

EMPREGO DO ÁCIDO ROSÓLICO NA IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DO GÊNERO *BRUCELLA*

USE OF ROSOLIC ACID IN THE IDENTIFICATION OF SPECIES OF THE GENUS *BRUCELLA*

SEBASTIÃO DE CAMARGO CALAZANS (1)
CELSO SOARES HABERBECK BRANDÃO (2)

SUMMARY

CALAZANS, S.C. & BRANDÃO, C.S.H. — Use of rosolic acid in the identification of species of genus *Brucella*. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 32: 37-40, 1972.

The utilization of the rosolic acid (dyphenyl-cresol-carbinol anhydride) in chromobacteriostasis tests is described as an additional element for the identification of the species *Brucella suis*.

INTRODUÇÃO

O processo de cromobacteriostase, desenvolvido em 1943 por HUDDLESON², por sua simplicidade, a par de excelentes resultados práticos, é largamente empregado na diferenciação das espécies *melitensis*, *abortus* e *suis* do gênero *Brucella*. Entretanto, não pode ser considerado como decisivo, pois realmente diferencia apenas as espécies-tipos e nem sempre os demais tipos se comportam uniformemente nas diferentes faixas de concentração inibitórias dos corantes utilizados.

Visando a melhoria da capacidade discriminativa do método em causa, foi estudado, no presente trabalho, o emprego do ácido rosólico (anidrido de difenol-cresol-carbinol), em complementação à técnica de Huddleson.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Material

1.1 Ácido rosólico (anidrido de difenol-cresol-carbinol)⁽³⁾

1 g dissolvida em 50 ml de álcool absoluto, completado o volume até 100 ml com água destilada.

1.2 Soluções de fucsina básica e tionina, preparadas conforme Huddleson, utilizando lotes de corantes de atividade conhecida, segundo recomendação da Comissão de Peritos da Organização Mundial de Saúde (4).

a) Solução de fucsina básica: solução a 0,1% em água destilada esterilizada; deve ser preparada cada 60 dias.

b) Solução de tionina: solução a 0,1% em água destilada esterilizada; deve ser preparada cada 60 dias.

1.3 Meios de cultura

1.3.1 Ágar-triptose

Bacto-Tryptose (5)	20 g
Cloreto de sódio	0,5 g
Água destilada	100 ml
Bacto-Agar(5)	1,8 g

(1) Do Instituto Adolfo Lutz.

(2) Do laboratório I de Taubaté, S.P., do Instituto Adolfo Lutz.

(3) E. Merck, p.a., n.º 627.

(4) Fucsina básica — certificado n.º NF 58; tionina — certificado n.º 16 (Comité Mixte FAO/OMS d'Experts de la Brucellose — Deuxieme rapport — OMS Ser. Rapp. Techn., 1953, p. 67)

(5) Difco

Aquecer, em vapor fluente, até perfeita dissolução; esfriar a 60°C; acertar o pH a 6,8 — 7,1. Distribuir em balões de 100 ml; esterilizar a 120°C por 15 minutos.

1.3.2 Ágar-infusão de fígado (Stafseth-Huddleson)¹.

a) Infuso de fígado: misturar, em uma panela, 500 g de fígado de boi passado na máquina e 500 cm³ de água de torneira; cobrir a panela e aquecer em vapor fluente durante 20 minutos; misturar novamente o conteúdo e aquecer em vapor fluente mais 1 hora e meia; coar através de uma peneira para reter as partículas mais grosseiras e filtrar através de algodão de vidro.

b) Para preparar 1 litro de caldo de fígado:

Infuso de fígado	500 cm ³
Água de torneira	500 cm ³
Peptona	10 g
Cloreto de sódio puro	5 g

Aquecer em vapor fluente uma hora, deixar resfriar a 60°C, ajustar o pH a 7,0 e aquecer novamente em vapor fluente durante 1/2 hora. Filtrar em algodão de vidro, distribuir e esterilizar a 110°C, 1/2 hora. O pH final deverá ser próximo de 6,6.

c) Dissolver 20 g de ágar em 1 litro de caldo de fígado preparado como indicado precedentemente, filtrar em algodão de vidro, distribuir e esterilizar a 110°C, 1/2 hora. Para o isolamento a partir de material muito contaminado, adicionar a cada litro de ágar-fígado, 5 cm³ de uma solução a 0,1% de violeta de genciana (conc. final 1/200 000), a fim de inibir germes de contaminação gram-positivos.

1.3.3 *Brucella*-Ágar (1): preparado de acordo com as indicações do fabricante.

1.3.4 Ágar-infusão de batata (2): preparado de acordo com as indicações do fabricante.

1.4 Estirpes utilizadas:

a) *B. abortus* 1119-3, utilizada pelo Departamento de Indústria Animal, E.U.A., na preparação de antígenos⁷;

b) *B. abortus* 456, proveniente do Centro de Moléstias Transmissíveis, Atlanta, E.U.A., utilizada por SCHUBERT & HERNDON⁸ na preparação de antígenos de Wright experimentais;

c) *B. abortus* 544 (Weibridge)

d) *B. suis* S-6, utilizada pelo Centro de Estudos da Brucelose, de Montpellier, França, para a preparação de antígenos⁶;

e) *B. suis* 1130 (Mineápolis);

f) *B. melitensis* 16 M (Beltsville).

As amostras *B. abortus* 544, *B. suis* 1130 e *B. melitensis* 16 M são recomendadas pelo Comité Misto de Peritos da Brucelose, da O.M.S., como estirpes-padrão especialmente adequadas às provas de padronização da cromobacteriostase.

Foram utilizadas amostras verificadas apresentarem-se em fase lisa, conforme os conceitos atualmente em vigor^{3,4,9}.

2. Método

Foram sempre empregados meios sólidos, de fabricação recente. Os corantes, nas concentrações indicadas, foram juntados aos meios fundidos e estes eram aquecidos em banho-maria a 50°C por 5 minutos para obtenção de uma distribuição homogênea. Os meios foram, em seguida, distribuídos em placas de 100 x 20 mm, que eram colocadas em estufa a 37°C até desaparecimento da água de condensação.

As diluições finais dos corantes foram:

a) Ácido rosólico: 1/10.000; 1/20.000; 1/30.000; 1/40.000; 1/50.000; 1/80.000 e 1/100.000;

b) Fucsina básica e tionina: 1/50.000 e 1/100.000.

Os inóculos das várias amostras de brucelas foram preparados cultivando-se 48 horas em tubos de *Brucella*-Ágar. Para semeadura das

(1) Albimi Laboratórios, n.º A 115.

(2) Difco, n.º B 51.

placas foi utilizado o induto bacteriano colhido com alça calibrada de 1 mm de diâmetro interno⁵ (duas alçadas suspensas em 1 ml de solução fisiológica). As sementeiras foram feitas em estrias, em placas divididas em setores, para efeito comparativo; foram utilizados ágar-fígado, *Brucella*-ágar, ágar-infusão de batatas e ágar-triptose. As placas foram incubadas a 37^o C, durante 96 horas.

RESULTADOS

Inicialmente, foram examinados os quatro meios de cultura utilizados, para verificação das condições nutritivas mais adequadas ao

crescimento das amostras empregadas. O *Brucella*-Ágar e o ágar-fígado conduziram a resultados mais exatos e constantes no que se refere à intensidade e caracteres morfológicos do crescimento bacteriano; entretanto, também o ágar-infusão de batatas e o ágar-triptose permitiram resultados satisfatórios, embora menos nítidos. Assim sendo, foram escolhidos os dois primeiros meios para as observações subseqüentes.

Para determinação da faixa de diluições determinantes de cromobacteriostase, foram realizadas dez determinações, cujos resultados estão expressos no quadro I:

QUADRO I

Ação bacteriostática do ácido rosólico sobre amostras de Brucella. Resultados de 10 observações em meio Brucella-ágar, com 48 h de incubação a 37^o C

Espécies	Diluições						
	1:10.000	1:20.000	1:30.000	1:40.000	1:50.000	1:80.000	1:100.000
abortus	C	C	C	C	C	C	C
melitensis	C	C	C	C	C	C	C
suis	I	I	C	C	C	C	C

I — Inibição de crescimento
C — Crescimento

A influência do tempo de incubação foi verificada como mostra o quadro II:

QUADRO II

Ação bacteriostática do ácido rosólico a 1:20.000 sobre amostras de Brucella, em meio de ágar-fígado e incubação a 37^o C, a 24, 48, 72 e 96 h de observação

Espécies	Tempo de incubação			
	24 h	48 h	72 h	96 h
abortus	+	++	++	++
melitensis	—	+	+	++
suis	—	—	—	—

+ Crescimento
— Ausência de crescimento

CONCLUSÕES

Pelos resultados apresentados pode-se verificar:

a) A ação bacteriostática do ácido rosólico em diluições até 1:20 000 e após 48 h de incubação é nítida com referência à *Brucella suis*, não apresentando o corante efeito inibidor, em qualquer concentração, sobre as espécies *abortus* e *melitensis*.

b) Os quatro meios testados — ágar-triptose, ágar-infusão de fígado, *Brucella*-ágar e ágar-infusão de batatas — embora, com pequenas variações, podem ser utilizados nas provas de cromobacteriostase.

c) A prova descrita poderá ser utilizada, juntamente com as provas clássicas – pela fucsina básica e tionina – como mais um elemento para caracterização de espécies do gênero *Brucella*.

RESUMO

CALAZANS, S.C. & BRANDÃO, C.S.H. – Emprego do ácido rosólico na identificação de espécies do gênero *Brucella*. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 32: 37-40, 1972.

O emprego do ácido rosólico (anidrido de difenol-cresol-carbinol) em provas de cromobacteriostase é descrito como mais um elemento para identificação da espécie *Brucella suis*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BIER, O.G. – *Bacteriologia e Imunologia, em suas aplicações à Medicina e à Higiene*. 11.ed. São Paulo, Melhoramentos, 1963. p. 820.
2. HUDDLESON, I. F. et alii – *Brucellosis in man and animals*. Rev. ed. New York, Commonwealth, 1943 p. 49.
3. Ibid p. 13.
4. KAPLAN, M.M. – *Preparation du vaccin de Brucella abortus*. Ginebra, World Health Organization, 1965. p. 14 (WHO/Bruc/40).
5. MANTHEI, C.A. – *Methodes – type et autres d'isolement, d'identification et de classification des espèces de Brucella*. Ginebra, World Health Organization, 1965. p. 5. (WHO/Bruc/67).
6. RENOUX, G. – *Anticorps bloquants dans le serum de sujets brucelliques*. Ginebra, World Health Organization, 1965. p. 1 (WHO/Bruc/13).
7. SCHUBERT, J.M. & HERNDON, J.F. – Study of certain factors affecting the agglutination test for brucellosis. *Pb. Hlth Rep.* 65(2): 885–890, 1950.
8. Ibid. p. 888.
9. WHITE, P. G. & WILSON, J. B. – *Differentiation des colonies lisses et non lisses de Brucella*. Ginebra, World Health Organization, 1965. p. 1. (WHO/Bruc/35).