

## NOVA MODIFICAÇÃO NA TÉCNICA DE COLORAÇÃO DIFERENCIAL DE *BRUCELLA ABORTUS*

Elizabeth Oliveira da COSTA \*  
Saemi OGASSAWARA \*\*  
Rolando CURY \*\*

RFMV-A/11

COSTA, E. O. da et al. — *Nova modificação na técnica de coloração diferencial de Brucella abortus.* Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S. Paulo, 11: 107-10, 1974.

**RESUMO:** *Descreve-se uma modificação na técnica de coloração diferencial de Brucella abortus. Associa-se a bem conhecida propriedade de resistência do microrganismo ao álcali, com o aquecimento durante a coloração dos esfregaços. Foi utilizada uma mistura, recém preparada, de solução aquosa saturada de safranina e uma solução de hidróxido de potássio 1N, respectivamente nas proporções de 1:2 para o material clínico e 4:1 para os cultivos bacterianos.*

**UNITERMOS:** *Técnica, modificação\*; Coloração diferencial\*; Brucella abortus\*.*

### 1. INTRODUÇÃO

Os exames bacterioscópicos nos trabalhos de diagnóstico das infecções por *Brucella abortus* sempre apresentaram problemas, tanto pela própria constituição do agente, como também pela dificuldade de diferenciá-lo dos outros microrganismos contaminantes do material em exame.

Os primeiros a obter sucesso na pesquisa de uma técnica eficiente de coloração foram HANSEN & KÖSTER<sup>1</sup>, em 1936; pelo citado método as brucelas se apresentam coradas em vermelho (safranina) e os germes restantes em azul (azul de metileno). Essa técnica baseia-se na propriedade das brucelas de se corarem intensamente com os corantes de anilina forte-

mente alcalinos, o que as diferencia da maior parte das bactérias; além disso, elas retêm esta coloração mesmo quando tratadas com soluções ligeiramente ácidas.

Vários autores apresentaram sugestões e mesmo modificações da técnica de HANSEN & KÖSTER, no intuito da obtenção de uma melhor reprodutibilidade e nitidez dos resultados. Entre esses, destacam-se CHRISTOFFERSEN & OTTOSEN<sup>3</sup>, em 1941, SALA<sup>7</sup>, em 1948, BERTHELON & LAFENETRE<sup>2</sup>, em 1958 e VICENTE<sup>8</sup>, em 1967. A mais satisfatória, entretanto, parece ser a apresentada por CHRISTOFFERSEN & OTTOSEN, sendo a adotada oficialmente pela O.M.S.<sup>1, 6</sup>.

\* Auxiliar de Ensino.

\*\* Professor Assistente Doutor.

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP.

Constitui escopo desse trabalho apresentar uma modificação dos métodos conhecidos que ofereça melhores resultados na coloração diferencial da *Brucella abortus*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 — Material

Como material foram utilizados esfregaços a partir das seguintes preparações:

2.1.1 — baços de cobaias inoculados com leite de vacas com brucelose, servindo de controle os baços de cobaias inoculadas com leite de vacas não infectadas;

2.1.2 — suspensões, em solução fisiológica, de *B. abortus* amostras 19 e 1119, cultivadas em ágar infuso de batata;

2.1.3 — cultura de *B. abortus* amostra 19, em ágar triptose;

2.1.4 — mistura de uma suspensão de *B. abortus*, amostra 19, com cultura em caldo simples de *Staphylococcus aureus*;

2.1.5 — o mesmo com cultura em caldo simples de *E. coli*;

2.1.6 — o mesmo com cultura em caldo simples de *P. aeruginosa*;

2.1.7 — "pool" de uma suspensão de *B. abortus* amostra 19 com culturas em caldo simples de *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*.

### 2.2 — Técnicas de coloração

Depois de secos e fixados pelo calor os esfregaços foram submetidos às seguintes técnicas de coloração:

2.2.1 — Técnica de HANSEN & KÖSTER, modificada por CHRISTOFFERSEN & OTTOSEN<sup>3</sup>, 1941;

2.2.2 — Técnica de KOZLOVSKIĪ<sup>5</sup>, 1940;

2.2.3 — Nossa modificação de técnica, que consistiu no seguinte:

a — corar durante 1 minuto, a quente, com uma mistura recém preparada de solução saturada de safranina e de uma solução de hidróxido de potássio 1N, na proporção de 1:2, respectivamente;

b — lavar em água corrente;

c — decorar duas vezes, durante 15 segundos, cada vez, com a solução de ácido sulfúrico a 0,1%;

d — lavar em água corrente;

e — corar o fundo com a solução de verde brilhante a 1% (acrescida de hidróxido de sódio na concentração final de 1:10.000) durante 1 minuto;

f — lavar, secar e examinar.

Para a coloração do material descrito em 2.1.1 a safranina e o hidróxido de potássio foram usados na proporção de 1:2, respectivamente. Nos demais a proporção foi de 4:1.

## 3. RESULTADOS

As brucelas se apresentaram nitidamente coradas de vermelho alaranjado, destacando-se bem da cor verde com que se coravam os demais germes.

As modificações introduzidas com a nossa técnica permitiram uma nitidez maior nos exames bacterioscópicos, em comparação com as outras técnicas mencionadas.

## 4. DISCUSSÃO

A escolha das culturas de *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, para deliberadamente contaminar as suspensões de brucelas, não foi arbitrária. Essas bactérias poderiam ser encontradas contaminando o corrimento vaginal, após o aborto causado por infecção brucélica.

Acreditamos que os bons resultados obtidos na coloração seletiva se devem ao fato de termos aliado o aquecimento à ação seletiva da mistura recém preparada de safranina e hidróxido de potássio, cuja eficiência na coloração das brucelas já fora bem estabelecida por HANSEN & KÖSTER.

O aquecimento já fora empregado anteriormente por KOZLOVCKII, todavia, este autor desprezou a vantajosa mistura da safranina com o hidróxido de potássio, através da qual a bactéria recebe quantidades surpreendentes de corante, sem perder suas propriedades.

Em nosso caso utilizamos solução aquosa saturada de safranina, de acordo com a modificação preconizada por CHRISTOFFERSEN & OTTOSEN, porém em proporção da 1:2 em relação à quantidade de hidróxido de potássio, na pesquisa de brucelas em material clínico; na coloração de esfregaços de cultivos puros ou contaminados a proporção entre as duas soluções foi de 4:1.

A redução da quantidade de hidróxido de potássio, na mistura para coloração do germe em culturas, se prende ao fato de neste caso o álcali ficar em contato direto com as brucelas. Uma proporção maior de hidróxido de potássio conforme indicado para o material clínico, permeabilizaria excessivamente o germe nas culturas. Nessas condições, a simples lavagem do esfregaço com água o descoloraria, passando, então, a tomar o germe a coloração de fundo.

Os demais procedimentos são os mesmos que constam da técnica recomendada oficialmente pela O.M.S. Excetua-se o fato de, para coloração de fundo, termos empregado solução de verde brilhante.

#### 5. CONCLUSÃO

As experimentações efetuadas permitem aconselhar o emprego da técnica por nós estudada no exame bacterioscópico de material contendo brucelas.

RFMV-Δ/11

COSTA, E. O. da et al. — *New change in the Brucella abortus differential staining technique*. *Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, 11: 107-10, 1974.

**SUMMARY:** *A new modification of the differential staining technique for B. abortus was described here.*

*The method was based upon the well known resistance of B. abortus to alkali associated with heating during the staining of the smears.*

*A fresh mixture of saturated aqueous solution of safranin and 1N potassium hydroxide was used in 1:2 proportion, respectively, for the clinical material and 4:1 for the bacterial cultures.*

**UNITERMS:** *Technique, change\*; Differential staining\*; Brucella abortus\*.*

---

COSTA, E. O. da et al. — Nova modificação na técnica de coloração diferencial de *Brucella abortus*. *Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, 11:107-10, 1974.

---

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALTON, G. G. & JONES, L. M. — *Las técnicas de laboratorio en la brucelosis*. Ginebra, FAO, 1969.
2. BERTHELON, M. & LAFENETRE, H. — Le diagnostic de la brucellose chez le animaux domestiques. *Bull. Off. int. Epizoot.*, 50:123-32, 1958.
3. CHRISTOFFERSEN, P. A. & OTTOSEN, H. E. — Nyere Farvningsmetoder. *Maanedsskr. Dyrlaeg.*, 53:455-63, 1941.
4. HANSEN, K. & KÖSTER, H. — Nachweis von *Brucella abortus* und Grund der Alkalfestigkeit. *Dtsch. tierarztl. Wschr.*, 44:739-42, 1936.
5. KOZLOVSKII, E. V. — Bacteriological diagnosis of brucella infection. *Plen. Vet. Sekt. Akad. Sel. Khoz. Nauk*, 20.º, 1938. (Brucellosis), 1940. p. 135-37.
6. ORGANIZATION MONDIALE DE LA SANTE — Groupe Mixte FAO/OMS d'experts de la brucellose. Rapport sur la première session. Washington, 191. (Série de Rapports techniques, n.º 37)
7. SALA, G. — Le diagnosi microscopica delle brucellose. *Clin. vet.* (Milano), 71:249-51, 1948.
8. VICENTE, M. V. — Estudio actual de la brucellosis ovina. *Supl. cient. Cons. Gen. de Col. vet. Esp.*, 179:3-20, 1967.

Recebido para publicação em 28-8-74  
Aprovado para publicação em 29-8-74