

## MEIO DE CULTURA PARA IDENTIFICAÇÃO PRESUNTIVA DE BACILOS INTESTINAIS GRAM-NEGATIVOS <sup>(1)</sup>

### CULTURE MEDIUM FOR PRESUMPTIVE IDENTIFICATION OF GRAM-NEGATIVE ENTERIC RODS

ETTORE RUGAI <sup>(2)</sup>  
AMAIR DE ARAUJO <sup>(2)</sup>

#### SUMMARY

A culture medium for presumptive identification of enteric Gram-negative rods was studied.

The base stands on production of indol, L. tryptophane deaminase, acid or acid and gas from glycolose and saccharose, urease, H<sub>2</sub>S and on the aspect of the bacterial growth.

The lactose, usually employed as substract for the differentiation of the *E. coli*, was substituted by the gas-indol reactions.

It was also employed the reaction of L. tryptophane deaminase for differentiation of members of *Providencia* group.

#### INTRODUÇÃO

O primeiro meio de cultura para identificação presuntiva de bacilos intestinais Gram-negativos, permitindo a observação de várias reações em um só tubo, foi descrito por RUSSEL <sup>1</sup>.

Modificações desse meio foram propostas para aumentar o número de respostas, e a sensibilidade.

Dessas modificações destacam-se a de KLIGLER <sup>2</sup>, SULKIN & WILLET <sup>3</sup>, que introduziram a reação do H<sub>2</sub>S; SINGER <sup>4</sup> que introduziu a prova da urease e a de BARACCHINI <sup>5</sup> que é a combinação desses meios.

Nesses meios, as amostras de *E. coli* fermentadoras tardias da lactose apresentam reações semelhantes às dos germes patogênicos produtores de gás. As bactérias do grupo *Providencia* também apresentam, com esses meios, reações semelhantes às dos germes patogênicos produtores ou não de gás.

O meio que apresentamos neste trabalho elimina essas falhas pois identifica a *E. coli*

pelas reações gás-indol, e os germes do grupo *Providencia*, pela L-triptófano desaminase <sup>(3)</sup>.

Essas reações foram adotadas por serem sempre positivas e precoces.

#### MATERIAL E METODOS

##### MEIO DE CULTURA

###### a) Base

Triptona .....	10 g
Extrato de carne .....	2 g
Cloreto de sódio .....	5 g
Fosfato dissódico (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O)	2 g
L. triptófano .....	1 g
Solução alcoólica de azul de bromotimol a 1,5% .....	2 ml
Agar "Difco" <sup>(4)</sup> .....	11 g
Água destilada q.s.p. ....	1 000 ml
pH 7,4	

(1) Trabalho realizado na Secção de Coprocultura da Diretoria de Microbiologia e Diagnóstico do Instituto Adolfo Lutz.

(2) Do Instituto Adolfo Lutz.

(3) Esta reação será citada como LTD, daqui por diante!

(4) Outro agar pode ser empregado desde que seja determinada a quantidade ótima.

Adicione todos os elementos à água e aqueça à fervura até dissolver. Ajuste ao pH 7,4 com solução de hidróxido de sódio a 4%. Filtre em algodão. Complete o volume de 1 litro com água destilada. Distribua em balões. Esterilize a 120°C, durante 20 minutos.

b) *Solução de indicador e substratos*

Citrato de ferro amoniacal .....	2 g
Tiosulfato de sódio (Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .5H <sub>2</sub> O) .....	2 g
Sacarose .....	80 g
Glicose .....	10 g
Uréia .....	40 g
Água .....	85 ml

Coloque todos os elementos em um vidro esterilizado, de 150 ml. Arrolhe com rólha de cortiça. Aqueça a 65°C com agitação freqüente, até dissolver. Esterilize mergulhando o vidro em água até o gargalo e aqueça a 65°C, durante 1 hora.

c) *Preparo final do meio*

Base (a) .....	800 ml
Solução (b) .....	14 ml

Fundada a base, resfrie a 65°C aproximadamente. Adicione a solução, com assepsia. Distribua mais ou menos 3 ml em tubos de 12x120 mm, esterilizados, cujo tampão contenha reativo de indol descrito adiante. Incline os tubos deixando uma base de 3 cm de altura aproximadamente. Incube durante 48 horas para controlar a esterilidade. O meio apresenta cor azul-esverdeada.

REATIVO PARA INDOL

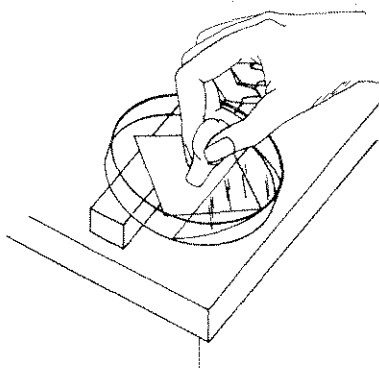
a) *Fórmula*

p-Dimetilaminobenzaldeído .....	1 g
Ácido ortofosfórico (D = 1,70) .....	20 g
Álcool .....	50 ml
Água destilada q.s.p. ....	100 ml

Dissolva o p-dimetilaminobenzaldeído no álcool. Adicione o ácido ortofosfórico e a água. Coloque em vidro com rólha esmerilhada.

b) *Aplicação do reativo no algodão*

Esterilize tubos de 12x120 mm, com tampão de algodão hidrófilo. Coloque mais ou menos 10 ml do reativo para indol em uma placa de Petri inclinada e com um pedaço de papel de filtro no fundo. Retire o tampão de algodão do tubo e toque a ponta do papel de filtro um pouco acima do nível do reativo, conforme o desenho abaixo. Recoloque o tampão no tubo que receberá o meio de cultura. Trabalhe com assepsia.



SEMEADURA E INCUBAÇÃO

Semeie em tôda a superfície e pique profundamente a base. Incube de 18 a 24 horas.

MODIFICAÇÕES APRESENTADAS PELO MEIO INOCULADO

1. Meio inalterado, induto bacteriano esbranquiçado.
2. Meio inalterado, induto bacteriano escuro.
3. Base amarela, ápice azul = ácido em glicose.
4. Base amarela com bolhas de gás, ápice azul = ácido em glicose com produção de gás.
5. Base e ápice amarelos, com grande produção de gás que projeta o meio para cima (a parte superior do ápice pode apresentar-se azul-esverdeada) = ácido

em glicose e sacarose com grande produção de gás.

6. Base amarela e prêta<sup>(1)</sup> ápice azul = ácido em glicose e produção de H<sub>2</sub>S.
7. Base amarela e prêta com bolhas de gás, ápice azul = ácido em glicose com produção de gás e H<sub>2</sub>S.
8. Base amarela e prêta com bolhas de gás, ápice amarelo = produção de H<sub>2</sub>S, ácido com glicose e sacarose com produção de gás.
9. Base amarela, ápice verde<sup>(2)</sup> = ácido em glicose e produção de LTD.
10. Base azul, ápice verde = produção de urease e LTD.
11. Base azul e prêta<sup>(3)</sup>, ápice verde = produção de urease, H<sub>2</sub>S, e LTD.
12. Ponta do tampão de algodão vermelho-maravilha = produção de indol.

Pelas indicações referidas as enterobactérias podem ser presuntivamente classificadas de acôrdo com a chave na página seguinte.

#### DISCUSSÃO E RESULTADOS

A lactose como substrato diferencial entre a *E. coli* e outros bacilos intestinais Gram-negativos não é o ideal para um meio de cultura cuja leitura deve ser feita entre 18 e 24 horas de incubação, pela existência de amostras fermentadoras tardias da lactose. Mais racional é o emprêgo das reações gás-indol sempre positivas e precoces.

Os germes do grupo *Providencia*, nos meios similares citados, não se diferenciam dos germes patogênicos produtores de gás ou não por falta de substrato apropriado. Essa diferenciação tornou-se possível pela introdução da reação da LTD, sempre positiva e precoce<sup>6</sup>.

O gênero *Proteus* também poderia ser diferenciado dos outros germes intestinais pela prova de LTD, dispensando, portanto, o emprêgo da uréia. Êste substrato foi mantido para diferenciar o *Proteus rettgeri* e o *Proteus morganii* do grupo *Providencia*. A *Alcaligenes faecalis* e as *Pseudomonas* que não alteram o meio diferenciam-se entre si porque sômente as *Pseudomonas* dão um enduto bacteriano escuro.

Os demais germes apresentam no meio descrito características semelhantes às apresentadas em meios similares citados.

Apesar do grande número de indicações possíveis, o meio proposto não estabelece diferenciação entre *Salmonelas*, *Arizona* e *Citrobacter*.

O mesmo acontece entre o grupo *Hafnia* e as *Salmonelas* assulfidrígenas.

A identificação da *Klebsiela* e do *Aerobacter* continua dependendo das provas quantitativas (crescimento e produção de gás abundantes).

Testado na Secção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, o meio demonstrou ser de grande eficiência e superior aos similares na identificação da *E. coli* e do grupo *Providencia*.

#### RESUMO

Foi estudado um meio de cultura para identificação presuntiva de bacilos intestinais Gram-negativos.

O meio baseia-se na produção de indol, LTD, urease, H<sub>2</sub>S, ácido ou ácido e gás em glicose, ácido e gás em sacarose e no aspecto do enduto bacteriano.

A lactose como substrato diferencial para a *E. coli* foi substituída pelas reações gás-indol.

Foi introduzida a reação da L-triptófano desaminase para diferenciação dos germes do grupo *Providencia*.

(1) A côr amarela pode ser observada na parte inferior da base.

(2) Resultado da côr amarelo-acastanhada que se desenvolve no ápice pela LTD positiva, mais a côr azul do indicador.

(3) A côr azul pode ser observada na parte inferior da base.

Chave para classificação presuntiva de bacilos intestinais Gram-negativos, de acordo com as modificações apresentadas pelo meio após 18 a 24 horas de incubação.

Urease +	{	.....				<i>E. Coli</i>										
		{	LTD +	.....				<i>Providencia</i>								
				{	{	ácido e gás +	{	indol +	.....		<i>Proteus</i>					
									{	H <sub>2</sub> S +	sacarose +	{	<i>Citrobacter</i>			
							sacarose -	{			<i>Salmonella</i> <i>Citrobacter</i> <i>Arizona</i>					
							{		indol -	{	H <sub>2</sub> S -	Produção abundante de gás projetando o meio para cima		{	<i>Aerobacter</i> <i>Klebsiela</i>	
								Produção pequena de gás				{	<i>Salmonella</i> <i>Sh. newcastle</i> <i>Sh. manchester</i> <i>Hafnia</i>			
							{	{	{	{	ácido + gás -		{	H <sub>2</sub> S +	.....	
												{			indol +	.....
													{	H <sub>2</sub> S -		.....
{	indol *											.....			<i>Shigella</i> Sub-grupos A-B-C-D	
		{	endoto bacteriano escuro									.....		<i>Pseudomonas</i>		
{	meio inalterado			{	endoto bacteriano esbranquiçado	.....						<i>Alcaligenes</i> <i>faecalis</i>				
		.....														

\* Algumas raças do Sub-grupo B podem dar indol neste meio.

+ Positivo  
- Negativo

*Agradecimentos* — Aos Drs. Augusto E. Taunay e José Roberto Carneiro Novaes, pelo apôio que nos deram para o presente trabalho e aos técnicos Marcelina J. Citrangulo, Ethel Sandoval Peixoto e José Ferreira Brandão, pelo valioso auxílio que nos deram nos trabalhos técnicos.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. RUSSEL, F. F. — The isolation of typhoid bacilli from urine and feces with the description of a new double sugar tube medium. J. Med. Res. 25:217-29, 1911.
2. KLIGLER, I. J. — Simple medium for differentiation of members of the typhoid-paratyphoid group. Amer. J. Publ. Hlth. 7:1042, 1917.
3. SULKIN, S. E. & WILLETT, J. C. — A triple sugar — ferrous sulfate medium for use in identification of enteric organisms. J. Lab. Clin. Med. 25:649-53, 1940.
4. SINGER, J. — Culture of enterobacteriaceae. I. Use of urea triple-sugar Agar. Amer. J. Clin. Path. 20(2):884-5, 1950.
5. BARACCHINI, O. — Identificação de enterobactérias. Meio tríplice açúcar modificado. Hospital (Rio) 49(4):537-9, 1956.
6. RUGAI, E. & RUGAI, R. T. — Meio de cultura para diferenciar o grupo *Proteus* e *Providencia* de outras enterobactérias pela L-triptófano desaminase. Rv. Inst. Adolfo Lutz 24:29-31, 1964.

Recebido para publicação em 12 de novembro de 1968

#### ERRATA

Na chave da página 82, onde se lê *E. coli*, leia-se *Proteus*; onde se lê *Proteus*, leia-se *E. coli*.

---

