

AVALIAÇÃO DO PODER SELETIVO DO MEIO DE RAPPAPORT PARA DIVERSAS ESPÉCIES DE ENTEROBACTÉRIAS (*)

Deise P. Falcão **, Italo Suassuna e Ivone R. Suassuna ***

Foi feita uma avaliação dos mecanismos de seletividade e inibição do meio de Rappaport em relação a espécies representativas de enterobactérias. O meio hipertônico original, com 3,6% de cloreto de magnésio demonstrou-se inibidor para *Salmonella typhimurium*, a qual foi ainda inibida à concentração de 3,1%. Não se verificou crescimento de todas as espécies de *Shigella*, a partir da concentração de 1,8%, *Escherichia coli* a partir de 2,2%, *Enterobacter* a partir de 3,1% e *Proteus mirabilis* só com 3,6%.

O verde malaquita na concentração original de 0,012% demonstra capacidade de inibição do crescimento de todas as espécies testadas, com a exceção de *Enterobacter* e *S. typhimurium*.

A substituição do fosfato diácido de potássio pelo correspondente sal de sódio, atenua o poder inibidor do meio para todas as espécies bacterianas estudadas.

As shigelas revelaram-se as enterobactérias mais sensíveis em relação a esse meio, sendo igualmente inibidas pelos meios à base do tiosulfato de cálcio ou de magnésio, também inspirados no emprêgo de soluções hipertônicas.

Ao serem introduzidas as técnicas de preservação e transporte de fezes por dessecação em folhas de papel de filtro, foi feita a verificação de que os germes de menor significação como patogênicos intestinais, tais como *Proteus* e *Escherichia*, seriam mais sensíveis à dessecação que os germes patogênicos.

Fundamentando-se nessa apreciação, e em que o efeito da dessecação equivalia ao de uma alta pressão osmótica, Rappaport e colaboradores (11, 12, 13) em sucessivas comunicações descreveram alguns meios baseados no princípio da hipertonicidade, para o crescimento seletivo de *Salmonella*, com o emprêgo de soluções de tiosulfato de cálcio ou de magnésio (13) ou ainda de cloreto de magnésio (11, 12) associando outros mecanismos de inibição dos demais componentes da microbiota intestinal, como um baixo pH (13) ou a adição de corantes (11, 12).

O meio da Rappaport com cloreto de

magnésio e verde malaquita tornou-se mais conhecido, e foi submetido à avaliação por alguns autores, destacando-se Collard & Unwin (3), Hooper & Jenkins (6), Iveson e colaboradores (8, 9) e Anderson & Kennedy (1) que confirmaram a sua eficácia para *Salmonella*. Banic (2) alterou a composição do meio, por achar excessiva a concentração original do sal de magnésio, para o crescimento seletivo desses germes, e Zajc-Satler & Banic (15) e Raj (10) acharam-no inferior a outros meios conhecidos.

Um pequeno número de amostras de *Shigella sonnei* foi isolado por Hooper & Jenkins (7) com o meio de Rappaport, e o fato atraiu a nossa atenção em face da aparente insuficiência dos processos disponíveis para o isolamento de *Shigella* (3,5). Propusemos, assim, a averiguar a eficácia dos mecanismos de inibição do meio, com o propósito de confirmar ou adaptar o seu emprêgo, ao isolamento de

(*) Trabalho do Departamento de Microbiologia Médica do Instituto de Microbiologia da U.F.R.J., Guanabara. Com auxílio do Conselho Nacional de Pesquisas e do Conselho de Pesquisas da U.F.R.J.

(**) Endereço atual: Faculdade de Farmácia e Odontologia de Araraquara, São Paulo, Bolsista da CAPES.

(***) Chefe de Pesquisas do Conselho Nacional de Pesquisas.

outros germes patogênicos intestinais, especialmente *Shigella*. Resultados preliminares desse estudo foram anteriormente divulgados (6).

MATERIAL E MÉTODOS

O meio de Rappaport, Konforti & Navon (12), com cloreto de magnésio, em sua fórmula original corresponde a:

A — Bacto-Tryptone	0,5 g
NaCl	0,8 g
KH ₂ PO ₄	0,16 g
Água bidestilada	100 ml

B — Juntar 10 ml de solução de cloreto de magnésio a 40%

C — Acrescentar 3 ml de solução de verde de malaquita a 0,4%.

Em relação a essa fórmula básica foram feitas modificações, estudando-se a substituição do fosfato diácido de potássio pelo fosfato de sódio correspondente; substituição da solução de cloreto de magnésio, por outras menos concentradas, isto é, a 20, 25, 30 e 35 por cento, adicionadas ao meio na mesma proporção (10 ml para cada 100 ml de meio), resultando em concentrações finais de 1,8%, 2,2%, 2,7%, 3,1% e, finalmente, omitindo o emprêgo do corante, conforme apresentamos adiante.

Outros meios, descritos por Rappaport, Skariton-Loewenthal & Olitzki (13) obedeceram à seguinte formulação:

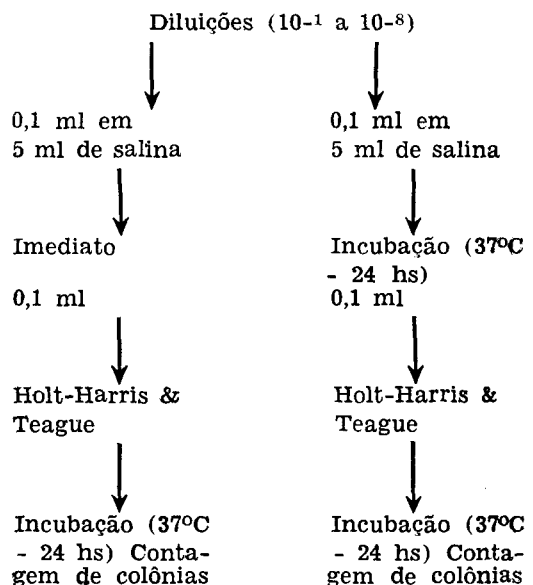
A — Bacto-Peptona	1,0 g
NaCl	0,8 g
NaH ₂ PO ₄	0,16 g
Água destilada	100 ml

O fosfato de sódio foi usado em lugar do fosfato monopotássico em face a verificações que serão detalhadas a seguir. Para cada 5 ml desse meio, foram adicionados volumes variáveis de solução de tiosulfato de cálcio ou de tiosulfato de magnésio, preparadas de acôrdo com as fórmulas abaixo:

B — Na ₂ S ₂ O ₃	40 g
CaCl ₂	18 g
Água destilada	100 ml
C — Na ₂ S ₂ O ₃	16 g
MgCl ₂	18 g
Água destilada	100 ml

Foram utilizadas nas experiências nove estirpes bacterianas da Coleção do Laboratório de Enterobactérias, as quais corresponderam às seguintes espécies: *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii*, *Shigella sonnei*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli* e *Enterobacter sp.*

Na execução de experiências sobre o rendimento ou poder inibidor das diferentes formulações do meio, eram feitas diluições sucessivas em solução salina isotônica, na razão de ordem 10 (de 10⁻¹ a 10⁻⁸) a partir de cultivo de 20-24 horas em caldo simples. De cada diluição eram imediatamente retiradas alíquotas de 0,1 ml, as quais serviam de inóculo para 5 ml de cada meio. Uma alíquota era simultaneamente distribuída em 5 ml de solução salina e, de modo imediato, após homogeneização, retirava-se 0,1 ml para semeadura em meio de Holt-Harris & Teague e posterior contagem do número de colônias correspondente ao inóculo empregado. De modo semelhante, 0,1 ml de cada um dos meios que recebiam o inóculo proveniente das diversas diluições, após 24 horas de incubação a 37°C em estufa bacteriológica, era semeado no mesmo meio de Holt-Harris & Teague, com a finalidade de enumerar as colônias e avaliar o efeito das modificações introduzidas no meio de Rappaport. O processo é esquematizado na seqüência a seguir:



Tôdas as contagens foram realizadas em duplicatas, fazendo-se a média dos valores obtidos entre 30 a 300 colônias por placa.

RESULTADOS

Inicialmente procuramos avaliar a eficácia de concentrações menores de cloreto de magnésio no meio da Rappaport sobre o crescimento de diferentes enterobactérias, pelo que omitimos a inclusão do verde malaquita. Soluções a 20, 25, 30 e 35 por cento foram preparadas e adicionadas ao meio básico, na mesma proporção (10 ml para cada 100 ml do meio) em que entrava a solução a 40 por cento. Em uma ocasião, durante ensaios preliminares com o meio de Rappaport, o fosfato diácido de sódio, foi utilizado por equívoco ao invés do sal correspondente de potássio, observando-se uma atenuação do poder inibitório do meio para as espécies de *Shigella*, além de outras, conforme pode apreciar-se nos resultados reproduzidos no Quadro I. O quadro mostra comparativamente a influência dos fosfatos de sódio e de potássio, em presença de 3,6 por cento de cloreto de magnésio, o que corresponde à concentração original do meio de Rappaport.

O Quadro II apresenta os resultados da comparação de ambos os fosfatos combinados a concentrações decrescentes de cloreto de magnésio. Observa-se que o efeito lesivo sobre o crescimento de *Shigella* está sempre presente a partir da concentração mínima de 1,8% de cloreto de magnésio, embora mais atenuado com o fosfato de sódio. Em relação a *S. typhi* o efeito inibidor surge a partir de 2,7% e a partir de 3,1% para *S. typhimurium*. A supressão do crescimento de *E. coli* e *Enterobacter* é aparente, a partir de 2,7% para *E. coli*, e não se observa até 3,1 em *Enterobacter*. *P. mirabilis* só foi inibido com a concentração original de 3,6% de cloreto de magnésio (Quadro I). Considerando-se os Quadros I e II, seja observado que praticamente com tôdas as estirpes, e em tôdas as dez variações do meio básico, houve diminuição do efeito inibidor quando utilizado o fosfato de sódio, em substituição ao fosfato de potássio.

Em face a êsses primeiros resultados, adotou-se o fosfato diácido de sódio, na mesma concentração do de potássio e, em-

pregando 1,8% do cloreto de magnésio, estudamos o efeito da incorporação do verde malaquita sobre as diferentes espécies bacterianas estudadas.

Os resultados condensados no Quadro III revelam, em ausência do verde malaquita, estímulo no crescimento de quase tôdas as estirpes consideradas, incluindo mesmo *Sh. dysenteriae* e *Sh. sonnei*, com o que desapareceram, nessas condições, as características seletivas do meio, que apenas conservou o poder inibidor sobre as duas outras espécies de shigella, i. e., *Sh. flexneri* e *Sh. boydii*. Com a introdução do verde malaquita (Quadro IV), comprovava-se inibição de quase tôdas as espécies, discreta embora quanto a *S. typhi* e *P. mirabilis*, excetuando-se a êsse respeito apenas *S. typhimurium* e *Enterobacter*, que não sofreram inibição.

Em um último ensaio, foram comparados os outros meios descritos por Rappaport e colaboradores (13), à base de tiosulfato de magnésio e tiosulfato de cálcio, para verificação de seu poder inibidor sobre as quatro espécies de *Shigella*. O Quadro V resume essas verificações, comprovando igualmente a grande sensibilidade de *Shigella* às soluções hipertônicas empregadas.

DISCUSSÃO

Diante da experimentação parece evidente não haver condições que permitam o emprêgo do meio de Rappaport para a seleção de enterobactérias patogênicas outras, além de *Salmonella*. A *Sh. dysenteriae* e a *Sh. sonnei*, embora menos sensíveis que as outras shigelas, só crescem bem nas soluções hipertônicas do cloreto de magnésio em concentrações nas quais perde-se, praticamente, tôda a seletividade do meio.

Os achados em relação a *S. typhi*, isto é, inibição a partir de 2,7% de cloreto de magnésio, coincidem com os dados de Rappaport (11, 12) que, originalmente, recomenda o meio para o isolamento de *Salmonella*, excluindo a *S. typhi*. A inadequação do meio para essa última espécie é ainda comprovada pelas verificações de Anderson & Kennedy (1) e Iveson & Kovacs (8), que o aplicaram ao estudo de número considerável de espécimens de fezes.

Em relação a *Salmonella*, dado o caráter necessariamente limitado de nossas ob-

QUADRO I

Ação inibitória do cloreto de magnésio na concentração de 3,6%, em presença de fosfato ácido de sódio, ou fosfato ácido de potássio, no meio

Espécie	Inóculo (Contagem de colônias em 0,1 ml)	Contagem de colônias em 0,1 ml após 24 horas a 37°C	
		Com KH_2PO_4	Com NaH_2PO_4
<i>Sh. dysenteriae</i>	150×10^4	$< 1 \times 10^1$	205×10^2
<i>Sh. flexneri</i>	100×10^4	30×10^3	50×10^3
<i>S. typhi</i>	113×10^5	56×10^2	155×10^3
<i>S. typhimurium</i>	290×10^5	59×10^4	46×10^5
<i>E. coli</i>	237×10^5	32×10^2	53×10^2
<i>Enterobacter</i>	266×10^5	27×10^2	135×10^2
<i>P. mirabilis</i>	$> 1 \times 10^8$	$> 1 \times 10^3$	$> 1 \times 10^6$

QUADRO III

Efeito do meio de Rappaport modificado (*) sem adição de verde malaquita, sobre diversas enterobactérias

Espécie	Inóculo (em 0,1 ml)	N.º de células em 0,1 ml após 24 horas
<i>Shigella dysenteriae</i>	62×10^4	$> 1 \times 10^7$
<i>Shigella flexneri</i>	63×10^4	27×10^3
<i>Shigella boydii</i>	175×10^3	85×10^2
<i>Shigella sonnei</i>	93×10^4	$> 1 \times 10^8$
<i>Salmonella typhi</i>	56×10^4	$> 300 \times 10^5$
<i>Salmonella typhimurium</i>	98×10^4	$> 1 \times 10^7$
<i>Escherichia coli</i>	150×10^4	$> 1 \times 10^8$
<i>Proteus mirabilis</i>	$> 1 \times 10^6$	$> 1 \times 10^8$
<i>Enterobacter sp.</i>	105×10^4	$> 1 \times 10^7$

(*) Com 1,8% de MgCl_2 e 0,16% de NaH_2PO_4

QUADRO II

Efeito de diferentes concentrações de cloreto de magnésio em presença KH_2PO_4 ou NaH_2PO_4
(a 0,16%)

Contagem de colônias em 0,1 ml de meio após 24 horas a 37°C

Espécie	Inóculo (em 0,1 ml)	1,0% de MgCl_2		2,2% de MgCl_2		2,7% de MgCl_2		3,1% de MgCl_2	
		K^+	Na^+	K^+	Na^+	K^+	Na^+	K^+	Na^+
<i>Shigella dysenteriae</i>	155×10^4	43×10^2	67×10^1	$> 300 \times 10^2$	86×10^2	250×10^1	57×10^2	40×10^2	52×10^2
<i>Shigella flexneri</i>	200×10^4	61×10^2	160×10^1	50×10^4	50×10^1	150×10^2	52×10^2	50×10^2	230×10^2
<i>Shigella boydii</i>	119×10^4	220×10^6	35×10^5	50×10^8	58×10^1	54×10^2	37×10^4	30×10^4	53×10^4
<i>Shigella sonnei</i>	180×10^4	—	50×10^1	57×10^2	30×10^2	14×10^1	49×10^1	14×10^1	30×10^1
<i>Salmonella typhi</i>	57×10^5	—	80×10^5	190×10^5	56×10^1	200×10^2	202×10^2	33×10^2	56×10^4
<i>Salm. typhimurium</i>	210×10^4	$> 1 \times 10^8$	$> 1 \times 10^7$	$> 1 \times 10^8$	$> 1 \times 10^8$	$> 1 \times 10^5$	80×10^2	29×10^1	52×10^2
<i>Escherichia coli</i>	$> 1 \times 10^8$	$> 1 \times 10^8$	$> 1 \times 10^8$	60×10^8	83×10^6	80×10^2	—	30×10^5	40×10^7
<i>Enterobacter sp.</i>	$> 1 \times 10^8$	$> 1 \times 10^8$	$> 1 \times 10^8$	$> 1 \times 10^8$	$> 1 \times 10^7$	$> 1 \times 10^8$	$> 1 \times 10^8$	80×10^5	$> 1 \times 10^8$
<i>Proteus mirabilis</i>	$> 1 \times 10^8$	$> 1 \times 10^8$	$> 1 \times 10^8$	$> 1 \times 10^8$	$> 1 \times 10^7$	$> 1 \times 10^7$	$> 1 \times 10^7$	$> 1 \times 10^8$	$> 1 \times 10^8$

QUADRO IV

Efeito do meio de Rappaport modificado (*) sobre diferentes espécies de *Enterobacteriaceae*

Espécie	Inóculo (em 0,1 ml)	N.º de células em 0,1 ml após 24 horas
<i>Shigella dysenteriae</i>	16 x 10 ⁶	< 1 x 10 ¹
<i>Shigella flexneri</i>	14 x 10 ⁶	< 1 x 10 ¹
<i>Shigella boydii</i>	22 x 10 ⁶	< 1 x 10 ¹
<i>Shigella sonnei</i>	62 x 10 ⁶	< 1 x 10 ¹
<i>Salmonella typhi</i>	> 300 x 10 ⁵	250 x 10 ⁵
<i>Salmonella typhimurium</i>	16 x 10 ⁵	> 1 x 10 ⁸
<i>Escherichia coli</i>	24 x 10 ⁴	< 1 x 10 ¹
<i>Proteus mirabilis</i>	90 x 10 ⁶	> 300 x 10 ⁵
<i>Enterobacter sp.</i>	84 x 10 ⁶	> 1 x 10 ⁶

(*) Com 1,8% de MgCl₂ e 0,16% de NaH₂PO₄

servações, não podemos dizer que elas se opõem às verificações de autores (1, 4, 7, 8, 9) que o acharam superior a outros meios disponíveis mas sem dúvida fortificam a impressão de Banic (1) de que a concentração original do cloreto de magnésio parece excessiva mesmo para *Salmonella*. No entanto, é de lamentar-se que só essa concentração é que demonstrou

inibição suficiente do crescimento de *P. mirabilis*. De fato, parece ser esta espécie a que provoca as maiores dificuldades para o isolamento de *Salmonella*, em face aos recursos presentemente disponíveis para esse propósito (14).

Os fosfatos ácidos de potássio e de sódio, utilizados nas mesmas concentrações, não justificam que a diminuição do poder

QUADRO V

Efeito de soluções concentradas de tiosulfato de cálcio e tiosulfato de magnésio sobre o crescimento de *Shigella*

Espécie	Inóculo (em 0,1 ml)	N.º de células em 0,1 ml de meio após 24 horas a 37°C			
		Sol. tiosulfato de Ca (*)		Sol. tiosulfato de Mg (*)	
		0,5 ml	0,7 ml	0,9 ml	1,3 ml
<i>Shigella dysenteriae</i> ..	150x10 ⁴	70x10 ³	> 300x10 ¹	22x10 ¹	> 300x10 ¹
<i>Shigella flexneri</i>	> 1x10 ⁴	29x10 ³	37x10 ³	46x10 ³	46x10 ²
<i>Shigella boydii</i>	151x10 ³	63x10 ³	61x10 ³	47x10 ³	> 300x10 ³
<i>Shigella sonnei</i>	267x10 ³	98x10 ⁴	> 300x10 ³	38x10 ⁴	> 300x10 ²

(*) Para 5 ml do meio básico.

inibidor pelo sal de sódio seja devida a uma diminuição da hipertonicidade do meio, pois, dado o menor pêso molecular do sódio em relação ao potássio em igualdade de concentração e graus comparáveis

de solubilidade, isto não seria justificável.

Como já reconhecido, pelo seu emprêgo em outros processos de enriquecimento, a seletividade do verde malaquita para as salmonellas parece confirmada.

Summary

The selective and suppressive mechanism of Rappaport's medium as related to the growth of different species of Enterobacteriaceae was evaluated. With the hyperionic medium, which includes 3.6 per cent magnesium chloride, growth of Salmonella typhimurium was suppressed, this specie being inhibited even with a 3.1 per cent concentration of the same compound in the medium. Suppression of growth for the other species was found at 1.8 per cent magnesium chloride for the Shigellae, 2.2% for Escherichia coli, 3.1% for Enterobacter sp., and only when reached 3.6% for Proteus mirabilis.

Malachite green, at 0.012 per cent concentration, as in the original medium, was inhibitory for most tested species, with the exclusion of Enterobacter and S. typhimurium.

By substituting acid sodium phosphate for the original potassium phosphate, a general decrease of the suppressive characteristic of the medium occurred.

The four Shigella species were most sensitive to the magnesium chloride hyperionic solutions, among the enteric organisms tested, and similarly they did not grow in two other hypertonic media with calcium or magnesium thio-sulfate, instead.

BIBLIOGRAFIA

- ANDERSON, K. & KENNEDY, H. Comparison of selective media for the isolation of Salmonellae. *J. Clin. Pathol.*, 18: 747-749, 1965.
- BANIC, S. A new enrichment medium for Salmonellae. *J. Hyg.*, 62: 25-28, 1964.
- BRAIDE, M. A., SUASSUNA, I. & SUASSUNA, I. R. Inibição do crescimento de *Salmonella* e *Shigella* em Agar S. S. *Ciênc. & Cult.* 19: 421-422, 1967.
- COLLARD, P. & UNWIN, M. A trial of Rappaport's medium. *J. Clin. Pathol.*, 11: 426-427, 1958.
- COSTA, G. A., SCORZELLI Jr., A., SUASSUNA, I. R., SUASSUNA, I. & GÓES, P. de. Comparação de meios seletivo-indicadores e de enriquecimento usados no isolamento de enterobactérias patogênicas. *An. Microbiol.*, 5: 239-304, 1957.
- FALCÃO, D. P., SUASSUNA, I. & SUASSUNA, I. R. Comportamento de algumas enterobactérias no meio de Rappaport, com referência especial a *Shigella*. *Ciênc. & Cult.*, 19: 457-458, 1967.
- HOOPER, W. L. & JENKINS, H. R. An evaluation of Rappaport's magnesium chloride/malachite green medium in the routine examination of faeces. *J. Hyg.*, 63: 491-495, 1965.
- IVESON, J. B. & KOVACS, N. A comparative trial of Rappaport enrichment medium for the isolation of Salmonellae from faeces. *J. Clin. Pathol.*, 20: 290-293, 1967.
- IVESON, J. B., KOVACS, N. & LAURIE, W. An improved method of isolating Salmonellae from contaminated disiccated coconut. *J. Clin. Pathol.*, 17: 75-78, 1964.
- RAJ, H. Enrichment medium for selection of *Salmonella* from fish homogenate. *Appl. Microbiol.*, 14: 12-20, 1966.
- RAPPAPORT, F. & KONFORTI, N. Selective enrichment medium for paratyphoid bacteria. *Appl. Microbiol.*, 7: 63-66, 1959.
- RAPPAPORT, F., KONFORTI, N. & NAVON, B. A new enrichment medium for certain *Salmonella*. *J. Clin. Pathol.*, 9: 261-266, 1956.
- RAPPAPORT, F., SKARITON-LOEWENTHAL, M. & OLITZKI, A. L. A culture medium for the enrichment of Salmonellae and growth inhibition of *Proteus*. *Bull. Res. Council. Israel*, 2: 448-449, 1953.

14. SUASSUNA, I. Estudos sôbre o gênero *Proteus*. Tese. Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado da Guanabara. Rio de Janeiro. 145 p., 1963.
15. ZAJC-SATLER, J. & BANIC, S. Efficacy of different selective media for the isolation of *Salmonellae* from faeces. — Clin. Pathol., 18: 750-751, 1965.