

Dermatophilus congolensis.

IV. MANUTENÇÃO DE AMOSTRAS EM LABORATÓRIO¹

LUIZ CELSO HYGINO DA CRUZ²

SINOPSE.— O *Dermatophilus congolensis* foi mantido viável e com suas propriedades morfológicas e fisiológicas, pelo menos, por dois anos e meio, em ágar infusão de cérebro e coração de bovino (Difco), semi-sólido, em "shake tube". Os tubos foram selados com rolha de borracha branca para evitar a dessecação do meio e a penetração de oxigênio do ar atmosférico.

De crostas de pele do animal infectado, conservadas secas a 4°C, conseguiu-se isolar o *D. congolensis* após 16 meses, mas não após 18 meses.

Palavras chaves adicionais para índice: Viabilidade em ágar infusão de cérebro e coração, semi-sólido, em "shake tube" e em crostas de pele.

INTRODUÇÃO

Vários métodos têm sido utilizados na conservação do *Dermatophilus congolensis*. Plowright (1958) observou que o crescimento vigoroso inicial é difícil de ser mantido. Aconselha a fazer repiques alternados em meios sólidos e líquidos. Mesmo assim, salienta que as culturas, algumas vezes, morrem após sete a dez dias, independentemente de serem estocadas em temperatura ambiente ou a 37°C. Segundo ele, as culturas liofilizadas retêm sua viabilidade por nove meses. Gordon (1964) verificou que a sobrevivência em ágar inclinado variava de umas poucas semanas a dois anos, sendo mais prolongada em temperatura ambiente do que a 4°C ou a 37°C. Roberts (1963) verificou que, em ágar sangue, mantido a 4°C, o microrganismo permanece viável por quatro meses, mas não após seis meses. Em terra esterilizada, diz Roberts, ele sobrevive até noventa e seis dias.

Em crostas secas, de ovelhas com dermatofilose, conservadas secas em temperatura ambiente, Moule e Sutherland (1947) verificaram que o germe permanece com sua infectividade por mais de um ano.

O objetivo do presente trabalho foi elaborar um método simples de manutenção das amostras de *D. congolensis* em laboratório.

MATERIAL E MÉTODOS

Conservação em pele

Crostas de pele foram retiradas de um bezerro com dermatofilose e mantidas em geladeira a $\pm 4^\circ\text{C}$. Periodicamente, foi tentado o isolamento do *D. congolensis* através da técnica descrita por Haalstra (1965), cultivando na superfície de placas com ágar infusão de cérebro e coração de bovino (Difco).

¹ Aceito para publicação em 20 de maio 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.

Conservação das culturas

Meio de cultivo. Foi usado como meio a infusão de cérebro e coração de bovino (Difco), acrescida de 0,7% de ágar, pH 7,4.

Inóculo. Foi preparada uma suspensão em caldo simples a partir de crescimento (48 h a 37°C) em superfície de ágar infusão de cérebro e coração de bovino (Difco). Ajustou-se a densidade da turvação ao tubo 10 da escala de MacFarland. Desta suspensão foram feitas diluições decimais no mesmo meio, até a concentração de $\pm 10^8$ células por ml.

Semeaduras. Foram feitas semeaduras com 0,1 ml de cada diluição em tubos de ensaio de 10 x 100 mm. O meio, fundido e resfriado a 45°C, foi, então, vertido nesses tubos até atingir uma altura de 5 a 6 cm. Os tubos foram imersos em água fria para solidificar mais rapidamente. Rolhas de borracha branca, esterilizadas, foram utilizadas em substituição aos tampões de algodão.

Incubação. A incubação foi a 37°C por 48 h, sendo então deixados em temperatura ambiente.

Periodicamente, um tubo era aberto e, através de uma pipeta "Pasteur", retirava-se material, que era semeado na superfície de ágar infusão de cérebro e coração de bovino (Difco), com incubação a 37°C por 48 h.

RESULTADOS

O *D. congolensis* em ágar infusão de cérebro e coração de bovino (Difco), semi-sólido, em "shake tube", permaneceu viável por mais de dois anos e meio (25.5.1969 a 15.12.1971) em temperatura ambiente, conservando as propriedades da cultura recém-isolada. É importante mencionar que o número de sobreviventes é grande. Não pudemos fazer estudos quantitativos por ser o crescimento rugoso, constituído predominantemente de micélio filamentosos ramificados.

Em crostas de pele de animal infectado, conservadas a $\pm 4^\circ\text{C}$ o *D. congolensis* foi isolado com relativa facilidade após 16 meses, mas não após 18 meses.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

É difícil comparar diferentes resultados sem testes quantitativos. Como se sabe, o início de crescimento é dependente do tamanho do inóculo, porque uma grande

quantidade de células já fornece elementos essenciais. Segundo Dean e Hinshelwood (1966), certa concentração mínima de intermediários difusíveis é requerida para o término da "lag fase" e, se quantidade insuficiente deles é transferida com o inóculo, então as células terão de construí-los em o novo meio. Monod (1942) diz que o tempo de latência é mais longo com sementes de pequeno número de células.

A manutenção das propriedades naturais das amostras tem sido a grande preocupação no desenvolvimento de técnicas de conservação de microrganismos. É de grande importância diminuir o número de repicagens a fim de reduzir as probabilidades de surgimento dos fenômenos de variações.

Os métodos usados na conservação do *D. congolensis* têm dado resultados variáveis, não havendo um com aceitação universal. A liofilização, por exemplo, foi testada e o resultado mostrou a viabilidade do germe por nove meses (Plowright 1958). Não há referências, entretanto, ao número de sobreviventes e nem ao comportamento fisiológico do *D. congolensis* após a recuperação.

O método de conservação em "shake tube", com ágar infusão de cérebro e coração, semi-sólido, anteriormente descrito, manteve, pelo menos por dois anos e meio, não somente a viabilidade do *D. congolensis* como também as suas propriedades morfológicas e fi-

siológicas. Consideramos um pormenor importante da nossa técnica de conservação a utilização de rolha de borracha. As rolhas de borracha evitam a dessecação do meio e a penetração de oxigênio do ar atmosférico.

A conservação da crosta do animal infectado tem a vantagem de manter o *D. congolensis* em seu *habitat*, entretanto, o período em que as células se mantêm viáveis é menor que no cultivo em "shake tube".

REFERÊNCIAS

- Dean, A.C.R. & Hinshelwood, C.N. 1966. Growth, function and regulation in bacterial cells. Oxford Univ. Press, Great Britain. 439 p.
- Gordon, M.A. 1964. The genus *Dermatophilus*. J. Bact. 88(2): 509-522.
- Haalstra, R.T. 1965. Isolation of *Dermatophilus congolensis* from skin lesions in the diagnosis of streptothricosis. Vet. Rec. 77(28):824-825.
- Monod, J. 1942. Recherches sur la croissance des cultures bactériennes. 12ème ed. Hermann, Paris. 210 p.
- Moule, G.R. & Sutherland, A.K. 1947. Mycotic dermatitis of cattle. Aust. vet. J. 23(4):95-97.
- Plowright, W. 1958. Cutaneous streptothricosis of cattle in Nigeria. II. The aerobic Actinomycete (*Nocardia* sp.) associated with the lesions. J. comp. Path. Therap. 68(2):133-147.
- Roberts, D.S. 1963. Properties of *Dermatophilus dermatonomus* zoospores in relation to the transmission of mycotic dermatitis. Aust. J. agric. Res. 14(3):373-385.

ABSTRACT.- Cruz, L.C.H.da [*Dermatophilus congolensis*. IV. Maintenance of laboratory strains]. *Dermatophilus congolensis*. IV. Manutenção de amostras em laboratório. *Pesquisa Agropecuária Brasileira, Série Veterinária* (1975) 10, 25-26 [Pt, en] UFRRJ, Km 47, Rio de Janeiro, RJ, ZC-26, Brazil.

Strains of *Dermatophilus congolensis* were maintained in our laboratory for more than two and a half years. The strains were kept in semi-solid Brain-heart infusion agar (0.8% agar). The tubes were kept at room temperature, closed with white rubber stoppers. No detectable change of morphological and physiological properties occurred during this period.

The same strains did not survive for more than 16 months at 4°C on scabs from which they originally had been isolated.

Additional index words: Viability in semi-solid brain heart infusion agar in shake tubes and in dry scabs.