

Dermatophilus congolensis. II. MEIO COM MASSA DE CÉREBRO PARA O ISOLAMENTO E CULTIVO¹

LUIZ CELSO HYGINO DA CRUZ²

SINOPSE.— Substituindo-se a infusão de cérebro do “brain heart infusion agar” (Difco) por massa cerebral, foi obtido crescimento do *D. congolensis* a partir de um número cem vezes menor de células. A exigência de massa de cérebro no meio de cultura foi demonstrada em experiências comparativas com extrato de cérebro. Há evidências de que o efeito da massa esteja ligado à grande quantidade de lipídeos presentes nela e, não, a uma influência sobre o potencial de oxido-redução do meio, como nos anaeróbios.

Palavras chaves adicionais para índice: Comparação do crescimento em diferentes meios.

INTRODUÇÃO

A maioria dos pesquisadores utilizou, para isolamento e cultivo do *D. congolensis*, ágar peptonado, ágar sangue ou ágar soro (Bull 1929, Stableforth 1937, Hudson 1937, Mason & Bekker 1934, Edgar & Keast 1940, Thompson 1954, Nisbet & Bannatyne 1955, Chodnik 1956, Roberts 1957a,b, 1963a,b, Roberts & Vallely 1962, Plowright 1958, Austwick & Davies 1958, Baxter & Gracey 1958, Bentinck-Smith *et al.* 1961, Pier *et al.* 1963, Egerton 1964, Haalstra 1965, Nicolet *et al.* 1967, Hart *et al.* 1967, Perreau *et al.* 1968, Graber 1969, Shotts & Kistner 1970, Kistner *et al.* 1970). Poucos utilizaram o ágar infusão de cérebro e coração, Difco ou Oxoid. Estão entre eles: Kaplan & Johnston (1966), Barbosa *et al.* (1967, 1968), Gordon (1964). Nestes meios, o isolamento do *D. congolensis* é considerado difícil e nem sempre possível, mesmo estando o germe presente em grande número nas lesões. Os autores verificaram que os crescimentos eram fracos ou não havia crescimento algum, mesmo após incubação prolongada.

Por parecer que as dificuldades encontradas no isolamento, além dos contaminantes, eram devidas ao uso de meios de cultura deficientes, procurou-se, primeiramente, comparar alguns meios e, posteriormente, tentar encontrar um meio que desse melhores resultados.

MATERIAL E MÉTODOS

Os meios de cultura empregados foram os indicados a seguir.

Meios à base de cérebro e coração

Como padrão, foi utilizado o “brain heart infusion agar” (“BHIA”), do laboratório Difco, Michigan, U.S.A., o qual apresenta a seguinte composição:

cérebro de bovino, infusão de	200 g;
coração de bovino, infusão de	250 g;
proteose peptona, Difco	10 g;
bacto-dextrose	2 g;
cloreto de sódio	5 g;
fosfato di-sódico	2,5 g;
bacto ágar	15 g.

¹ Aceito para publicação em 25 de abril de 1974.

Este trabalho é parte da tese apresentada para obtenção do grau de M.Sc. perante o Instituto de Biologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

² Professor Assistente, M.Sc., regente da disciplina de Micologia do Instituto de Biologia da UFRRJ, Km 47, Rio de Janeiro, GB, ZC-26.

Para fins comparativos, foram utilizados um meio semelhante, em composição, ao Difco, e meios onde a infusão de cérebro foi substituída por tecido cerebral, mediante os procedimentos adiante expostos.

Preparação da infusão de coração. A 300 g de coração limpo de vitelo, passado em máquina de moer carne, foram juntados 600 ml de água destilada. Após repouso por 24 h, em geladeira, ferveu-se a mistura durante 15 minutos. A massa foi prensada e, em seguida, filtrada.

Preparação das frações de cérebro. A 378 g de cérebro limpo de vitelo, triturado em liquidificador, acrescentaram-se 378 ml de água destilada. Após fervura por 15 minutos, o material foi passado em tela de arame com poros de 1 mm de diâmetro. O filtrado foi centrifugado a 3.000 rpm (800 x g) durante 15 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante (extrato de cérebro), que ainda se mostrou turvo, foi decantado. O sedimento era constituído de duas camadas, uma pastosa e outra formada de partículas mais grossas (Fig. 1). Essas camadas foram separadas. As frações de cérebro foram adicionadas, separadamente, ao meio básico.

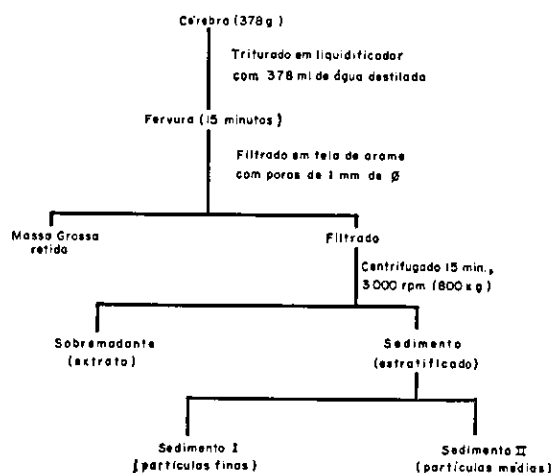


FIG. 1. Etapas da preparação das frações de cérebro.

Preparação do meio básico. A composição do meio básico preparado foi a seguinte:

infusão de coração,	50,0 ml;
proteose peptona (Difco),	2,0 g;
dextrose,	0,5 g;
cloreto de sódio,	1,0 g;
fosfato di-sódico,	1,0 g;
água,	2,5 g.

Preparação dos meios. Com a adição de 43 ml das frações de cérebro ao meio básico, foram obtidos os seguintes meios:

a) meio básico com infusão (extrato) de cérebro: este meio, que era transparente, ao ser esterilizado deu um depósito de aspecto floculento; uma parte dos tubos foi agitada durante o resfriamento, de tal maneira que o depósito se distribuiu homogeneamente pelo ágar, tornando o meio turvo; a outra parte dos tubos foi deixada em repouso, solidificando com as partículas depositadas, mantendo-se o meio transparente;

b) meio básico com partículas finas de tecido cerebral (camada superior do centrifugado);

c) meio básico com partículas médias de tecido cerebral (camada inferior do centrifugado);

d) meio básico com partículas grossas de tecido cerebral (sedimento retido na tela).

Testes com resazurina mostraram que estes meios possuem uma faixa reoxidada semelhante à do meio "BHIA", Difco.

Outros meios

Ágar trypticase extrato de levedura. Este meio era composto de extrato de levedura (BBL) 1%, trypticase (BBL) 2%, cloreto de sódio 0,5%, ágar 2,5%, com pH em torno de 7,4.

Meios com soro. O meio básico foi soro de equino, ao qual foram adicionados os seguintes componentes, separadamente, a fim de se ter uma concentração final de soro de 75%:

caldo simples (proteose peptona, Difco, 1%, extrato de carne, Difco, 0,3%, cloreto de sódio, 0,5%);
caldo glicosado a 1% (meio de Löeffler);
solução salina (cloreto de sódio a 0,85%).

Os meios foram distribuídos em tubos (15 x 180 mm) e aquecidos em forno "Pasteur" a 80°C para coagulação.

Meios com ovo. Foram elaborados três tipos de meios com ovo, utilizando-se ovo integral, somente gema ou somente clara. As três partes de ovo (integral, gema ou

clara), homogeneizado em balão com pérolas de vidro, juntou-se uma parte de salina (sol. de NaCl a 0,85%). Os meios foram distribuídos em tubos (15 x 180 mm) e coagulados em forno "Pasteur" a 80°C, em posição inclinada.

Ágar simples. Teve a mesma constituição do caldo simples, acrescido de 2,5% de ágar.

Ágar sangue. Foi elaborado com ágar simples (fundido e resfriado a 50°C) adicionado de 10% de sangue (desfibrinado e estéril) de equino.

Ágar soro. Foi constituído de ágar simples (fundido e resfriado a 50°C) adicionado de 10% de soro estéril de equino.

Preparação do inóculo

A partir do crescimento (48 h a 37°C) em superfície de ágar infuso de cérebro e coração (Difco), preparou-se uma suspensão em caldo simples. A densidade da turvação foi ajustada ao tubo dez da escala de MacFarland, que equivale a $\pm 10^6$ céls/ml. Desta suspensão foram feitas diluições decimais no mesmo meio, até a concentração de $\pm 10^1$ céls/ml.

Inoculação dos meios

Os meios foram semeados com 1 ml de cada diluição do inóculo.

Incubação

A incubação foi feita em estufa a 37°C, com leituras a partir de 24 h.

RESULTADOS

Comparação de diferentes meios

Os dados no Quadro 1 mostram que o ágar infusão de cérebro e coração, Difco, permitiu crescimento a partir de menor inóculo ($\pm 10^4$ céls/ml). O ágar trypticase extrato de levedura deu crescimento a partir de $\pm 10^5$ céls/ml.

QUADRO 1. Comparação de diferentes meios *

Meios de cultura	N.º de células de <i>D. congolensis</i> semeadas						
	$\pm 10^9$	$\pm 10^8$	$\pm 10^7$	$\pm 10^6$	$\pm 10^5$	$\pm 10^4$	$\pm 10^3$
"BHIA", Difco	+	+	+	+	+	+	0
Ágar tryp. + ext. de levedura	+	+	+	+	+	0	0
Ágar sangue	+	+	+	0	0	0	0
Ágar soro	+	+	+	0	0	0	0
Ágar simples	+	0	0	0	0	0	0
Gema + salina	+	+	0	0	0	0	0
Gema + clara	+	+	+	+	0	0	0
Clara + salina	+	0	0	0	0	0	0
Soro + c. simples	+	+	+	0	0	0	0
Meio de Löeffler	+	+	+	0	0	0	0
Soro + salina	+	0	0	0	0	0	0

* + = crescimento visível, 0 = ausência de crescimento.

Pesquisa sobre meios à base de cérebro e coração

Os dados do Quadro 2 mostram que o crescimento não aumentou quando se utilizou infusão de cérebro mas, sim, com a adição de partículas de tecido cerebral.

Como se vê no Quadro 2, no "BHIA", Difco, somente houve crescimento quando o inóculo encerrava $\pm 10^4$ céls/ml, enquanto que no meio com adição de partículas grossas de massa cerebral se verificou vegetação a partir de um inóculo cem vezes menor ($\pm 10^3$ céls/ml).

QUADRO 2. Comparação de meios à base de cérebro *

Meios de cultura	N.º de células de <i>D. congolensis</i> semeadas					
	$\pm 10^6$	$\pm 10^5$	$\pm 10^4$	$\pm 10^3$	$\pm 10^2$	$\pm 10^1$
"BHIA", Difco	+	+	+	0	0	0
Meio básico ^b acrescido de:						
Infusão (extrato)	+	0	0	0	0	0
Infusão e/sedimento	+	+	0	0	0	0
Partículas finas	+	+	0	0	0	0
Partículas médias	+	+	0	0	0	0
Partículas grossas	+	+	+	+	+	0

* + = crescimento, 0 = ausência de crescimento.

^b Meio básico: infusão de coração 50 ml, proteose peptona 2 g, glicose 0,5 g, NaCl 1 g, fosfato di-sódico 1 g, ágar 2,5 g.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A vegetação lenta, a partir de grande inóculo, e, ainda, formando somente colônias pequenas, mostrou que os meios correntemente utilizados não são adequados para o isolamento do *D. congolensis*.

A finalidade de nosso trabalho, de encontrar um meio que desse melhor crescimento, foi conseguida mediante incorporação de massa cerebral a um meio com infusão de coração. Comparativamente, nossos resultados mostram que se obtém crescimento, no meio com massa cerebral, a partir de inóculo cem vezes menor que o semeado no meio Difco. O fato de o *D. congolensis* exigir massa de cérebro foi demonstrado em experiências comparativas com extrato de cérebro. Enquanto que, nos meios homogeneizados, houve crescimento em toda a superfície, nos que não o foram, a cultura desenvolveu-se apenas no depósito de material cerebral.

O Difco Manual (1965) salienta que, no "BHIA", a infusão de cérebro substitui o valor nutritivo do tecido cerebral. Acrescenta, ainda, que o "BHIA" tem a vantagem de ser um meio transparente e fácil de ser preparado. Entretanto, a fabricação dos meios clarificados priva-os de substâncias essenciais existentes na massa cerebral. O fato de o meio que elaboramos não ser transparente não foi desvantagem para o isolamento do *D. congolensis*.

Não encontramos, na literatura consultada, a indicação de meios com massa de cérebro para fins de cultivo de microrganismos aeróbios, microaerófilos e facultativos. Os primeiros bacteriologistas utilizaram, para cultivar anaeróbios, um caldo com pedaços de cérebro no fundo do tubo procurando obter ambiente de Eh reduzido (Haslam 1920, Hibler 1908, Harrass 1906, Weiss 1921,

Hall 1920, Kovacs 1925). Este procedimento, no entanto, não é mais utilizado e, como diz Meynell e Meynell (1965) "pieces of brain were frequently included in the early media for anaerobes but have been superseded by muscle fragments or reducing agents". Desta maneira, Prévot utiliza como meio padrão para o cultivo de anaeróbios o meio VF ("viande-foie") que é um meio de digeridos de carne e fígado. Ele emprega caldo com massa de cérebro somente para determinação

de caracteres culturais, ou seja, atividade proteolítica de microrganismos (Lebert & Tardieux 1952).

Os meios à base de cérebro, para cultura de microrganismos, sempre contêm extrato de cérebro e não massa cerebral.

A que é devido o bom efeito da massa de cérebro? Para o cultivo de anaeróbios é devido à capacidade dos pedaços de cérebro de produzirem condições anaeróbicas no fundo do tubo. Entretanto, os melhores resultados do meio com massa de cérebro por nós elaborado em comparação com o "BHIA", não podem ser explicados pela diferença de Eh, como se vê nos resultados com resazurina. Isto já era esperado porque o Eh só é influenciado por substâncias solúveis. O efeito da massa de cérebro pode estar ligado à grande quantidade de lipídeos nela presentes. Meynell e Meynell (1965) não estão certos se o cérebro tem função nutritiva ou a de eliminar a toxicidade dos ácidos graxos presentes na infusão e no caldo. Aaronson (1970) diz que ácidos graxos não saturados são, usualmente, exigidos em tão alta concentração que a multiplicação do microrganismo pode, imediatamente, ser interrompida, se eles estão ausentes do meio.

Consideramos que para cultivar o *D. congolensis* são indispensáveis meios com massa de cérebro porque permitem crescimento a partir de poucas células. Isto é importante para o isolamento primário e também para a conservação das amostras.

REFERÊNCIAS

- Aaronson, S. 1970. Experimental microbial ecology. Academic Press. New York. U.S.A. 236 p.
- Austwick, P.K.S. & Davies, E.T. 1958. Mycotic dermatitis in great Britain 1954-1958. Vet. Rec. 70(49):1081-1088.

- Barbosa, M., Carvalho, C.M.F. & Rocha, F.N. 1967. Estreptotricose cutânea em bovinos do Brasil. *Arqs Esc. Vet., Minas Gerais*, 19:15-17.
- Barbosa, M., Moreira, E.C. & Kassai, Y. 1968. Dermatofilose em caprinos e ovinos no Município de Felixlândia, Minas Gerais, Brasil. *Arqs Esc. Vet., Minas Gerais*, 20:149-153.
- Baxter, J.T. & Gracey, J.F. 1958. Mycotic dermatitis of sheep. *Vet. Rec.* 70(49):1001.
- Bentlnck-Smith, J., Fox, F.H. & Baker, D.W. 1961. Equine dermatitis (cutaneous streptothricosis) infection with *Dermatophilus* in the United States. *Cornell Vet.* 51(3):334-349.
- Bull, L.B. 1929. Dermatomyces of the sheep (Lumpy or matted wool) due to *Actinomyces dermatonomus* (n. sp.). *Aust. J. exp. Biol. med. Sci.* 6(Part 4):301-314.
- Chodnik, K.S. 1956. Mycotic dermatitis of cattle in British West Africa. *J. comp. Path. Therap.* 66(3):179-186.
- Difco Manual. 1965. 9th ed. Difco Laboratoires, Detroit 1, Michigan, U.S.A.
- Edgar, G. & Keast, J.C. 1940. A note on susceptibility of horses and cattle to infection with mycotic dermatitis caused by *Actinomyces dermatonomus* (Bull.). *Aust. vet. J.* 16(3):120-122.
- Egerton, J.R. 1964. Mycotic dermatitis of cattle. *Aust. vet. J.* 40(4):144-147.
- Gordon, M.A. 1964. The genus *Dermatophilus*. *J. Bact.* 88(2):509-522.
- Graber, M. 1969. Existence au Tchad de taurins et de zébus porteurs sains de *Dermatophilus congolensis*. *Révue Elev. Méd. vét. Pays trop.* 22(1):41-45.
- Haalstra, R.T. 1965. Isolation of *Dermatophilus congolensis* from skin lesions in the diagnosis of streptothricosis. *Vet. Rec.* 77(28):824-825.
- Hall, I.C. 1920. Practical methods in the purification of obligate anaerobes. *J. Inf. Dis.* 27:576-590.
- Harrass, P. 1906. Zur Frage der aeroben Züchtung sogenannter obligatanaeroben Bakterien. *Münch. med. Wchschr.* 53:2237-2240. (Citado por Levine & Schoenlein 1930)
- Hart, C.B., Tyszkiewicz, K., Rogers, B.A. & Kane, G.J. 1967. Mycotic dermatitis in sheep. Part II. *Dermatophilus congolensis* and its reaction to compound in vitro. *Vet. Rec.* 81(24):623-631.
- Haslam, T.P. 1920. Immunization with Blackleg Agressin. *J. Immunol.* 5(6):539-546.
- Hibler, von. 1908. Untersuchungen über die pathogenen Anaeroben. Gustav Fischer, Jena. (Citado por Weinberg et al. 1937)
- Hudson, J.R. 1937. Cutaneous streptothricosis. *Proc. Royal Soc. Med.* 30(12):1457-1460.
- Kaplan, W. & Johnston, W.J. 1966. Equine dermatophilosis (Cutaneous streptothricosis) in Georgia. *J. Am. vet. med. Ass.* 149(9):1162-1171.
- Kistner, T.P., Shotts, E.B. & Greene, E.W. 1970. Naturally occurring cutaneous streptothricosis in a white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *J. Am. vet. med. Ass.* 157(5):633-635.
- Kovacs, N. 1925. Untersuchungen über die Technik der Anaeroben-züchtung. *Zentbl. Bakt. ParasitKde I.* 93:344-352. (Citado por Weinberg et al. 1937)
- Lebert, F. & Tardieux, P. 1952. Technique d'isolement et de détermination des bactéries anaérobies Pacomby, S.A.R.L., Paris, 55 p.
- Levine, M. & Schoenlein, H.W. 1930. A compilation of culture media for the cultivation of microorganisms. Williams and Wilkins, Baltimore, U.S.A. 969 p.
- Mason, J.H. & Bekker, J.G. 1934. Further notes on lumpy wool in South Africa. *Onderstepoort J. vet. Sci. anim. Ind.* 3(1):211-216.
- Meynell, G.G. & Meynell, E.M. 1965. Theory and practice in experimental bacteriology. Cambridge Univ. Press. 288 p.
- Nicolet, J., Klingler, K. & Fey, H. 1967. "Dermatophilus congolensis" agent de la streptothricosis du chamois. *Path. Microbiol.* 30(6):831-837.
- Nisbet, D.I. & Bannatyne, C.C. 1955. A dermatitis of sheep associated with an organism of genus *Actinomyces*. *Vet. Rec.* 67(38):713-715.
- Perreau, P., Gayt, P. & Botto, M.T. 1968. Le pouvoir pathogène de *Dermatophilus congolensis* est-il lié à la diffusion d'une toxine? *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.* 21(1):59-69.
- Pier, A.C., Neal, F.C. & Czsewski, S.J. 1963. Cutaneous streptothricosis in Iowa cattle. *J. Am. vet. med. Ass.* 142(9):995-1000.
- Plowright, W. 1958. Cutaneous streptothricosis of cattle in Nigeria. II. The aerobic *Actinomyces* (*Nocardia* sp.) associated with the lesions. *J. comp. Path. Therap.* 68(2):133-147.
- Roberts, D.S. 1957a. Some features of mycotic dermatitis organism. *Aust. vet. J.* 33(6):141-143.
- Roberts, D.S. 1957b. An ecological study of the mycotic dermatitis organism. *Aust. vet. J.* 33(9):233-236.
- Roberts, D.S. 1963a. Properties of *Dermatophilus dermatonomus* zoospores in relation to transmission of mycotic dermatitis. *Aust. J. agric. Res.* 14(3):373-385.
- Roberts, D.S. 1963b. The release and survival of *Dermatophilus dermatonomus* zoospores. *Aust. J. agric. Res.* 14(3):386-399.
- Roberts, D.S. & Vally, T.F. 1962. Streptothricosis in cattle. *Vet. Rec.* 74(25):693-696.
- Shotts, E.B. & Kistner, T.P. 1970. Naturally occurring cutaneous streptothricosis in a cottontail rabbit. *J. Am. vet. med. Ass.* 157(5):667-670.
- Stableforth, A.W. 1937. Cutaneous streptothricosis: a case in great Britain. *Proc. Royal Soc. Med.* 30(12):1455-1457.
- Thompson, R.E.M. 1954. A species of *Rhizobium* isolated from strawberry foot-rot in the sheep. *J. Path. Bact.* 68(2):445-452.
- Weinberg, M., Nativelle, R. Prévot, A.R. 1937. Les microbes anaérobies. Masson, Paris, 1186 p.
- Weiss, H. 1921. The heat resistance of spores with special reference to the spores of *B. botulinus*. *J. infect. Dis.* 28:70-92.

ABSTRACT.- Cruz, L.C.H.da [*Dermatophilus congolensis*. II. Brain mass-heart infusion medium for isolation and cultivation]. *Dermatophilus congolensis*. II. Meio com massa de cérebro para o isolamento e cultivo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira, Série Veterinária*, (1974), 9, 21-24 [Pt, en] UFRRJ, Km 47, Rio de Janeiro, CB, ZC-26, Brazil.

Brain heart infusion agar is generally considered the medium of choice for culturing *Dermatophilus congolensis*. However, our experiments showed that substituting brain mass for brain infusion, allows the growth of a one hundred smaller inoculum ($\pm 10^2$ cells/ml).

The brain mass did not change the redox potential of the medium. Furthermore, it was shown that the growth-promoting effect of brain mass only took place when the mass had been finely distributed throughout the medium. In experiments where all the brain mass was left on the bottom of the tube, as used for culturing anaerobes, no growth occurred. The insoluble lipids of the brain mass could be responsible for the favorable effect.

Additional index words: Comparison of the growth in different media.