

# Sôbre u'a modificação do meio de Monteverde

Gobert Araujo Costa e Carlos Solé Vernin

Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, D.F.

Os diversos meios de cultura usados no diagnóstico presuntivo de colônias isoladas de placas de meios seletivos para enterobactérias, nem sempre orientam corretamente o diagnóstico desses germes. A necessidade de se obter um meio que forneça o máximo de indicações certas se impõe, uma vez que muito se economizará em tempo e gasto de material.

Isto é especialmente importante em serviços onde o trabalho de rotina em enterobactérias requer um diagnóstico presuntivo de grupo o mais certo e o mais rápido possível, com evidente diminuição do número de colônias suspeitas a serem identificadas.

Vários meios têm sido propostos com esta finalidade (1-9) baseados na fermentação da lactose, sacarose e glicose, bem como produção de hidrogênio sulfurado, associados ou não à prova de hidrólise da uréia, para separação dos *Proteus*.

Em comunicação feita à "Society of American Bacteriologists", Seção do Rio de Janeiro, em dezembro de 1952, mostramos que esses meios não dão grande segurança nos resultados obtidos e apresentamos, para contornar esse inconveniente, u'a modificação do meio de Monteverde. No presente trabalho será dada a técnica de sua preparação e de interpretação dos resultados. Também apresentaremos os primeiros dados obtidos com a aplicação do meio na rotina diagnóstica de enterobactérias.

## MÉTODOS

Numa tentativa de obter indicações mais precisas na separação de enterobactérias, experimentamos vários dos meios acima citados, resultando que, em uma apreciação comparativa da eficiência dos mesmos o proposto por MONTEVERDE mostrou-se superior aos demais.

Como um diagnóstico mais acertado em enterobactérias requer maior número de provas, procuramos melhorar o meio de MONTEVERDE de modo a obter outras indicações bioquímicas e, também, massa de germes para o estudo sorológico imediato.

O meio de Monteverde fornece as seguintes indicações: a) ataque ou não à lactose; b) ataque ou não à uréia; c) mobilidade.

Tentamos obter mais informações usando o artifício de ZIA (8) colocando camadas superpostas: uma de meio semi-sólido, permitindo as verificações de MONTEVERDE, e outra sólida fornecendo-nos massa de germes e outras indicações bioquímicas. Além disto, outras modificações na composição do meio foram tentadas.

De início pensamos no uso da glicose, que se presta, no triplice açúcar, para a separação da *Salmonella typhi* das outras salmonelas, pela produção ou não de gás. No entanto, em nada melhorou o meio pois, ao contrário, impossibilita as leituras da mobilidade, caráter importante para o diagnóstico.

Com a junção de uma camada de meio sólido sobre o meio semi-sólido verificamos, com a incubação a 37°, o aparecimento freqüente de bolhas de gás na massa do meio semi-sólido, dificultando as leituras.

Este fato já havia sido assinalado por ARCHAMBAULT & MC CRADY (10) trabalhando com meios líquidos de fermentação. Encontraram estes pesquisadores de 4 a 100% de tubos com gás formado espontaneamente quando os conservava na geladeira e incubava-os depois a 37°C. Como solução a este problema ARCHAMBAULT & MC CRADY adotam a conservação do meio na temperatura ambiente.

Em nossas verificações podemos confirmar o trabalho citado. Não aconselhamos, contudo, a conservação na temperatura ambiente pois também houve produção espontânea de gás. Adotamos como norma conservar os tubos na estufa a 37°C logo após a saída do autoclave, e aí mantê-los até semeadura.

Procuramos verificar se as modificações na concentração do agar semi-sólido trariam melhoria na fermentação, utilizando várias concentrações, de 0,3 a 0,75% sendo a de 0,5% a melhor.

O meio de Monteverde é esterilizado em autoclave, juntamente com a uréia e a lactose. Esta prática nos mostrou uma acentuada decomposição da uréia e hidrólise da lactose e sacarose usadas. O meio, depois de pronto, apresentava-se com tonalidade azulada e, quando semeado com germes que seguramente não o alterariam apresentava ligeira acidificação mostrando existir fermentação. Esta dificuldade foi resolvida fazendo-se a esterilização dos açúcares e da uréia por filtração, com junção posterior ao meio esterilizado.

A modificação da superposição de uma camada sólida ao meio de Monteverde traria como vantagens a possibilidade de obtermos massa de germes para sorologia, verificação da produção de hidrogênio sulfurado e do indol.

Para a verificação da produção do hidrogênio sulfurado usamos como fonte de enxôfre o tiosulfato e como indicador o ferro, à semelhança do meio de triplice açúcar. Tentamos outros indicadores, como os sais solúveis de bismuto, mas os resultados não foram de molde a serem usados. Além do mais, PACHECO & PERES haviam demonstrado a inferioridade dos sais solúveis como indicadores de hidrogênio sulfurado em comparação com os insolúveis de bismuto (12).

Para a verificação do indol usamos peptona seguramente rica em triptofano; colocávamos papel de filtro embebido em reativo de Ehrlich,

para testar a produção do gás. Procuramos verificar, também, se haveria alguma alteração na estrutura antigênica das bactérias semeadas neste meio, de modo a impossibilitar a identificação sorológica. Testamos as amostras de *Shigella* e *Salmonella* nêle semeadas, sendo perfeitamente possível sua classificação sorológica com sôros polivalentes e monovalentes de grupo e flagelares.

MONTEVERDE utiliza no seu meio apenas a lactose como açúcar separador. Na modificação proposta introduzimos a sacarose, pois, em nosso meio, freqüentemente encontramos germes que fermentam a sacarose mais ràpidamente do que a lactose.

Quanto ao indicador de reação usado foi o mesmo estabelecido por MONTEVERDE. Experimentamos vários outros, como o vermelho de cresol, as misturas propostas por SINGER (4) e o vermelho de fenol. O melhor foi sem dúvida, quanto à sensibilidade, o de MONTEVERDE.

Tomando por base tôdas as verificações acima descritas preparamos o meio da seguinte forma.

A — Azul de timol .....	1,6 g
NaOH 0,1/N .....	34,4 ml
Água .....	65,6 ml

B — Indicador de Andrade

C — Solução de uréia e açúcares:

Uréia .....	20,0 g
Lactose .....	30,0 g
Sacarose .....	30,0 g
Água .....	100,0 ml

Aquecer a mistura para dissolver. Esterilizar por filtração em Seitz. Guardar na geladeira.

1) <i>Agar semi-sólido</i> — Peptona Difco .....	2,0 g
NaCl .....	0,5 g
Agar .....	0,5 g
Água .....	100,0 ml

Ferver para dissolver. Ajustar o pH com NaOH N/10 a 7,3-7,4. Ferver para precipitar. Filtrar em algodão. Juntar os indicadores: azul de timol 0,3 ml e Andrade 1,0 ml. Distribuir em balões em volumes de 100 ml a 200 ml. Esterilizar em autoclave a 115°C. No momento de preparar o meio, fundir o conteúdo dos balões, esfriar a 48-50°C e juntar assêticamente a solução "C" de açúcares com uréia na preparação de 10 ml para cada 100 ml de meio.

2) <i>Agar sólido</i> — Peptona .....	1,5 g
Tripticase ou outra peptona com triptofano .....	0,5 g
Agar .....	2,0 g
Água .....	100,0 ml

Ferver em fogo brando para dissolver. Ajustar o pH a 7,3-7,4 com NaOH N/10. Ferver novamente para precipitar. Filtrar em algodão. Juntar o sulfato ferroso amoniacal: 0,02 g e tiosulfato de sódio: 0,02 g. Adicionar os indicadores: azul de timol 0,3 ml e Andrade 1,0 ml. Distribuir em balões com volumes de 100 a 200 ml e esterilizar em autoclave a 115°C por 15 minutos. No momento de usar fundir o meio, resfriar a 48-50°C e juntar asséticamente 10 ml das soluções de uréia e açúcares para cada 100 ml do meio.

3) *Preparo final do meio* — Distribuir primeiro o agar semi-sólido em tubos de 12 x 120 mm colocando-se 2,5 ml em cada tubo. Deixa-se solidificar na temperatura ambiente em posição vertical. Distribuir o meio sólido sobre esta parte semi-sólida, também em volumes de 2,0 a 2,5 ml e inclinar para solidificar. Dêste modo, tem-se uma camada inferior de meio semi-sólido com uma altura de 12 a 15 mm. Incubam-se os tubos na estufa a 37°C durante 24 horas. Examinam-se todos os tubos para desprezar os que tiverem bolhas de ar. Conservar o meio na estufa até o momento de usar. *Não se deve guardar o meio na geladeira.*

4) *Semeadura* — Deve ser feita inoculando-se o meio com uma agulha, a semelhança do que se faz com o meio de tríplice açúcar. A picada deve ser feita até a metade da parte semi-sólida, fazendo-se depois a estria na superfície da parte sólida.

Após a semeadura coloca-se uma tira de papel de filtro presa à rolha dos tubos e embebida em reativo de Ehrlich. Incuba-se durante 24 a 48 horas a 37°C.

#### INDICAÇÕES FORNECIDAS

Além da massa de germes que obtemos para as provas sorológicas, o meio permite as seguintes leituras:

- 1) Ataque à lactose ou sacarose, com produção de ácido, virando a côr do meio para vermelho.
- 2) Produção de gás pelo ataque à lactose ou sacarose, com acidez do meio.
- 3) Produção de hidrogênio sulfurado visível, pelo escurecimento da parte sólida do meio.
- 4) Mobilidade, pela turvação difusa do meio na parte semi-sólida. Quando imóvel o germe, êste só cresce na picada.
- 5) Hidrólise da uréia, visível em todo o meio, com mudança da côr para azul.
- 6) Produção de indol, evidenciada pela reação do papel embebido no reativo de Ehrlich. A produção do indol não pode ser observada nas amostras indol positivas que acidificam a superfície do meio (11).

## LEITURA DOS RESULTADOS

A leitura é feita com 24 horas de incubação a 37°C mas em certos casos, como nos para-coli e certas amostras do grupo coli, uma observação prolongada até 48 horas fornece-nos melhores resultados. Os diferentes gêneros de bactérias intestinais se comportam neste meio do seguinte modo.

*Salmonella* — A côr do meio permanece inalterada, com escurecimento na parte sólida quando houver produção de hidrogênio sulfurado. A superfície tende para a alcalinidade (côr esverdeada ou azulada). Não há produção de gás. Indol negativo. Movel ou imóvel.

*Shigella* — A côr do meio permanece inalterada no início do período de incubação mudando para vermelho quando a amostra é fermentadora tardia da lactose ou sacarose. A superfície tende para a alcalinidade (esverdeada ou azulada). Indol positivo ou negativo. Imóvel e ausência de gás e hidrogênio sulfurado.

*Proteus* — A côr do meio geralmente muda para azul e algumas vêzes para verde (amostras urease positivas tardias) com escurecimento da parte sólida pela produção de hidrogênio sulfurado. Mobilidade positiva ou negativa. Indol positivo. Gás presente ou ausente. As amostras que atacam rápidamente a sacarose podem dar uma côr amarelo-esverdeada ao meio, algumas vêzes a intensa côr azul do meio dificulta a leitura da produção de hidrogênio sulfurado.

*Escherichia* e *Klebsiella* — Devido à fermentação dos açúcares a côr do meio é vermelha ou amarelada (quando há redução) com grande produção de gás. Mobilidade positiva ou negativa. Geralmente não se pode observar a produção do indol.

*Paracoli* — As amostras fermentadoras da lactose ou sacarose dão as reações de *Escherichia*. As amostras fermentadoras tardias ou não fermentadoras da lactose dão as reações de *Salmonella*. Algumas vêzes o indol é positivo e há produção do hidrogênio sulfurado.

*Pseudomonas* — A côr do meio fica inalterada. A superfície tende para alcalinidade. Não se pode observar a mobilidade, pois não há crescimento no meio semi-sólido.

*Alkaligenes* — A côr do meio não se altera. A superfície tende para alcalinidade.

## RESULTADOS OBTIDOS

Inicialmente o meio foi experimentado usando-se algumas amostras de coleção e outras recentemente isoladas: *Salmonella* 100; *Shigella* 40; *Proteus* 60; *Coli* 30; *Pseudomonas* 5; *Klebsiella* 3; *Paracoli* 80.

Além da sementeira no meio proposto fizemos, no início do trabalho, um estudo comparativo da sua eficiência no acerto diagnóstico com

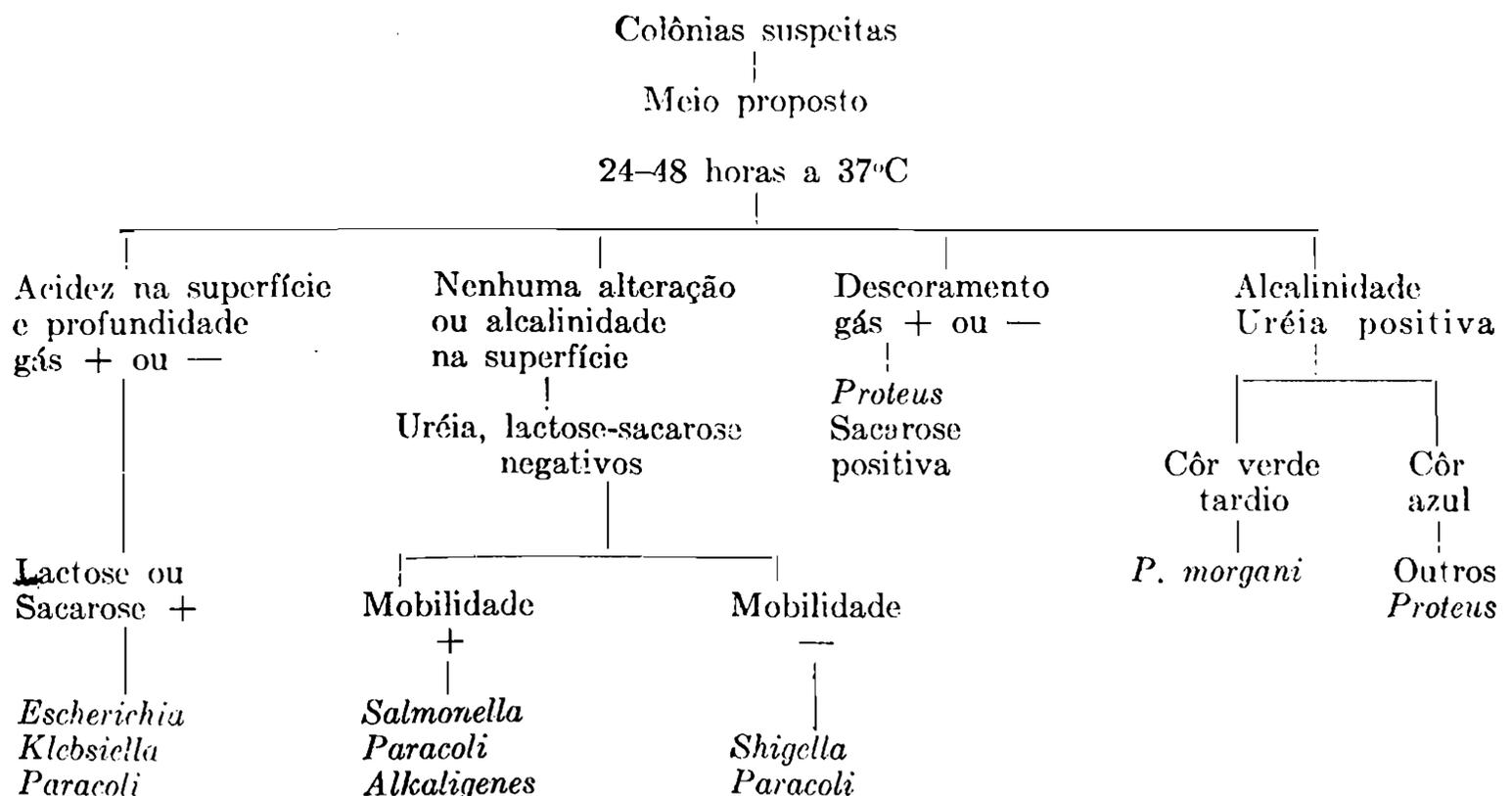
outros meios de triagem usando 71 amostras do grupo coli e paracoli fermentadores lentos ou rápidos da lactose. Resultou desta comparação baixo rendimento do meio que RUGAI propuzera, com apenas 33,8% de resultados corretos; o de SINGER com somente 40,8%; ambos ficaram bem abaixo dos dados numéricos fornecidos pelo tríplice açúcar com 57,8% de acêrto diagnóstico.

É preciso frisar que o tríplice açúcar tão largamente usado nos Estados Unidos fornece resultados medíocres em comparação com os meios de SURRACO-PEREIRA com 69% e MONTEVERDE com 83,1%. Conseguimos, com a modificação proposta, obter um rendimento de cêrca de 8% a mais de acêrto (91,5%) do que o meio de Monteverde, naturalmente pelo maior número de provas fornecidas pelo meio proposto.

Recentemente SUASSUMA (13) fornece-nos os resultados da utilização da modificação proposta, no estudo de 2 399 colônias isoladas de 87 coproculturas para o diagnóstico de *Salmonella* e *Shigella* sendo 1 892 ou sejam 78,8% sumàriamente afastadas pela rápida ação sôbre a lactose, sacarose, ou uréia. Examinando as 507 colônias consideradas como suspeitas de *Salmonella* e *Shigella*, SUASSUMA pôde fazer provas bioquímicas de modo a ter posteriormente confirmação ou não das indicações fornecidas pelo meio.

Dêste modo foi possível, com o meio proposto, uma separação de 30% de amostras fermentadoras tardias não pertencentes aos gêneros *Salmonella* e *Shigella* as quais passariam despercebidas com o uso dos meios correntes. A nossa experiênciã permite-nos dizer que o meio é de grande utilidade nos laboratórios de rotina diagnóstica de enterobactérias. Se bem que a sua execução seja um pouco trabalhosa, não há, praticamente, contaminação nas várias manipulações do seu preparo e os resultados obtidos são de tal ordem que compensam grandemente o esforço dispendido na confecção.

Sugerimos como norma para sua utilização na rotina o esquema abaixo:



### CONCLUSÕES

É proposta uma modificação do meio de Monteverde que, apesar de ser mais trabalhosa no preparo, fornece um grande número de informações. Com êste meio obtem-se uma série de indicações bioquímicas e massa de germes para sorologia.

É sugerido o seu emprêgo na rotina diagnóstica de enterobactérias uma vez que os resultados obtidos mostram sua superioridade sôbre os demais meios experimentados nos acertos diagnósticos.

### SUMMARY

It is well known that the culture media used in the presumptive diagnosis of suspicious colonies from plates inoculated with stools for isolation of enteric organisms do not always correctly indicate the major groups of enterobacteria.

In an effort to obtain a medium affording more exact indications, several media (1-9) have been tested. Modifications of some of these media have also been tested with the result that a satisfactory modification of Monteverde's medium was finally selected. This proved to be most satisfactory, affording, as a result of only one inoculation, a complete series of basic indications. The modification involves changes in the formula, in the method of preparation and in the manner of storage.

The formulae are:

A.	Thymol blue indicator:	NaOH 0.1/N .....	34.4 ml
		Thymol blue .....	1.6 g
		Water .....	65.6 ml
B.	Andrade's indicator		
C.	Urea and sugar solution:	Urea .....	20 g
		Lactose .....	30 g
		Sucrose .....	30 g
		Water .....	100 ml

The mixture (C.) should be warmed slightly in order to dissolve the ingredients rapidly. Sterilise by filtration (Seitz). Keep stock in refrigerator.

The modification of Monteverde's medium is prepared in two parts.

*Semi-solid part* — Peptone (Difco) 2.0 g; NaCl 0.5 g; Agar 0.5 g; Water 100.0 ml. Boil to dissolve the ingredients. Adjust pH with NaOH to 7.3-7.4. Boil again for precipitation. Filter through cotton. Add indicators "A" 0.3 ml and "B" 1.0 ml. Sterilise in autoclave 115°C, 15 minutes in amounts not higher than 200 ml. Just before using, add solution "C" aseptically in amounts of 10 ml to 200 ml of the melted semi-solid medium, maintained at 48-50°C.

*Solid part* — Peptone (Difco) 1.5 g; Trypticase (BBL) 0.5 g; Agar 2.0 g; Water 100,0 ml. Boil to dissolve the ingredients. Adjust pH with NaOH to 7.3-7.4. Boil again. Filter through cotton. Add indicators "A" 0.3 ml and "B" 1.0 ml; ferrous ammonium sulfate 0.02 g; sodium thiosulfate 0.02 g. Sterilise in autoclave 115°C, 15 minutes in amounts not higher than 200 ml. Just before using, add solution "C" aseptically in amounts of 10 ml to 200 ml of the melted solid medium, maintained at 48-50°C.

*Final medium* — The semi-solid part is dispensed first (tubes about 12 x 120 mm) in 2.5 ml amounts and left to harden at room temperature, in vertical position. The solid part is dispensed over the hardened semi-solid one in amounts from 2.0 ml to 2.5 ml and left to harden in slant position, affording a butt of 12 to 15 mm. The tubes of medium should be subjected to a sterility test in the incubator, overnight. Tubes showing spontaneous gas bubbles (air) should then be discarded. The medium should be stored in the incubator (37°C), for not more than 2 to 4 days. Storage of the tubes in the ice-box produces the absorption of air which is released as bubbles when the tubes are incubated at 37°C after inoculation. This fact confirmed the observation of ARCHAMBAULT & McCRADY (10) who worked with liquid media and the application of their observation was found to be essential to the proper working conditions of this double-layer medium.

*Inoculation* — The inoculation is made by means of a long straight needle, as is usually done on the triple sugar, but the needle should penetrate only to about half of the height of the semi-solid column.

*Indol detection* — After inoculation, a strip of sterilized filter paper previously moistened with Ehrlich's reagent, is suspended above the surface of the medium, being held between the cotton plug and the tube.

*Indications given* — In addition to providing a mass of organisms on the slant for serological investigations, the medium gives the following indications:

1. Acid from lactose and/or sucrose (red, or yellowish with strains which reduce the indicators).
2. Gas from lactose and/or sucrose (bubbles).
3. H<sub>2</sub>S production, observed on the solid part (black).
4. Motility observed on the semi-solid part (turbidity).
5. Urease production, observed on solid and semi-solid parts (blue).
6. Indol production, observed on the strip of filter paper (red or purplish). Indol production is not observed with indol positive strains which rapidly acidify the surface of the slant, and the use of oxalic acid has proved to give less sensitive reaction (11).

*Reading of results* — In most cases overnight incubation is enough; sometimes the reactions appear within only a few hours of incubation, affording a definite orientation of the diagnosis. With some cultures it is necessary to observe the medium during 48 hours of incubation. A description showing typical differential reactions follows:

*Salmonella*: Color of the medium unchanged, with blackening of the solid part when H<sub>2</sub>S is positive. The slant tends to alkalinity (greenish or bluish). Gas always absent. Indol negative. Motility positive or negative.

*Shigella*: Color of the medium unchanged at the beginning of incubation period, but acquiring a red color when the strain is late lactose/sucrose positive. Slant tending to alkalinity (greenish or purplish). Indol positive or negative. Motility, gas and H<sub>2</sub>S always negative.

*Proteus*: Color of the medium generally changes entirely to blue or sometimes to green (urease positive delayed), with blackening of solid part when H<sub>2</sub>S is positive. Motility positive or negative. Indol positive. Gas positive or negative. The strains which attack rapidly sucrose may give a yellow-greenish color to the medium. Sometimes the intense blue color of the medium renders difficult the reading of the H<sub>2</sub>S production.

*Escherichiae* and *Klebsiellae*: Color of the medium red or yellow (acid) with great and rapid production of gas. Motility positive or negative. Indol generally impossible to observe.

*Paracoli*: Those lactose or sucrose positive give the same reaction as *Escherichia*. Those lactose or sucrose negatives give the same reactions as *Salmonellae*. Sometimes indol positive and H<sub>2</sub>S negative.

*Pseudomonas*: Color of the medium unchanged. The slant tends to alkalinity. It is impossible to observe motility because there is no growth in the bottom.

*Alkaligenes*: Color of the medium unchanged. The slant tends to alkalinity.

The medium does not alter the antigenic properties of the strains and with the mass of organisms on the slant we can make the serologic diagnosis.

It is admitted that this medium is somewhat more laborious to prepare than others used for similar purposes. Nevertheless it can give informations generally obtained by two or three other media. Its use represents much saving in time, labor and material, and we suggest it for routine laboratory work in which a quick presumptive preliminary grouping of enteric organisms is needed.

## BIBLIOGRAFIA

1. KRUMWIEDE, J.C. JR. & KOHN, L.A., 1917, A triple-sugar modification of the Russell double-sugar medium. *J. Med. Res.*, 37: 225-227.
2. KLIGLER, I.J., 1917, A simple medium for the differentiation of members of the typhoid-paratyphoid group. *Amer. J. Publ. Hlth.*, 7: 1042-1044.
3. DIFCO MANUAL, 1948, *Triple sugar iron agar*. 8th ed.
4. SINGER, J., 1950, Culture of Enterobacteriaceae. I — A practical medium containing urea, tryptone, lactose and indicators. II — Use of urea triple sugar agar. *Amer. J. Clin. Path.*, 20: 880-885.
5. RUGAI, E., Comunicação pessoal.
6. SURRACO, N.L. & PEREYRA, V.R., 1942, Nuevo medio de cultivo para el repicado de colonias en el aislamiento de Salmonelas y Shigelas. *Arch. Urug. Med. Cir. Espec.*, 21: 518-523.
7. MONTEVERDE, J.J., 1948, Medio de cultivo semisolido con lactosa, urea y doble indicador para seleccionar Salmonelas y Shigelas. *Sem. Med.*, B. Aires, 55: 846-848.
8. ZIA, S.H., CHAO, C.C. & CHIN, C.H., 1951, Further studies on the semi-solid multiple sugar medium. *Chin. Med. J.*, 69: 481-487.
9. BADER, R.E. & HOTZ, G., 1951, Eisen-Harnstoff-Agar, eine Modifikation des Eisen-Agars nach Kligler. *Z. Hyg.*, 133: 20-25.
10. ARCHAMBAULT, J. & MCCRADY, M.E., 1942, Dissolved air as a source of error in fermentation tube results. *Amer. J. Publ. Hlth.*, 32: 1164-1168.
11. SOLÉ VERNIN, C., Observações não publicadas.
12. PACHECO, G. & PERES, J.N., 1939, Investigações sobre a capacidade sulfurígena das bactérias. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 34: 527-546.
13. SUASSUMA, J., 1954, VIII Semana Brasileira de Debates Científicos, São Paulo.