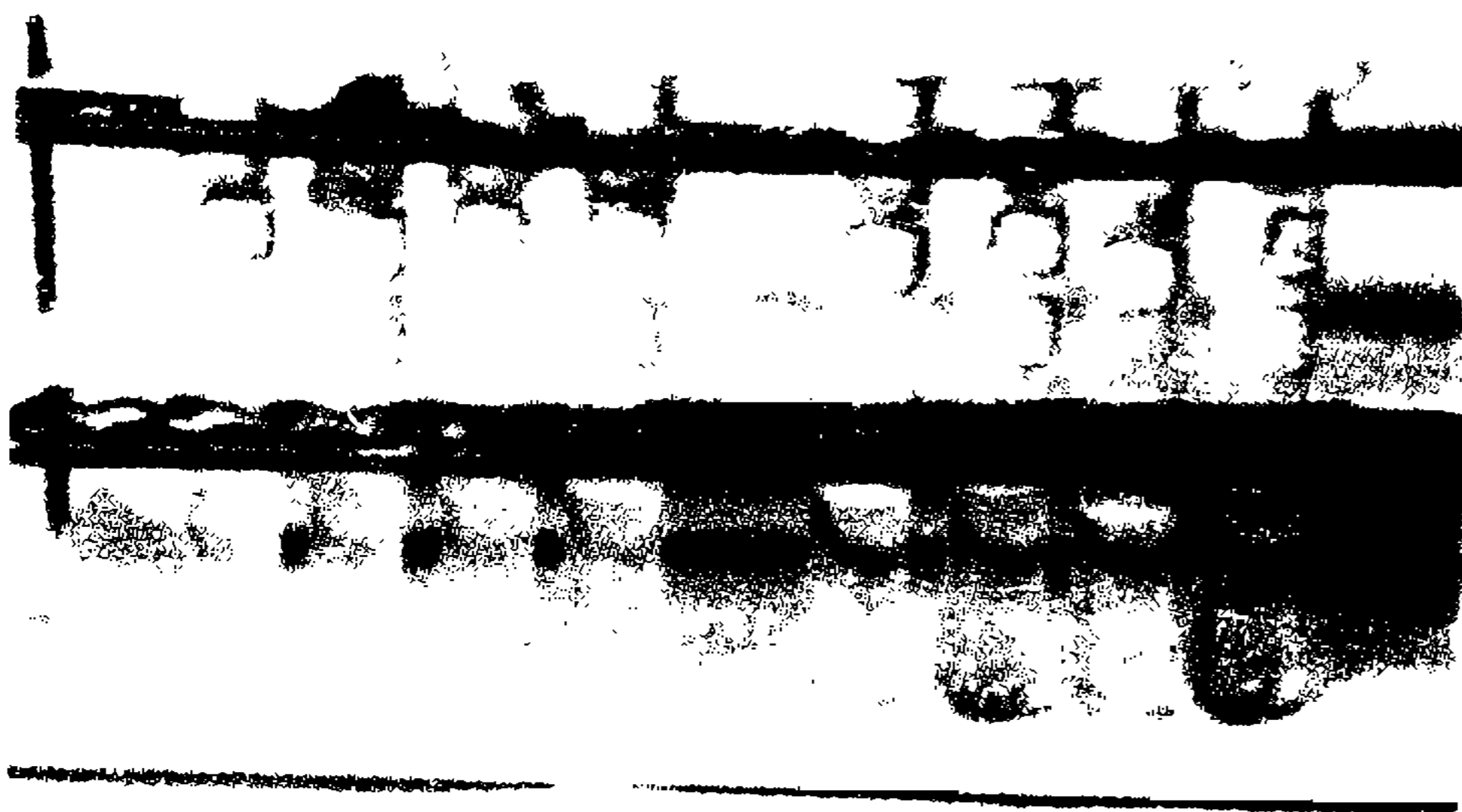


Fig. 3

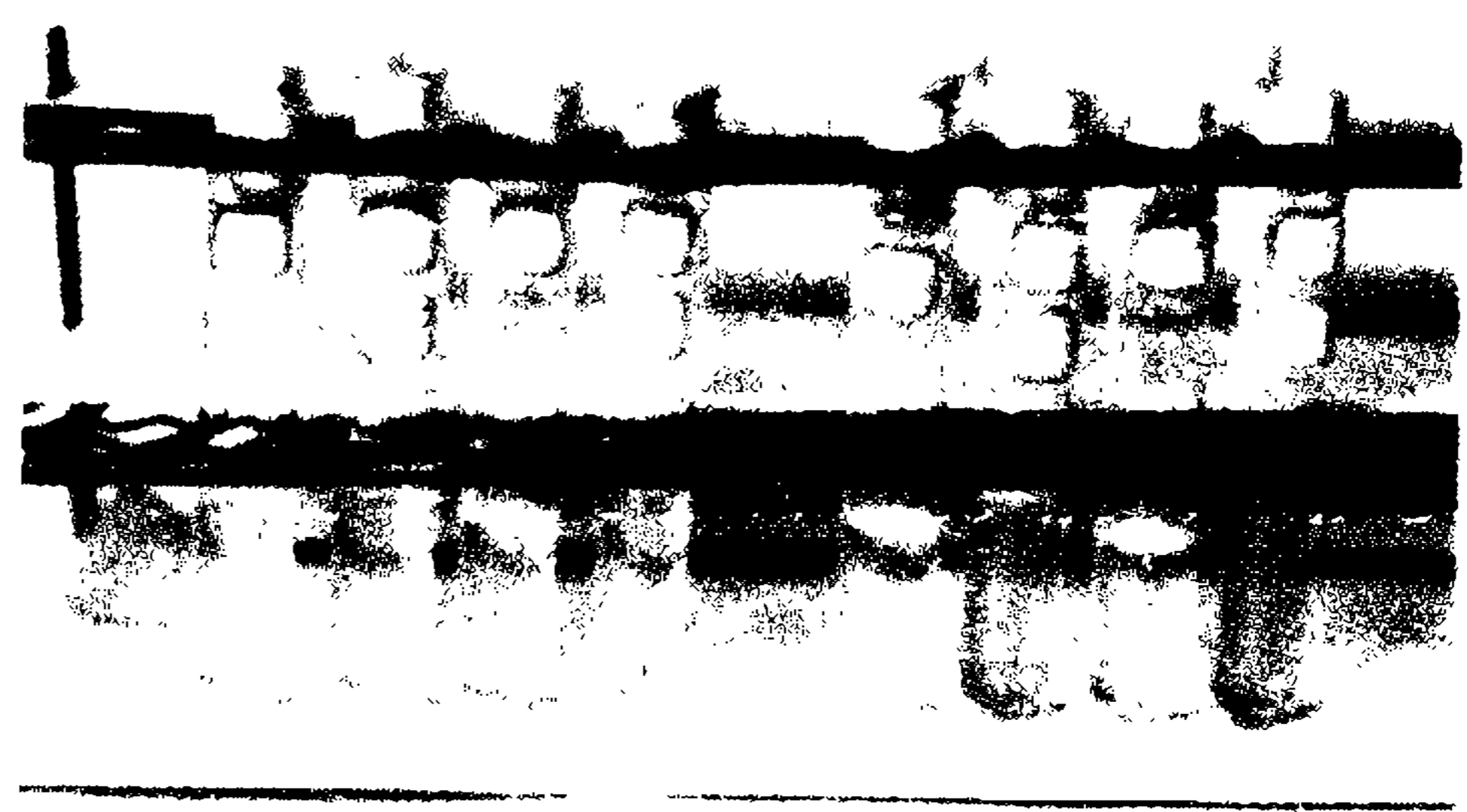


Fig. 4

Fig. 5



ESTAMPA 2

Fig. 6 — *Listeria monocytogenes* — Testemunha fixada com formol. Células regulares; condensações citoplasmáticas polares (7200 X).

Fig. 7 — *Listeria monocytogenes* — Tratada com TTC 1 hora, fixada com formol. Granulações polares, bipolares, medianas e periféricas. Vacúolos. Citoplasma menos denso. (3920 X).

Fig. 8 — *Listeria monocytogenes* — Tratada com TTC 2 horas, fixada com formol. Protuberâncias terminais e subterminais, zonas de condensação citoplasmática. (7200 X).

Fig. 9 — *Listeria monocytogenes* — Testemunha fixada com formol. Citoplasma homogêneo retraído nos polos do bacilo. (Sombreada com crômo-10.º; 6300 X).

Fig. 10 — *Listeria monocytogenes* — Tratada com TTC 2 horas, fixada com formol. Retração do citoplasma, granulações polares; septo transversal freqüente. (Sombreada com crômo-10.º; 6300 X).

Fig. 11 — *Erysipelothrix rhusiopathiae* — Testemunha fixada com formol. Contorno regular, condensações citoplasmáticas. (13000 X).

Fig. 12 — *Erysipelothrix rhusiopathiae* — Testemunha fixada com formol. Formas regulares. (Sombreada com crômo-10.º; 7800 X).

Fig. 13 — *Erysipelothrix rhusiopathiae* — Tratado com TTC 2 horas, fixado com formol. Citoplasma menos denso. (10300 X).

Fig. 14 — *Erysipelothrix rhusiopathiae* — Tratado com TTC 2 horas, fixado com formol. Citoplasma menos homogêneo, algumas condensações. (Sombreada com crômo-10.º; 7800 X).

